

Estudio comparativo del efecto antimicrobiano in vitro entre los aceites esenciales de *Citrus sinensis*, *Citrus limonum* y *Origanum vulgare* en *Staphylococcus aureus*

I. INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (2017), la resistencia antimicrobiana se encuentra entre las 10 principales amenazas a la salud pública que enfrenta la humanidad actualmente. Siendo una de las bacterias más comunes y responsables de enfermedades y mortalidad el *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (Maddiboyina et al., 2023). Esta bacteria es altamente adaptable y puede provocar infecciones cutáneas, respiratorias y osteomielitis (Cervantes-García et al., 2014). Debido a su naturaleza gram positiva, posee una pared celular compuesta por una capa gruesa de peptidoglicano que le brinda protección al actuar como barrera contra los antibióticos (Mora, 2012). En las últimas décadas, ha representado un peligro para la efectividad de los tratamientos de quemaduras (Muthaiyan, 2012). Por ende, se han buscado enfoques alternativos, entre ellos, el uso de aceites esenciales.

Los aceites esenciales son líquidos aromáticos oleosos extraídos de distintas partes de las plantas (Burt, 2004). En esta investigación, se evaluarán tres de ellos: el aceite de *Citrus sinensis*, *Citrus limonum* y *Origanum vulgare*. Estos tres aceites esenciales son ampliamente utilizados en la industria alimentaria y de fácil acceso comercial en el Perú. Tanto *C. sinensis* como *C. limonum* son cítricos ricos en vitamina C, lo cual, como expresa Mousavi (2019), exhibe propiedades antimicrobianas y efectos inmunomoduladores, especialmente cuando se encuentra en concentraciones elevadas. No obstante, ambas variedades presentan cantidades diferentes de dicho componente. Por otro lado, el *O. vulgare* se utiliza como aromatizante alimentario y cuenta con un amplio espectro de acción frente a los microorganismos debido a su alto contenido de derivados fenólicos, como el carvacrol y timol (Preuss et al., 2005).

Este estudio tiene como propósito esclarecer en qué medida los aceites esenciales de *Citrus sinensis*, *Citrus limonum* y *Origanum vulgare* en una concentración del 100% presentan un efecto antimicrobiano en *Staphylococcus aureus* in vitro. Se responderá a aquello a través del método pseudoexperimental de Kirby-Bauer. Para lo cual se ha formulado la hipótesis que el aceite esencial de *Origanum vulgare* tendrá un mayor efecto

antimicrobiano in vitro que el de *Citrus limonum* y *Citrus sinensis* en *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 en placa con agar solidificado.

II. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿En qué medida los aceites esenciales de *Citrus sinensis*, *Citrus limonum* y *Origanum vulgare* en una concentración del 100% presentan un efecto antimicrobiano en *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 in vitro?

III. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general: Evaluar el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de *C. sinensis*, *C. limonum* y *O. vulgare* sobre *S. aureus* ACT 29215 en placa con agar solidificado.

Objetivos específicos:

- Comparar el efecto de los aceites esenciales de *C. sinensis*, *C. limonum* y *O. vulgare* sobre *S. aureus* ACT 29215 en placa con agar solidificado.
- Determinar según la escala de Duraffourd el efecto cualitativo de los aceites esenciales de *C. sinensis*, *C. limonum* y *O. vulgare* sobre *S. aureus* ACT 29215 en placa con agar solidificado.

IV. VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN

- **Variable independiente:** Aceites esenciales de *C. sinensis*, *C. limonum* y *O. vulgare*
- **Variable dependiente:** Diámetro de los halos de inhibición de los aceites esenciales de *C. sinensis*, *C. limonum* y *O. vulgare* en *S. aureus* ACT 29215.

Tabla 1.

Datos acerca de cuáles son las variables controladas y cómo serán comprobadas.

Variables controladas	¿Cómo serán controladas?
Cepa de <i>S. aureus</i>	Se colocó a cada placa la misma cepa de <i>S. aureus</i> .

Temperatura	Durante el crecimiento de los cultivos se mantuvo el horno a una temperatura constante de 37°C.
Tiempo de incubación	Se contabilizó con un reloj 48 horas de incubación para todas las placas.
Método de ensayo	En todas las muestras se empleó el mismo método, Kirby-Bauer.
Concentración de los aceites esenciales	Se colocaron aceites con una concentración del 100%.
Cantidad de agar por placa	La placa tiene una línea que indica 20ml, hasta allí se vertirá el agar.
Distancia entre discos	Se midió con una regla una distancia de 5 cm entre cada disco.
Espacio de experimentación	Se realizó todo el procedimiento en el mismo ambiente.

Elaboración propia

V. SEGURIDAD PERSONAL Y AMBIENTAL

En el presente estudio, se acató a las prácticas estándares de seguridad recomendadas por el Ministerio de Salud del Perú (2002), en concordancia con la Serie de Normas Técnicas N° 18. Durante el desarrollo del procedimiento en el laboratorio, se limitó el acceso a dicho espacio y se garantizó que el personal se lavará las manos antes y después de manipular los materiales. Se siguieron las siguientes pautas: se evitó consumir alimentos, bebidas y tabaco, así como manipular lentes de contacto o aplicar maquillaje durante la ejecución del experimento. Asimismo, se emplearon dispositivos mecánicos para llevar a cabo el pipeteo,

y los procedimientos se llevaron a cabo con la máxima precaución para minimizar la generación de salpicaduras o aerosoles. Con el objetivo de asegurar un entorno seguro, se procedió a la descontaminación diaria del área de trabajo, así como de los materiales utilizados. Además, se implementaron medidas adicionales de protección personal, como el uso de mandiles de manga larga y guantes de látex. Dado que se trabajó con patógenos, también se hizo obligatorio el uso de mascarillas para evitar cualquier riesgo potencial.

VI. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1) Materiales

Figura 1.

Materiales empleados

<ul style="list-style-type: none"> ● 1 balanza digital ● 1 gradilla para tubos de ensayos ● 5 tubos de ensayo ● 10 pares de guantes de latex ● 1 bata de laboratorio ● 3 mascarillas ● 1 marcador indeleble marca Faber Castell ● 12 placas petri que tengan 8.5cm de diámetro ● Aceite esencial de <i>O. vulgare</i>, marca Ikaro ● Aceite esencial de <i>C. limonum</i>, marca Ikaro ● Aceite esencial de <i>C. sinensis</i>, 	<ul style="list-style-type: none"> ● 1 regla Artesco de 20 cm (cm ± 0.05) ● 1 tabla de excel ● Discos de sensibilidad (Sensidiscos) 1 cartucho de 50 discos ● 4 tubos de ensayo de 20 ml ● 1 agar nutritivo en polvo, marca Himedia ● 1 probeta de 1 litro ● 1 mechero Bunsen ● 1 asa de siembra en forma de L ● 1 horno esterilizador, marca Kyntel ● 400mL de agua destilada
--	---

<p>marca Nua</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 1 micropipeta graduable de 20 a 200 µl, marca DLAB ● 1 matraz de 500mL ● Pinza ● 1 campana de laboratorio ● 1 placa con la cepa ACT 29213 de <i>S. aureus</i> cultivada por la empresa Bioservice S.R.L. 	<ul style="list-style-type: none"> ● 2 bolsas rojas para residuos peligrosos ● 1 balón de gas ● 3 puntas para la micropipeta, marca Tarsons ● Escala de DURAFFOURD ● Buffer fosfato salino (pH=7) ● 1 tela negra de 15x15cm
---	---

Elaboración propia

2) Procedimiento

1. Preparación del medio de cultivo Agar nutritivo de acuerdo con la ficha técnica. Para después colocar 20 ml del mismo en cada placa.
2. Realización del método de turbidez de McFarland, empleado para estimar la concentración de microorganismos en una suspensión bacteriana.
 - 2.2 Verter 10ml de buffer fosfato salino (pH=7) en otro tubo de ensayo.
 - 2.2 Mezclar 10 ml de agua destilada con colonias de bacterias, obtenidas mediante el recojo usando el asa de siembra, en un tubo de ensayo. (La cepa de la bacteria fue mantenida a una temperatura de 4°C hasta que se cultivaron.)
 - 2.3 Comprobar la turbidez de la solución de bacterias comparando ambos tubos de ensayo, con una tela negra atrás. Correspondiente a un valor de 0.5 en la escala de McFarland.
3. Cultivo de *S. aureus* con los discos y aceites esenciales en campana de laboratorio.

3.1. Pipetear 100 µl de solución (agua destilada más bacterias) y colocar dicha cantidad en cada placa con agar.

3.2. Esterilizar el asa de siembra, al quemar la misma en el mechero Bunsen.

3.3. Dispersar la solución con un asa de siembra en forma de L.

3.4. Esterilizar una pinza, al quemar la misma en el mechero Bunsen.

3.5. Insertar con la pinza dos discos de sensibilidad por placa a una distancia de 5cm.

3.4. Vertir, con la micropipeta, 10µl de los aceites esenciales al 100% de concentración. *C. sinensis* a los discos de cuatro placas, *C. limonum* a los discos de otras cuatro placas y *O. vulgare* a los discos de las últimas cuatro placas.

3.5. Incubar las placas en el horno a 37°C durante 48 horas.

4. Medición de los halos.

4.1 Extraer las placas del horno esterilizador.

4.2 Medir los halos de inhibición con una regla.

5. Descarte del material biológico y de laboratorio.

5.1 Incinerar placas junto al cultivo de las placas a 150 C° durante 2 horas.

5.2 Descartar guantes y puntas de micropipeta en bolsas rojas.

5.3 Desinfectar el área de trabajo con un paño y alcohol.

VII. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Después de 48 horas de incubación, los aceites esenciales testeados mostraron zonas de inhibición observables (ver anexo 1).

Tabla 2.

Promedio y desviación estándar del diámetro de inhibición de los aceites esenciales

Aceites esenciales	Promedio (mm)	Desviación estándar (mm)
Citrus sinensis	19.075	21.98332702
Citrus limonum	6.9625	4.488986523
Origanum vulgare	-	-

(-)= sin halo de inhibición

Elaboración propia

El aceite esencial de *O. vulgare* fue el único que mostró una efectividad total frente a *S. aureus*, no hubo crecimiento de ninguna colonia (ver anexo 2). Este resultado sugiere, de acuerdo con la escala de Duraffourd, que la bacteria es "sumamente sensible +++" a dicha sustancia. De acuerdo con Hao et al. (2021), esto podría deberse al efecto disruptivo de el *O. vulgare* en la síntesis de proteínas y el metabolismo de los aminoácidos, lo cual impide la proliferación bacteriana. En un estudio similar, realizado por Pintado et al. (2022), que evaluó el aceite de *O. vulgare* a una concentración del 100% se encontró un halo de inhibición de 14,91 mm. Según la escala de Duraffourd, esto se considera "medio sensible ++". Se identifica una diferencia significativa en comparación con los resultados de esta investigación, donde se obtuvo una efectividad total con una zona de inhibición de 85 mm en la placa. Adicionalmente, según los datos de Tiwari et. al (2018), al experimentar con *O. vulgare* y *Calcium hydroxide* frente a *Enterococcus faecalis*, otra bacteria grampositiva, se obtuvieron resultados más favorables, con un halo de inhibición de $(25.0 \pm 1.0 \text{ mm})$.

En cambio, *C. sinensis* y *C. limonum* muestran si bien ciertos halos de inhibición, su efectividad es parcial (ver anexo 3 y 4). Su impacto antimicrobiano es causado por la presencia de vitamina C. La vitamina C permeabiliza la célula pues impacta en la síntesis de ciertas proteínas (Kramarenko et al., 2007). A partir de los resultados, considerando el promedio, se puede concluir que frente a *C. sinensis* es "muy sensible ++" y ante *C. limonum* es Nula (-). Para comprobar si hay una diferencia significativa entre ambas sustancias se realizó una prueba de T student con el programa Past 4. Aquello mostró un valor de p de 2.1448 lo cual quiere decir que no es significativo ya que es mayor a 0.5.

Tabla 3.

Prueba de t student entre los aceites esenciales de C. sinensis y C. limonum.

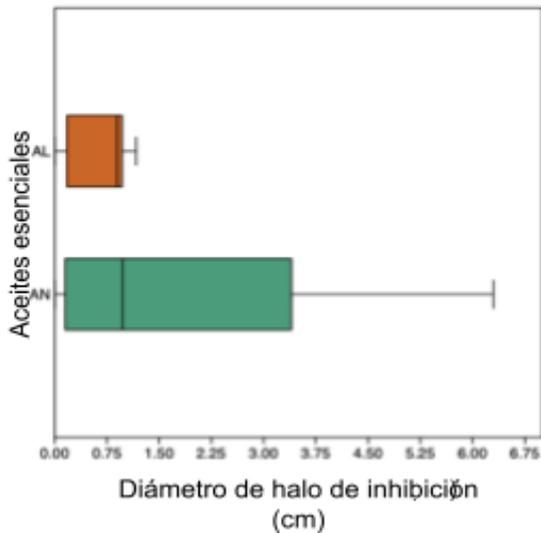
Aceite esencial de <i>Citrus sinensis</i>		Aceite esencial de <i>Citrus limonum</i>	
N:	8	N:	8
Media:	1.9075	Media	0.69625
95% conf.:	(0.068668 3.7463)	95% conf.:	(0.32097 1.0715)
Varianza:	4.838	Varianza:	0.20151
Critical t value (p=0.05): 2.1448			

Elaboración propia

El gráfico estadístico de en donde se comparan dos cajas de bigotes (el anaranjado es de *C. limonum* y el verde de *C. sinensis*), realizado con el mismo programa, muestra que el valor medio de las dos sustancias; sin embargo, no este no es muy diferente. A pesar de que en el caso de *C. sinensis* hayan sido más dispersos los resultados ya que el valor máximo es de 6.3 cm y el bigote derecho es largo a comparación del izquierdo. En ambos se evidencia como valor inferior cero pues en algunas ocasiones el halo de inhibición fue cero. Se piensa que la ausencia de efecto antibacteriano en los algunos discos mostrados (en donde se colocó “-” en la Tabla 2) se debe a una dispersión deficiente del aceite esencial, debido a las propiedades no polares y altamente volátiles del compuesto.

Figura 3

Diagrama comparativo de los aceite esencial de C. sinensis y C. limonum



Elaboración propia

En el caso del aceite esencial de *C. sinensis*, se observó que, según la Tabla 2, el diámetro promedio del halo de inhibición fue de 19.075 mm. Estos resultados difieren de los obtenidos por Valdiviezo (2019), quien registró un valor de 15.5 mm para una concentración comparable, lo que representa una diferencia de 3.575 mm. Además, Saquina (2018) obtuvo un tamaño aún menor, con un valor de 14.84 mm a una concentración del 90%.

Para el aceite esencial de *C. limonum*, se encontró un halo de inhibición de 6.9625 mm. Esto difiere del resultado obtenido por Burga (2015), quien encontró un halo de inhibición de 10.2 mm a una concentración del 75%. Es interesante notar que a una concentración menor (25%), se obtuvo una mayor efectividad. Considerando que en todos los casos el aceite esencial fue extraído manualmente, a diferencia de este estudio en donde se compró.

VIII. CONCLUSIONES

- Se confirma la hipótesis planteada, ya que se observa una mayor capacidad inhibitoria del aceite esencial de *Origanum vulgare* en comparación con los aceites esenciales de *Citrus limonum* y *Citrus sinensis* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 en placas de agar solidificado.
- En una concentración del 100% de 10µL del aceite esencial de *Citrus sinensis*, se evidencia una capacidad inhibitoria promedio de 19.075mm de diámetro.

- En una concentración del 100% de 10µL del aceite esencial de *Citrus limonum*, se evidencia una capacidad inhibitoria promedio de 6.9625mm de diámetro.
- En una concentración del 100% de 10µL del aceite esencial de *Origanum vulgare* en cada uno de los dos discos de sensibilidad, se evidencia una capacidad inhibitoria en su totalidad dentro de placas de 8,5 cm de diámetro.

LIMITACIONES

- Los aceites esenciales fueron de marcas diferentes por lo que podrían haber empleado diferentes metodologías para su composición y ello alterar el resultado.
- Las placas de Petri utilizadas tenían un tamaño reducido de 8,5 cm, lo que limitó la capacidad de experimentar con un mayor número de discos de sensibilidad.
- El tiempo de incubación de *S. aureus* fue prolongado, ya que sobrepasó las 24 horas recomendadas. Esto impidió seguir las recomendaciones exactas del método de Kirby Bauer y, como resultado, los resultados obtenidos podrían diferir al compararlos con otros estudios que hayan utilizado el mismo método.
- Los aceites esenciales al ser apolares muestran una actividad antimicrobiana dispareja.

SUGERENCIAS

- Utilizar una marca consistente de aceites esenciales en futuros experimentos.
- Usar un tamaño de placas petri mayor que permita la experimentación con varios discos de sensibilidad.
- Usar la cantidad de horas recomendadas por el método Kirby Bauer, (24 horas).
- Para un enfoque más detallado, se sugiere realizar experimentos con diferentes concentraciones diluidas del aceite esencial de *O. vulgare* frente a la misma bacteria. De esta manera, se puede determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) necesarias para obtener efectos inhibidores y bactericidas, respectivamente.

- Repetir el procedimiento utilizando aceites esenciales de otras plantas pertenecientes a la misma familia que *O. vulgare*.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICOS

- Antimicrobial resistance*. (2021, 17 de noviembre). World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28-40.
- Maddiboyina, B., Roy, H., Ramaiah, M., Sarvesh, C. N., Kosuru, S. H., Nakkala, R. K., & Nayak, B. S. (2023). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: novel treatment approach breakthroughs. *Bulletin of the National Research Centre*, 47(1), 95.
- Mora, X. (2012). Diferenciando bacterias gram+ y gram. *Selecciones avícolas*, 25-27.
- Mousavi, S., Bereswill, S., & Heimesaat, M. M. (2019). Immunomodulatory and antimicrobial effects of vitamin C. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 9(3), 73-79.
- Muthaiyan, A., Biswas, D., Crandall, P. G., Wilkinson, B. J., & Ricke, S. C. (2012). Application of orange essential oil as an antistaphylococcal agent in a dressing model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 1-8.
- Pintado, L., Lopez P., Alberto, L. (2022). Actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Origanum vulgare* L.(Orégano) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Universidad María Auxiliadora Repositorio Institucional.
- Preuss, H. G., Echard, B., Dadgar, A., Talpur, N., Manohar, V., Enig, M., Bagchi, D., & Ingram, C. (2005). Effects of Essential Oils and Monolaurin on *Staphylococcus aureus*: In Vitro and In Vivo Studies. *Toxicology mechanisms and methods*, 15(4), 279–285.

- Saquina, D. (2018). Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* [Tesis de bachiller, Universidad Técnica de Ambato]. Universidad Técnica de Ambato Repositorio digital. <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/28463>
- Tam Burga, M. J. (2015). Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de cáscara de citrus limón (limón) sobre *staphylococcus aureus* meticilino resistente. [Tesis de bachiller, Universidad Privada Antenor Orrego]. Repositorio Nacional digital. <http://repositorio.upao.edu.pe/handle/20.500.12759/1710>
- Tiwari, G., Patil, S., Bondarde, P., Khadke, S., & Gakhare, R. (2018). Antimicrobial efficacy of commercially available plant essential oils with calcium hydroxide as intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*: An in-vitro study. *Journal of Dental and Medical Sciences*, 17(6), 19-24.
- Valdiviezo, M. (2019). Efecto Antibacteriano del Aceite Esencial de *Citrus Sinensis* “Naranja” sobre *Staphylococcus Aureus* ATCC29213 comparado con Oxacilina, Estudio in Vitro. [Tesis de bachiller, Universidad de César Vallejo]. Universidad de César Vallejo Repositorio digital institucional. <https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/29712>
- Hao, Y., Li, J., & Shi, L. (2021). A carvacrol-rich essential oil extracted from oregano (*Origanum vulgare* “Hot & Spicy”) exerts potent antibacterial effects against *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 741861.
- Kramarenko, G., Hummel, S., Martin, S., & Buettner, G. (2007). Ascorbate reacts with singlet oxygen to produce hydrogen peroxide. *Photochemistry and Photobiology*. 82, 1634–1637.
- Ministerio de Salud. (2002). BIOSEGURIDAD EN LABORATORIOS DE ENSAYO, BIOMÉDICOS Y CLÍNICOS. https://www.minsa.gob.pe/Recursos/OTRANS/08Proyectos/2021/PIM-SS-2021_norma-14.pdf

Anexos

Anexo 1.

Datos acerca de los diámetros de inhibición por placa.

Aceites esenciales	Placas	Diámetro (mm)
	1	6.5
		63
	2	36
		-
Citrus sinensis	3	28
		6.1
	4	13
		-
	1	11.7
		7
	2	-
		8.6
Citrus limonum	3	-
		9.3
	4	9.8
		9.3
	1	-

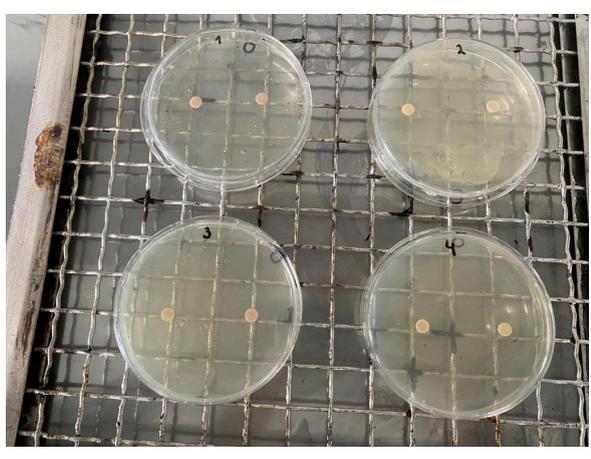
Origanum vulgare	-
2	-
3	-
4	-

(-)= sin halo de inhibición

Elaboración propia

Anexo 2.

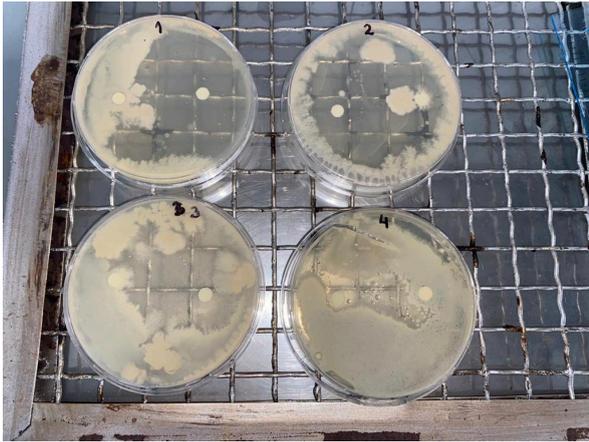
Placas con discos de O. vulgare con halos de inhibición de colonias de S. aureus.



Elaboración propia

Anexo 3.

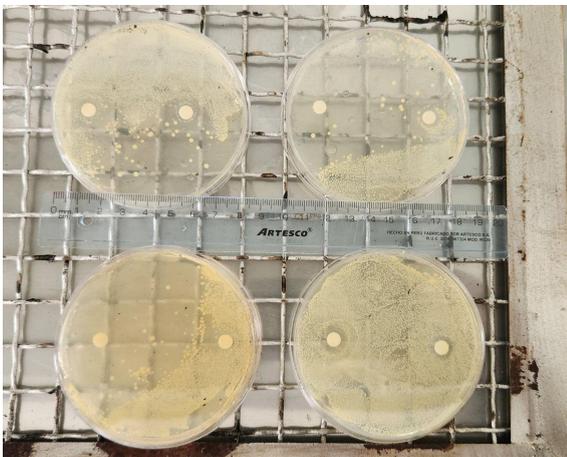
Placas con discos de C. sinensis con halos de inhibición y crecimiento de algunas colonias de S. aureus .



Elaboración propia

Anexo 4.

Placas con discos de C. Limonum con halos de inhibición y crecimiento de algunas colonias de S. aureus.



Elaboración propia