



**Universidad
Norbert Wiener**

Powered by **Arizona State University**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUÍMICA**

Tesis

Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de la cáscara de Citrus reticulata (Mandarina) en cepas de Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Escherichia coli ATCC, Lima 2023

**Para optar el Título Profesional de
Químico Farmacéutico**

Presentado por:

Autora: Irazabal Gallegos, Miriam Belen

Código ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-2351-3415>

Autora: Julca Asenjo, Ana Vilma


Código ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-7351-3040>

Asesor: Dr. Collanque Pinto, Jesús Daniel

Código ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2855-1632>

Lima – Perú

2024

	DECLARACIÓN JURADA DE AUTORIA Y DE ORIGINALIDAD DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	
	CÓDIGO: UPNW-GRA-FOR-033	VERSIÓN: 01 REVISIÓN: 01

Yo, Miriam Belen Irazabal Gallegos egresado de la Facultad de **Farmacia y Bioquímica** y Escuela Académica Profesional de **Farmacia y Bioquímica** de la Universidad privada Norbert Wiener declaro que el trabajo de investigación **“Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* ATCC, Lima 2023.”** Asesorado por el docente: ...Dr. Collanque Pinto Jesús Daniel DNI 09401989 ORCID 0000-0003-2855-1632 tiene un índice de similitud de (12) (doce) % con código **oid: 14912:291107655** verificable en el reporte de originalidad del software Turnitin.

Así mismo:

1. Se ha mencionado todas las fuentes utilizadas, identificando correctamente las citas textuales o paráfrasis provenientes de otras fuentes.
2. No he utilizado ninguna otra fuente distinta de aquella señalada en el trabajo.
3. Se autoriza que el trabajo puede ser revisado en búsqueda de plagios.
4. El porcentaje señalado es el mismo que arrojó al momento de indexar, grabar o hacer el depósito en el turnitin de la universidad y,
5. Asumimos la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión en la información aportada, por lo cual nos sometemos a lo dispuesto en las normas del reglamento vigente de la universidad.



.....
Firma de autor 1
Miriam Belen Irazabal Gallegos
DNI: 74538103




.....
Firma de autor 2
Ana Vilma Julca Asenjo Egresado
DNI: 40151576....




.....
Firma
Dr. Collanque Pinto Jesús Daniel
DNI: 09401989

Lima, 2 de Octubre del 2024

 Universidad Norbert Wiener	DECLARACIÓN JURADA DE AUTORIA Y DE ORIGINALIDAD DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	
	CÓDIGO: UPNW-GRA-FOR-033	VERSIÓN: 01 REVISIÓN: 01

Es obligatorio utilizar adecuadamente los filtros y exclusión del turnitin: excluir las citas, la bibliografía y las fuentes que tengan menos de 1% de palabras. EN caso se utilice cualquier otro ajuste o filtros, debe ser debidamente justificado en el siguiente recuadro.

<hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/>

	DECLARACIÓN JURADA DE AUTORIA Y DE ORIGINALIDAD DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	
	CÓDIGO: UPNW-GRA-FOR-033	VERSIÓN: 01 REVISIÓN: 01

Yo, **JULCA ASENJO ANA VILMA** egresado de la Facultad de **Farmacología y Bioquímica** y Escuela Académica Profesional de **Farmacología y Bioquímica** de la Universidad privada Norbert Wiener declaro que el trabajo de investigación **“Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de la cáscara de Citrus reticulata (Mandarina) en cepas de Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Escherichia coli ATCC, Lima 2023”**

Asesorado por el docente: **Dr. Collanque Pinto Jesús Daniel DNI 09401989 ORCID 0000-0003-2855-1632** tiene un índice de similitud de (12) (DOCE) % con código **oid: 14912:291107655** verificable en el reporte de originalidad del software Turnitin.

Así mismo:

1. Se ha mencionado todas las fuentes utilizadas, identificando correctamente las citas textuales o paráfrasis provenientes de otras fuentes.
2. No he utilizado ninguna otra fuente distinta de aquella señalada en el trabajo.
3. Se autoriza que el trabajo puede ser revisado en búsqueda de plagios.
4. El porcentaje señalado es el mismo que arrojó al momento de indexar, grabar o hacer el depósito en el turnitin de la universidad y,
5. Asumimos la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión en la información aportada, por lo cual nos sometemos a lo dispuesto en las normas del reglamento vigente de la universidad.



.....
Firma de autor 1
Nombres y apellidos del Egresado
Ana Vilma Julca Asenjo

DNI: 40151576



.....
Firma de autor 2
Nombres y apellidos del Egresado
Mirian Belen Irazabal Gallegos

DNI: 74538103



.....
Firma del asesor
Nombres y apellidos del Asesor

Dr. Collanque Pinto Jesús Daniel

DNI: 09401989

Tesis

Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* ATCC, Lima 2023

Línea de investigación

Salud y bienestar

Asesor(a)

Dr. Collanque Pinto Jesús Daniel

Código Orcid: 0000-0003-2855-1632

Dedicatoria

Mostramos nuestra gratitud al Todopoderoso por guiar nuestros senderos en cada paso que hemos tomado diariamente, por resguardar y conceder vida y salud a nuestros progenitores, quienes constantemente nos brindaron su respaldo de manera incondicional.

Bach. Irazabal Gallegos Miriam

Bach. Julca Asenjo Ana Vilma

Agradecimiento

Agradecemos a Dios por concedernos vida, bienestar y permitirnos alcanzar el logro de nuestra educación profesional. Manifestamos nuestra gratitud hacia la Universidad Norbert Wiener por su aporte en nuestra formación académica, así como al Dr. Collanque Pinto Jesús Daniel, nuestro asesor de investigación, por su respaldo constante. También reconocemos a nuestros docentes por compartir sus saberes y experiencias. Queremos expresar nuestro agradecimiento a nuestros amigos por acompañarnos en este recorrido, y a todas las personas que nos respaldaron y colaboraron en hacer realidad este anhelo.

Bach. Irazabal Gallegos Miriam

Bach. Julca Asenjo Ana Vilma

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	III
ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA	3
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	6
1.2.1. Problema general	6
1.2.2. Problemas específicos.....	6
1.3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	7
1.3.1 Objetivo general.....	7
1.3.2 Objetivos específicos	7
1.4. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	8
1.4.1 Teórica	8
1.4.2 Metodológica	8
1.4.3 Práctica	8
1.5. LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN.....	9

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	10
2.1. ANTECEDENTES	10
2.2. BASES TEÓRICAS.....	14
2.2.1 Origen	14
2.2.2 Taxonomía	15
2.2.3 Descripción	15
2.2.4 Clasificación	16
2.2.5 Propiedades y usos medicinales.....	17
2.2.6 Extracto etanólico	17
2.2.7 Bacterias	17
2.2.8 Cepa	18
2.2.9 Staphylococcus aureus.....	18
2.2.10 Streptococcus pyogenes.....	19
2.2.11 Escherichia coli.....	19
2.2.12 Efecto antibacteriano	20
2.2.13 Agar Müller Hinton	20
2.2.14 Cepas de referencia.....	20
2.2.15 Levofloxacino	20
2.3 FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS	21
2.3.1 Hipótesis general	21
2.3.2 Hipótesis específicas.....	21
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	23

3.1. MÉTODO DE LA INVESTIGACIÓN	23
3.2. ENFOQUE INVESTIGATIVO.....	23
3.3. TIPO DE INVESTIGACIÓN	23
3.4. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	23
3.6. VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN	26
3.7. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	29
3.7.1. Técnica.....	29
3.7.2. Descripción de instrumentos.....	34
3.7.3. Validación.....	34
3.7.4. Confiabilidad	34
3.8. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS	35
3.9. ASPECTOS ÉTICOS.....	35
CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	36
4.1. RESULTADOS.....	36
4.1.1. Contrastación de la hipótesis general.	36
4.1.2. Contrastación de hipótesis específicas.....	40
4.1.3. Discusión de resultado	49
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	54
5.1. CONCLUSIONES	54
5.2. RECOMENDACIONES	55
REFERENCIAS.....	57

ANEXOS.....	65
ANEXO 1. MATRIZ DE CONSISTENCIA.....	61
ANEXO 2. INSTRUMENTO.....	63
ANEXO 3: VALIDEZ DEL INSTRUMENTO	65
ANEXO 4: PROGRAMA DE INTERVENCIÓN.....	74
ANEXO 5: INFORME DEL ASESOR DE TURNITIN.....	75
ANEXO 6: RESOLUCIÓN DE PROYECTO.....	76
ANEXO 7: INFORME DE ANÁLISIS DE LABORATORIO.....	77
ANEXO 8: CERTIFICADO DE AGAR MUELLER HINTON.....	79
ANEXO 9: CERTIFICADO SANGRE DE CARNERO ESTÉRIL.....	83
ANEXO 10: CERTIFICADO TAXONÓMICO <i>CITRUS RETICULATA</i> (MANDARINA).....	84
ANEXO 11: EVIDENCIAS FOTOGRÁFICAS	85
ANEXO 12: CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE CEPAS BACTERIANAS.....	98
ANEXO 13: CONSTANCIA DE AUTORIZACIÓN DE ANÁLISIS.....	101
ANEXO 14: PRUEBAS DE NORMALIDAD	102

Índice de tablas

Tabla 1. Promedio de los halos de inhibición) frente <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	37
Tabla 2. Promedio de halos de inhibición frente <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	38
Tabla 3. Promedio de halos de inhibición frente <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	39
Tabla 4. Prueba de solubilidad del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus reticulata</i> (mandarina).....	40
Tabla 5. Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus reticulata</i> (mandarina).....	41
Tabla 6. Comparaciones múltiples por T3 de Dunnett	42
Tabla 7. Subconjuntos frente <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	46
Tabla 8. Subconjuntos frente <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	47
Tabla 9. Subconjuntos frente <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	47
Tabla 10. Pruebas de normalidad.....	102
Tabla 11. Prueba de homogeneidad	105
Tabla 12. Prueba de Rangos de H de Kruskal-Wallis.....	106
Tabla 13. Pruebas de H de Kruskal-Wallis	107

Índice de figuras

Figura 1. <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina)	15
Figura 2. Recolección de la muestra	85
Figura 3. Recolección de la muestra	85
Figura 4. Recolección de la muestra	85
Figura 5. Muestra de tipo <i>Citrus reticulata</i> (mandarina).....	86
Figura 6. Selección de la muestra	86
Figura 7. Lavado de la muestra.....	86
Figura 8. Enjuague con agua destilada	87
Figura 9. Separación de la cáscara.....	87
Figura 10. Procedimiento de secado de la muestra.....	87
Figura 11. Procedimiento de molienda de la muestra.....	87
Figura 12. Preparación del macerado del extracto etanólico	88
Figura 13. Procedimiento de filtración del macerado del extracto etanólico	88
Figura 14. Obtención del extracto seco	89
Figura 15. Obtención del extracto seco	89
Figura 16. Añadiendo el extracto seco al tubo de ensayo para prueba de solubilidad	90

Figura 17. Resultado de la prueba de solubilidad	90
Figura 18. Adición del extracto seco a los tubos de ensayo	91
Figura 19. Resultado de la marcha fitoquímica	91
Figura 20. Pesando del Agar	92
Figura 21. Autoclave para el uso en la prueba microbiológica	92
Figura 22. Agar Mueller Hinton	93
Figura 23. Placas preparadas de Agar sangre y Agar Mueller Hinton	93
Figura 24. Placas con cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	93
Figura 25. Placas con <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615 en jarra Gaspack	94
Figura 26. Comparación de turbidez mediante el reactivo de Mc. Farland.....	94
Figura 27. Rotulado de placas.....	94
Figura 28. Sembrado de la cepa biológicas en las placas	95
Figura 29. Efectuando pozos en agar con ayuda de un sacabocado	95
Figura 30. Sustancias experimentales y controles	96
Figura 31. Incubación de las cepas	96
Figura 32. Lectura de resultados: <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	96
Figura 33. Lectura de resultados: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	97
Figura 34. Lectura de resultados: <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615.....	97
Figura 35. <i>Histograma según Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	102
Figura 36. Gráfico Q-Q según <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	103
Figura 37. <i>Histograma según Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	103

Figura 38. Gráfico Q-Q según <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	104
Figura 39. Histograma según <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	104
Figura 40. Gráfico Q-Q según <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	105

Resumen

Los índices de mortalidad para *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* ATCC han aumentado a nivel mundial, representando el 40%, 30% y 20% respectivamente, el presente trabajo tiene como **objetivo:** Analizar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (mandarina) en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* ATCC, Lima 2023. **Metodología:** Método hipotético deductivo, cuantitativo, experimental, de corte transversal, explicativo. La población fue 10 kilos del fruto de *Citrus reticulata* (mandarina) y la muestra fue 1 kilo de cascara de *Citrus reticulata* (mandarina). Se realizó la prueba de solubilidad, para determinar en qué solvente es soluble, marcha fitoquímica para determinar los metabolitos secundarios y para el efecto antibacteriano se empleó el método de Kirby Bauer, estuvo constituida por grupos al 25 %, 50 % y 75 % frente al Levofloxacino 5 µg (control positivo). **Resultados:** Las medias de los diámetros en concentraciones del 25%, 50% y 75% del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (mandarina) frente *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* ATCC fueron más bajos que los registrados por (Levofloxacino 5 µg). Se observaron diferencias

estadísticamente significativas entre los grupos de experimentación que representaban el 25%, 50% y 75% y el (DMSO). **Conclusión:** El extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (mandarina) presentó efecto antibacteriano en cepas de *Staphylococcus aureus* al 50% y 75%, en cepas de *Streptococcus pyogenes* en la concentración del 75% y para la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 no presentó efecto antibacteriano.

Palabras clave: Efecto antibacteriano, extracto etanólico, *Citrus reticulata*.

Abstract

Mortality rates for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* and *Escherichia coli* ATCC have increased worldwide, representing 40%, 30% and 20% respectively. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* and *Escherichia coli* ATCC, Lima 2023. **Methodology:** Hypothetical deductive, quantitative, experimental, cross-sectional, explanatory method. The population was 10 kilos of *Citrus reticulata* (tangerine) fruit and the sample was 1 kilo of *Citrus reticulata* (tangerine) peel. The solubility test was performed to determine in which solvent it is soluble, phytochemical march to determine the secondary metabolites and for the antibacterial effect the Kirby Bauer method was used, it was made up of groups at 25%, 50% and 75% against Levofloxacin 5 µg (positive control). **Results:** The mean diameters at concentrations of 25%, 50% and 75% of the ethanolic extract of the peel of *Citrus reticulata* (tangerine) against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* and *Escherichia coli* ATCC were lower than those recorded by (Levofloxacin 5 µg). Statistically significant differences were observed between the experimental groups representing 25%, 50% and 75% and the (DMSO). **Conclusion:** The ethanolic extract of the peel of *Citrus reticulata* (tangerine) showed antibacterial effect in 50% and 75% strains of

Staphylococcus aureus, in strains of *Streptococcus pyogenes* at the concentration of 75% and for the strain of *Escherichia coli* ATCC 25922 it did not present an antibacterial effect.

Key words: Antibacterial effect, ethanolic extract, *Citrus reticulata*.

Introducción

La finalidad del estudio “Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* ATCC, Lima 2023” es analizar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina), los índices de mortalidad de las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* ATCC han aumentado a nivel mundial, representando el 40%, 30% y 20% respectivamente. Esta situación plantea desafíos para la salud pública y la lucha contra enfermedades infecciosas (1).

En el capítulo I se desarrolla la realidad problemática y la formulación del problema: ¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (mandarina) en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* ATCC, Lima 2023?

El capítulo II tenemos al Marco teórico donde se realizó una descripción del *Citrus reticulata* (mandarina), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* ATCC, abarcando los antecedentes e hipótesis.

El capítulo III encontramos los aspectos metodológicos, el diseño, la población, la muestra y la técnica empleada en la investigación.

En el capítulo IV, se muestra de manera detallada los resultados y se lleva a cabo una discusión sobre el estudio.

Por último, en el capítulo V, se exponen las conclusiones y recomendaciones derivadas de la investigación, seguido de las referencias bibliográficas y los anexos correspondientes

CAPÍTULO I: EL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

Desafortunadamente, a lo largo de las últimas cinco décadas el *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli*, son microorganismos patógenos con gran importancia en el mundo y muchos de ellos son resistentes a los medicamentos. (1). La mayoría de las bacterias coexisten en simbiosis con los microorganismos presentes en el cuerpo humano. Sin embargo, debido a varias razones, como la inmunodepresión, algunas bacterias pueden causar enfermedades graves. Estas enfermedades están relacionadas con la producción de sustancias tóxicas. *Staphylococcus aureus* es una bacteria patógena y resistente que suele ingresar al cuerpo humano a través de una herida abierta o del tracto respiratorio. Una vez dentro del cuerpo, la bacteria puede ocultarse en células epiteliales, endoteliales y otras estructuras celulares (2).

La OMS reportó que *Staphylococcus aureus* es causa habitual de infecciones intrahospitalarias, muchas cepas son resistentes a la meticilina (MRSA); en los últimos años aumento la morbimortalidad en un 64% en comparación con las infecciones sensibles a los medicamentos (3). Además, aproximadamente 13.7 millones de fallecimientos ocasionados por distintas infecciones en todo el mundo, más de la mitad (7.7 millones), son causados por *Escherichia coli* (4), de igual manera se reportó que *Streptococcus pyogenes* manifestó una tasa de incidencia alta de infección (5).

A nivel internacional, una de las bacterias responsable de provocar aproximadamente más de 25,000 muertes cada año en el continente europeo es *Staphylococcus aureus*; la prevalencia de *Staphylococcus aureus* en Grecia, Malta, Chipre e Italia superó el 25% de su población. En África subsahariana se reportó que mueren 230 por cada 100 mil habitantes y en la República Centroafricana indicó un índice alto de mortalidad; Islandia presentó menor riesgo de mortalidad 35,7% (6). La incidencia en el continente asiático fue del 82,6% afectando primordialmente a niños (7). Oceanía reportó que anualmente por cada 100 mil habitantes, 108 se deben a este microorganismo (8).

En Estados Unidos, *Staphylococcus aureus* provoca aproximadamente 22,000 muertes cada año; además se reportó que la prevalencia de *Streptococcus pyogenes* fue del 21,6% en África subsahariana, mientras que en América del Norte y Europa la prevalencia fue del 5,5% y el 7,7%, respectivamente (9), además estos son una de las causas principales de consulta médica 71,8% (10). En el continente europeo, asiático, oceánico y africano, las enfermedades gastrointestinales constituyen una preocupante situación de salud pública, a causa de la existencia de microorganismos nocivos en el líquido vital y en los comestibles contaminados por *Escherichia coli*, lo cual plantea un desafío significativo en términos de salud pública. Estos microorganismos tienen origen fecal y pueden provocar la aparición de diversos trastornos gastrointestinales e infecciones del tracto urinario (ITU) (11).

En América Latina, las infecciones por *Staphylococcus aureus* representan un grave peligro debido a su rápida propagación y facilidad para desarrollar resistencia a los antibióticos, siendo el responsable del 40% al 60% de las infecciones respiratorias altas (12). Argentina reportó mayor índice de morbilidad causada por *Staphylococcus aureus* con 88%, Brasil presentó tasas

bajas de esta bacteria los cuales variaron entre 4.5% – 25% (13). México reportó que el 61,7% de su población presentó infecciones las cuales fueron causadas principalmente por *Staphylococcus aureus*; además se reportó que *Streptococcus pyogenes* afectó al 32,9% de adultos (14); de igual manera alrededor de 5 millones de personas en el país sufren de ITU, siendo la principal causante de esta enfermedad la bacteria *Escherichia coli* (15).

En el Perú, en la Región de Lambayeque, un estudio realizado reportó que el 28,6% padecían de infecciones por la bacteria *Staphylococcus aureus*, y era resistente a la Oxacilina y estas se asociaron a infecciones por *Streptococcus pyogenes* (16), debido al alto nivel de resistencia a los antibióticos. En el año 2008, se llevó a cabo una investigación en el Centro Médico de la localidad de Chachapoyas (Amazonas), donde se recolectaron 148 muestras de garganta y amígdalas de pacientes de diferentes edades. Se encontró que el 0,9% de los casos aislados fueron *Streptococcus pyogenes*. Se determinó que esta cepa era sensible a la bacitracina (20 mm) y resistencia al clotrimoxazol (17).

A nivel local, una investigación realizada en Lima, llevado a cabo en distintos hospitales de la ciudad, determinó que el 19,69% de infantes presentaron infecciones debido a la bacteria de *Staphylococcus aureus*, además se observó porcentajes significativos los cuales evidenciaron resistencia antibiótica (18). Por otro lado, en el centro médico Cayetano Heredia de Lima se llevó a cabo un estudio en el año 2020 donde se constató que la mitad de los casos analizados presentaban resistencia a la meticilina (MRSA), principalmente en muestras sanguíneas (27,3%) y secreciones bronquiales (36,4%) (19). En Lima Metropolitana, se evidenció *Escherichia coli* en un 12,3% de las 407 muestras de alimentos. De las muestras de alimentos, se encontró la presencia

de la bacteria en 23 de las 102 muestras de carne molida, en 15 de las muestras de carne entera, en 8 de las 102 muestras de queso fresco y en 2 de las 101 muestras de verduras frescas (20).

La resistencia microbiana es un desafío significativo en términos de salud pública, dado que invalida la efectividad de la terapia antimicrobiana exacerba las condiciones de los pacientes y elevando de esa manera la tasa de morbilidad de la población, motivo por el cual es importante encontrar alternativas a los antibióticos, que sean efectivos en la terapia y que no fomenten la resistencia bacteriana; entre ellos. La cascara de *Citrus reticulata* (Mandarina) debido a los usos tradicionales que posee para contrarrestar las infecciones. Normalmente la población desecha la cáscaras de mandarina en vertederos por lo que genera contaminación al medio ambiente aproximadamente en un 30% a nivel mundial (21). Nuestra investigación busca dar un buen uso a la cascara y demostrar su efecto antibacteriano.

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema general

- ¿Cuál será el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* ATCC Lima 2023?

1.2.2. Problemas específicos

- ¿Cuál será la afinidad química del extracto etanólico de cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) mediante la prueba de solubilidad?
- ¿Cuáles serán los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) mediante la marcha fitoquímica?

- ¿Cuál será el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* ATCC, en la concentración del 25%, 50% y 75%?
- ¿Cómo será la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) a diferentes concentraciones y el fármaco de referencia, frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* ATCC?

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

- Analizar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* ATCC, Lima 2023.

1.3.2 Objetivos específicos

- Identificar la afinidad química del extracto etanólico de cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) sobre los solventes mediante la prueba de solubilidad.
- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) mediante la marcha fitoquímica.
- Determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* ATCC, en las concentraciones del 25%, 50% y 75%.

- Comparar la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) a diferentes concentraciones y el fármaco de referencia, frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* ATCC.

1.4. Justificación de la investigación

1.4.1 Teórica

Se profundizó y actualizó la comprensión acerca el efecto antibacteriano de *Citrus reticulata* (Mandarina), ya que, tiene propiedades antibacterianas, no obstante, hay una escasez de investigaciones científicas que lo respalden. Además, no hay suficientes estudios para determinar las concentraciones y dosis necesarias para lograr la actividad antibacteriana en el país, es así como se justifica a nivel teórico el aporte de una nueva opción de terapia natural el extracto etanólico de las cascaras de *Citrus reticulata* (Mandarina) en el tratamiento de infecciones provocadas por cepas bacterias.

1.4.2 Metodológica

A nivel metodológico se usó técnicas validadas como el método de difusión en agar, y técnicas fitoquímicas para el reconocimiento de compuestos fitoquímicos responsables de la actividad antibacteriana.

1.4.3 Práctica

La investigación también hace una contribución práctica al campo de la salud, al presentar un tratamiento alternativo ante la resistencia microbiana y la urgencia de nuevos medicamentos con atributos antimicrobianos para abordar las infecciones bacterianas.

1.5. Limitaciones de la investigación

Consistió en no incluir cepas bacterianas clínicamente relevantes. Al restringirse únicamente a cepas en estudio, existe riesgo de no abarcar la diversidad y resistencia de las bacterias presentes en entornos clínicos reales. Esta situación podría limitar la aplicabilidad de los descubrimientos en el contexto de enfermedades infecciosas y el desarrollo de terapias antibacterianas eficaces.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Luque y Mendiguete (22) En el año 2021 tuvieron el objetivo de “Determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de cáscara de *Citrus limetta* Risso (Lima) sobre *Staphylococcus aureus*”. Su metodología fue de tipo básico, prospectivo y experimental, empleando la técnica de discos en agar. Se evaluaron diferentes tratamientos, incluyendo el etanol al 96% como control negativo; ciprofloxacino y extracto de *Citrus limetta* Risso del 100%, 50% y 25%. Los resultados obtenidos indicaron que al 100%, el extracto de *Citrus limetta* Risso presentó una mejor actividad antibacteriana en comparación con las diferentes concentraciones. En conclusión, se puede afirmar que las cáscaras de *Citrus limetta* Risso poseen actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* a causa de la existencia de compuestos secundarios detectados.

Espinoza y Huiñac (23) En el año 2021 su objetivo fue “Analizar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus x Limon* (Limón) contra la cepa de *Cutibacterium acnes* ATCC 6919” mediante una metodología cuantitativa y diseño observacional transversal. La técnica utilizada fue la de Kirby Bauer, en la que se evaluó la actividad del extracto en cuatro concentraciones distintas: 25%, 50%, 75% y 100%. Los hallazgos revelaron que la muestra demostró acción antimicrobiana en dosis del 75% y 100%, con 16,31 mm y 47,96 mm,

respectivamente, frente a la bacteria. Concluyendo, que la solución etanólica obtenida de la cáscara a concentraciones del 75% y 100% exhibe una notable capacidad antibacteriana contra la cepa de *Cutibacterium acnes* ATCC 6919.

Tam (24) En el año 2015 su objetivo fue “Evaluar la actividad inhibitoria del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limon* contra *Staphylococcus aureus* meticilino resistente” El enfoque metodológico utilizado fue hipotético, cuantitativo y experimental, y se prepararon cuatro concentraciones del extracto etanólico (5%, 25%, 50% y 75%). Los hallazgos revelaron efecto de inhibición en todas las dosis analizadas, aunque al contrastar los radios de inhibición, se observó que la capacidad inhibitoria del extracto fue considerablemente menor en comparación con la vancomicina. En conclusión, que el extracto de *Citrus limon* presentó actividad antibacteriana.

Sakya *et al.* (25) En el año 2019 tuvieron el objetivo de “Comparar la actividad antibacteriana de los extractos de cáscara y jugo de cítricos”. Se empleó una metodología de tipo experimental. Los resultados obtenidos demostraron que los extractos de *Citrus aurantifolia* (lima) y *Citrus limon* (limón) fueron más efectivos contra bacterias que sus extractos de cáscara, presentando una zona máxima de inhibición de 26.66 ± 1.15 y 20 ± 1 , respectivamente, contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Como conclusión, se afirmó que tanto los extractos de jugo como de cáscara de cítricos poseen funciones antibacterianas que pueden resultar beneficiosas en la prevención del crecimiento bacteriano no deseado.

Mohammad (26) En el año 2020 su objetivo fue “Establecer las actividades antimicrobianas de *Citrus sinensis* contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*”. La metodología utilizada fue un estudio experimental e hipotético. Los resultados demostraron que el

extracto de *Citrus sinensis* tuvo una alta capacidad para inhibir la formación de biopelículas mediante la adición de concentraciones subinhibitorias para MRSA y BLEE, respectivamente. En cuanto a ESBL, 12 (60%) de los aislamientos resultaron positivos confirmados y el 45% de *Staphylococcus aureus* mostró actividad MRSA. En conclusión, los extractos de *Citrus sinensis* presentaron actividad antimicrobiana, lo que sugiere que estos metabolitos podrían tener un papel importante como agentes antimicrobianos contra los microorganismos estudiados.

Ehigbai *et al.* (27) En el año 2020 tuvieron el objetivo de “Realizar análisis fitoquímicos cuantitativos y actividades antimicrobianas de productos frescos y secos de extractos etanólicos de *Citrus sinensis* Cáscaras de (naranja dulce)”. La metodología empleada fue un estudio experimental, cuantitativo. Los hallazgos manifestaron que el extracto de cáscara fresca presentó mejores actividades antibacterianas contra todas las cepas bacterianas estudiadas en comparación con el extracto de cáscara seca. Concluyendo que el extracto contiene más fenoles y posee mejores actividades antimicrobianas contra las cepas microbianas estudiadas en comparación con el extracto de cáscara seca.

Hassan *et al.* (28) En el año 2020 tuvieron el objetivo de “Evaluar la actividad antibacteriana del extracto de naranja dulce *Citrus sinensis* en bacterias seleccionadas”. Para ello, se empleó una metodología experimental básica. Los resultados obtenidos demostraron que existieron diferencias significativas entre ambos extractos. El extracto de etanoato de etilo presentó una concentración inhibitoria mínima de 300 mg/ml en *Escherichia coli* ($31,5 \pm 0,5$ mm) y en *Staphylococcus aureus* ($22 \pm 0,0$ mm), mientras que el extracto de etanol a 100 mg/ml mostró una zona de inhibición de $23,5 \pm 1,5$ mm en *Escherichia coli* y de $12,5 \pm 2,5$ mm en *Staphylococcus aureus* a 300 mg/ml y 200 mg/ml. Por otro lado, se observó que las zonas de inhibición exhibidas

por la estreptomicina fueron para *Neisseria gonorrhoeae* y *Escherichia coli* de 14 a 24 mm, mientras que el ciprofloxacino varió de 15 a 21 mm en *Staphylococcus aureus*. En conclusión, se determinó que el extracto de etanoato de etilo fue más efectivo que el extracto de etanol y el control positivo.

Wenling *et al.* (29) En el año 2022 tuvieron el objetivo de “Determinar el análisis del metaboloma de las cáscaras de *Citrus sinensis* y *Citrus reticulata*”. El método empleado fue cualitativo, experimental; cultivos bacterianos se prepararon mediante el método de recubrimiento del paladar, se colocaron discos de papel de filtro estériles. La muestra empleada fue 500 gramos de cada cascara (*Citrus sinensis* y *Citrus reticulata*) de eliminándose el albedo. Los resultados manifestaron que *Citrus reticulata* mostró una mayor diversidad de compuestos que *Citrus sinensis*. Los extractos de ambas cáscaras mostraron efectos antibacterianos contra, *Staphylococcus aureus*. Concluyendo que los extractos de cáscara de *Citrus reticulata* y *Citrus sinensis* mostraron efectos antibacterianos similares contra *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, mientras que los extractos de cáscara de *Citrus sinensis* fueron más efectivos contra *Staphylococcus aureus*.

Ali *et al.* (30) En el año 2017 tuvieron el objetivo de “Determinar la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de cáscara de *Citrus Limon* (Familia-*Rutaceae*)”. La metodología fue cuantitativo, experimental, analizando la planta contra dos cepas bacterianas utilizando el método de difusión en pocillos. Los resultados indicaron que el extracto metanólico de la cáscara de *Citrus Limon* contiene una alta presencia de fitoquímicos, como alcaloides, saponina, flavonoides, carbohidratos, glucósidos y ácidos cítricos y taninos. En conclusión, la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de la planta fue significativa contra todos los

organismos probados, incluyendo una cepa Gram positiva (*Staphylococcus aureus*), una cepa Gram negativa (*Escherichia coli*) y una cepa fúngica (*Candida albicans*).

Hassan *et al.* (31) En el año 2022 tuvieron el objetivo de “Evaluar la actividad antibacteriana de extractos metanólicos de cáscaras de varios frutos cítricos contra *Bacillus spp.* y *Escherichia coli*. Metodología: Se usó el método de difusión en disco. Los resultados revelaron que el extracto metanólico de cáscara tuvo la actividad antibacteriana. Conclusiones: Los cítricos pueden ser explotados como ingredientes antibacterianos y antioxidantes en alimentos y nutracéuticos, según los hallazgos de este estudio. Los extractos metanólicos de cáscaras de frutas cítricas pueden ser una fuente potencial de agentes antibacterianos para combatir enfermedades.

2.2. Bases teóricas

***Citrus reticulata* (Mandarina)**

2.2.1 Origen

Una fruta con los nombres populares de naranjas, mandarinas, toronjas, limones, limas, cidras y pomelos pertenece a menudo al género botánico conocido como citrus, que tiene características muy particulares. Como consecuencia de la selección natural y de las hibridaciones que han ocurrido de forma espontánea o como resultado de la intervención humana, han sufrido diversas alteraciones desde sus inicios hasta la actualidad. Los cítricos se introdujeron por primera vez en otras partes del mundo como resultado de extensas migraciones, y hoy en día la producción se está extendiendo a prácticamente todas las regiones tropicales y subtropicales (32).

2.2.2 Taxonomía

Alrededor de 150 géneros y 900 especies componen la familia Rutáceas, que habita principalmente en América del Sur y Australia e incluye arbustos y árboles en climas tropicales y templados (33). Asimismo, de género *Citrus* y Especie *Reticulata*.

Figura 1. *Citrus reticulata* (Mandarina)



Nota: Guohong A et al. Genomics of the origin and evolution of Citrus

2.2.3 Descripción

Es un arbusto que tiene características semejantes a las del naranjo, pero es más delicado y de menor tamaño. El género más significativo de la familia de los cítricos, donde se encuentra esta fruta, son ricos en vitamina C, flavonoides y aceites esenciales. Son únicos porque están alojados en varias vesículas a lo largo de sus entrañas. La mandarina es una de las frutas más

adoradas por su diminuto tamaño, sabor y aroma, así como por la facilidad con la que se puede quitar la piel (33).

2.2.4 Clasificación

Mandarino Satsuma: Se dice que estas mandarinas, que constituyen el mayor porcentaje de cultivos en España y Japón, son de origen japonés. Destacan entre otros grupos de mandarinas porque son las que más soportan las bajas temperaturas. Debido a la falta de semillas, las mandarinas son utilizadas en la industria de enlatados en almíbar, siendo Japón y España los mayores exportadores a nivel mundial. En comparación con otros tipos de mandarinas, estas frutas maduran más temprano y pierden parte de su acidez, lo que las hace menos atractivas. *Mandarinos Comunes*: Se incluyen en esta categoría aquellos con herencia mediterránea y con un enfoque de consumo familiar. Tienen fuertes cualidades organolépticas, semillas y mala conservación, por lo que no tienen mucha demanda en el mercado mundial, pero son muy consumidas en muchos mercados locales. *Otros mandarinos*: Aquellos que son el resultado de cruces de especies entran en esta categoría.

Los híbridos de mandarina son los más importantes debido a que su cáscara suele estar más firmemente adherida a la pulpa. Dentro de este grupo, algunas subcategorías tienen relevancia económica, como es el caso de la mandarina Ortanique. En Ecuador, las mandarinas se cultivan a una temperatura adecuada de entre 14 y 24 grados centígrados. Entre los principales tipos cultivados se encuentran Ponkan, Satsuma temprano y normal, Dancy, King y Malvasio. La producción de la variedad común de mandarina, que es típica de las regiones tropicales de Ecuador y crece en lugares entre los 2200 m.s.n.m., es posible gracias a una combinación de factores como el clima, la altitud y la incidencia solar (33).

2.2.5 Propiedades y usos medicinales

Las mandarinas son una fruta de bajo contenido calórico que contienen una cantidad significativa de fibra, potasio y vitamina C, un antioxidante que es esencial para el crecimiento de colágeno. Adicionalmente, la vitamina C contribuye en la asimilación del mineral de hierro y disminuye la existencia de compuestos nitrosados, sustancias que pueden ser cancerígenas y disminuyen el riesgo de cáncer, y mejora la función inmunológica. Otras vitaminas presentes en las mandarinas incluyen ácido fólico, que es importante para un embarazo saludable, y provitamina A, que se convierte en vitamina A en el cuerpo, necesaria para la salud de la piel, cabello, huesos, sistema inmunológico y vista. Los carotenoides producidos por la vitamina A tienen propiedades anticancerígenas y reducen las enfermedades cardiovasculares. El ácido cítrico en las mandarinas tiene propiedades antisépticas y potencia los efectos de la vitamina C, mientras que el ácido fólico es importante para la síntesis del genoma y el aumento de las defensas. La producción y transmisión de impulsos nerviosos, el correcto funcionamiento de los músculos y el mantenimiento del equilibrio hídrico tanto dentro como fuera de las células dependen del potasio. Otros componentes que se encuentran en las mandarinas, incluidos los fitoquímicos D-limoneno, cumarina, flavonoides y terpenos, también son anticancerígenos (34).

2.2.6 Extracto etanólico

El término "extracto etanólico" se refiere a una solución con un olor específico hecha de material vegetal deshidratado por maceración con solventes alcohólicos (35).

2.2.7 Bacterias

Las bacterias unicelulares vienen en una variedad de geometrías, incluidas esferas, varillas y espirales. Son criaturas microscópicas que pueden variar en tamaño de 0,5 a 5 micras. Carecen

de núcleo y orgánulos internos, ya que, son procariotas. Suelen tener una pared celular basada en peptidoglucano y muchos de ellos presentan flagelos u otros tipos de estructuras móviles (36).

2.2.8 Cepa

La identificación de una cepa bacteriana se basa en la determinación de características genotípicas o fenotípicas específicas de la misma y su comparación con los diferentes taxones de su clasificación. El número y método de determinación dependerá principalmente del tipo de bacteria y del propósito buscado en la identificación. Las cepas bacterianas pueden diferir en su capacidad para causar enfermedades, su resistencia a los antibióticos, su tolerancia a diferentes condiciones ambientales, su producción de enzimas y toxinas, entre otros rasgos. Debido a estas diferencias, las cepas bacterianas pueden ser útiles en la investigación médica y en la producción de medicamentos y vacunas. Además, la identificación y caracterización de las cepas bacterianas es importante para el diagnóstico y tratamiento de las infecciones bacterianas (36).

2.2.9 *Staphylococcus aureus*

Las bacterias *Staphylococcus aureus* grampositivas tienen un diámetro de entre 0,5 y 1,5 micras. Se separan en racimos que se asemejan a racimos de uva, lo que facilita su identificación. En la actualidad existen 35 especies reconocidas y 17 subespecies en el género *Staphylococcus*. Gracias a su facilidad de transmisión de una especie a otra o entre miembros de la misma especie, este género tiene un potencial de adaptación que tiende a influir en todas las especies de mamíferos (17). La resistencia ha evolucionado desde el uso de la penicilina. La transferencia de resistencia por plásmidos ha llevado a la propagación de la resistencia a penicilina en más del 90% de las cepas. Aunque la aparición de nuevas penicilinas y cefalosporinas parecía ser una solución, las

cepas resistentes a la meticilina se volvieron cada vez más comunes, y también se asociaron con la resistencia a otros antibióticos. Esto se debe a la adquisición de fragmentos de ADN que alteran las PBPs. La resistencia puede aparecer en casi el 20% de los aislados (37).

2.2.10 Streptococcus pyogenes

Streptococcus pyogenes, también conocido como *Streptococo beta-hemolítico* del grupo A, provoca faringitis, infecciones dérmicas y de tejidos blandos, neumonía, sepsis y fiebre reumática. Es altamente contagioso y se transmite por contacto directo. El tratamiento incluye antibióticos y medidas preventivas. *Streptococcus pyogenes* es el agente principal de faringoamigdalitis bacteriana y también está implicado en infecciones cutáneas y de tejidos blandos. Hasta el momento, no se ha observado resistencia a la penicilina, que sigue siendo el tratamiento preferido. Sin embargo, se han descrito resistencias a otros antibióticos como sulfamidas, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos y lincosamidas (38).

2.2.11 Escherichia coli

Escherichia coli es un tipo de bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, que tiene forma de bastón o bacilo y es clasificada como gramnegativa. Esta bacteria se encuentra naturalmente en el intestino humano, es parte del microbiota normal, y también se puede encontrar en la sangre de ciertos animales. La capacidad patógena de *Escherichia coli* se debe a la presencia de fimbrias y endotoxinas en su estructura. Esta bacteria está asociada con trastornos intestinales y urinarios, así como con infecciones adquiridas en entornos hospitalarios debido a su transmisión a través de la vía fecal-oral o por contacto con manos contaminadas (20).

2.2.12 Efecto antibacteriano

Hay dos categorías de productos: los esterilizadores y los bacteriostáticos. Los esterilizadores matan los gérmenes, mientras que los bacteriostáticos detienen el crecimiento y la reproducción de las bacterias sin realmente eliminar los gérmenes (36).

2.2.13 Agar Müller Hinton

Se utiliza el procedimiento de difusión con discos normalizados para analizar la capacidad de las variedades bacterianas de responder a los agentes antimicrobianos. Este método sigue las directrices establecidas por (EUCAST), organismos responsables de fijar pautas y protocolos para la evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana. Se emplea para evaluar la reacción de las cepas bacterianas aisladas de muestras clínicas de organismos aerobios de rápido desarrollo (40).

2.2.14 Cepas de referencia

Los cultivos de referencia son muestras de microorganismos preservados y distribuidos por colecciones de cultivos. Debido a que el material de referencia es un organismo vivo, es esencial que el laboratorio lo manipule y conserve adecuadamente para asegurar su integridad y preservación (41).

2.2.15 Levofloxacin

Es un fármaco antimicrobiano que actúa inhibiendo la actividad de la enzima ADN girasa y la topoisomerasa IV en el complejo de ADN-ADN. La eficacia del levofloxacin como sustancia bactericida está condicionada por la conexión entre la cantidad máxima presente en la sangre ($C_{m\acute{a}x}$) o el espacio bajo la gráfica (AUC) y la cantidad mínima requerida para inhibir el crecimiento (CMI). La resistencia a este fármaco se obtiene de manera progresiva mediante

modificaciones en las zonas de actividad de la enzima topoisomerasa II (ADN girasa) y la topoisomerasa IV (42).

2.3 Formulación de hipótesis

2.3.1 Hipótesis general

- H1: El extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) presenta efecto antibacteriano in vitro en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* ATCC, Lima 2023.
- H0: El extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) no presenta efecto antibacteriano in vitro en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* ATCC, Lima 2023.

2.3.2 Hipótesis específicas

- El extracto etanólico de cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) tiene afinidad química sobre los solventes mediante la prueba de solubilidad.
- Existen metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) responsables de efecto antibacteriano mediante la marcha fitoquímica
- El extracto etanólico de cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) tiene efecto antibacteriano in vitro sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* ATCC en la concentración del 25%, 50% y 75%.
- El extracto etanólico de cáscara de *citrus reticulata* (Mandarina) presenta mayor efecto antibacteriano sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* ATCC en comparación con fármacos de referencia.

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1. Método de la investigación

Es hipotético-deductivo dado que inicia con la observación y formulación de una hipótesis, seguido por la verificación de la misma. (43)

3.2. Enfoque investigativo

Cuantitativo, ya que se centra en recopilar y analizar datos numéricos sobre variables y examinar las características y eventos cuantificables (43).

3.3. Tipo de investigación

Aplicada, dado que toda investigación aplicada necesita una base teórica, pero su interés radica en los resultados prácticos (44).

3.4. Diseño de la investigación

Experimental dado que se intervino en la variable independiente que es el Extracto etanólico de cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) para analizar su efecto en la variable dependiente que es el Efecto antibacteriano (45).

Corte transversal porque se tomó una muestra en un momento determinado, sin seguir su evolución en el tiempo. (44).

El nivel de la investigación fue explicativo: ya que tuvo como objetivo establecer las relaciones causa-efecto. A través de la prueba de hipótesis (46).

3.5. Población, muestra y muestreo

Población:

Los 10 kg del fruto de *Citrus reticulata* (Mandarina) que fue originaria del “Mercado Mayorista de frutas” del puesto N° 312 “La Victoria- Lima”.

Criterios de inclusión:

- Cáscaras en buen estado de *Citrus reticulata* (Mandarina).
- Frutos maduros.

Criterios de exclusión:

- Frutos en mal estado (deteriorados).
- Tallos y raíces de *Citrus reticulata* (Mandarina).

Muestra:

La muestra fue 1 kg de la cáscara obtenida de 10 k del fruto de *Citrus reticulata* (Mandarina).

Muestreo:

La cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina), se tomó del “Mercado Mayorista de frutas” del puesto N° 312 “La Victoria- Lima”, para realizar el extracto etanólico.

$$n = \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2 S^2}{d^2}$$

Donde:

n = tamaño de la muestra

$Z\alpha = 1,96$ Valor de la distribución normal corresponde al error tipo I (α) del 5%

$Z\beta = 1,28$ Valor de la distribución normal corresponde al error tipo II (β) del 10%

S = Es la desviación estándar de la variable en estudio (se obtiene de una muestra piloto o de algún antecedente)

d = Es el margen de error permisible (precisión). Establecido por el investigador.

$$n = \frac{2(1.96 + 1.28)^2 1.154^2}{1.50^2} = 12.4 = 12 \text{ placas por cepa bacteriana.}$$

Se tomó como antecedente para los datos de la (S) desviación estándar, la investigación de Shakya et al (2019)(47).

3.6. Variables y operacionalización

Variable 1: Extracto etanólico de cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina)

Definición operacional: Se realizó los análisis mediante el uso de diferentes solventes y reactivos para la determinación de los metabolitos secundarios en el extracto de cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina).

Matriz operacional de la variable 1

Dimensiones	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Escala de medición	Escala valorativa (niveles o rangos)
Pruebas de solubilidad	Fracción líquida extraída de cáscara de <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina) mediante maceración para el análisis de solubilidad y marcha fitoquímica	Se realizó los análisis mediante el uso de diferentes solventes y reactivos para la determinación de los metabolitos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Éter de petróleo ▪ Diclorometano ▪ Cloroformo ▪ Butanol ▪ Etanol 96° ▪ Metanol ▪ Agua destilada ▪ Dimetil sulfoxido 	Ordinal	(-) Insoluble (+) Poco soluble (++) Medianamente soluble (+++) Muy soluble

<p>Marcha Fitoquímica</p>		<p>secundarios en el extracto de cáscara de <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Antraquinonas ▪ Compuestos fenólicos ▪ Terpenos y esteroides ▪ Alcaloides ▪ Lactonas α, β- insaturadas ▪ Taninos ▪ Antocianinas ▪ Azúcares reductores ▪ Saponinas ▪ Flavonoides 	<p>Ordinal</p>	<p>(-) Ausente (+) Mínima (++) Mediana (+++)+Abundante presencia</p>
-------------------------------	--	--	---	----------------	--

Variable 2: Efecto antibacteriano in vitro en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* ATCC.

Definición operacional: Se inoculó las cepas bacterianas de referencia en placas Petri y luego se procedió a la medición de los halos de inhibición identificando la sensibilidad o resistencia de la cepa biológica sobre la especie vegetal.

Matriz operacional de la variable 2

Dimensión	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Escala de medición	Escala Valorativa (niveles o rangos)
Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Escherichia coli</i> .	Es la habilidad de una sustancia para detener y/o erradicar el desarrollo de una bacteria a través de análisis microbiológicos aplicados a diversos conjuntos de variedades bacterianas.(48)	Se inoculó las cepas bacterianas de referencia en placas Petri y luego se procedió a la medición de los halos de inhibición identificando la sensibilidad o resistencia de la cepa biológica	Concentraciones al 25%,50% 75%	Nominal	<ul style="list-style-type: none"> • Nulo: <8mm • Sensible: 8 – 14 mm • Muy sensible:14 – 20mm: • Sumamente sensible: >20 mm

		sobre la especie vegetal.	Control positivo: levofloxacino.	Nominal	- <i>Staphylococcus Aureus</i> : 25-30mm - <i>Echerichia Coli</i> : 29-37mm - <i>Streptococcus Pyogenes</i> : 13-17mm
--	--	---------------------------	----------------------------------	---------	---

3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.7.1. Técnica

Consistió en la observación, en la cual se prestó atención a un fenómeno, evento o situación y se recopiló información para su posterior análisis (43).

3.7.1.1. Recolección de la muestra vegetal

El fruto *Citrus reticulata* (*Mandarina*) se obtuvo del Mercado Mayorista de frutas del puesto N° 312 “La Victoria- Lima”, las muestras fueron llevadas al laboratorio de las instalaciones del Laboratorio Biológico y Análisis Clínico Santa Rosa E.I.R.L. Así mismo a la muestra se le realizó su clasificación taxonómica.

3.7.1.2. Preparación de la muestra vegetal

Se seleccionó frutas en condiciones óptimas, libres de daños provocados por hongos o insectos. Posteriormente, se lavó con agua destilada y solución de NaClO 0,5%. Luego de secarlos, se peló y se cortó en pedazos para luego colocarlos sobre papel Kraft y someterlos a un proceso de deshidratación en una estufa a 40°C durante 48 horas.

Pulverización y almacenamiento: Se molió la piel de la mandarina en un mortero hasta lograr un polvo uniforme, el cual se guardó en un recipiente de vidrio de color ámbar.

3.7.1.3. Preparación del extracto etanólico

Se empleó un envase de vidrio color ámbar para depositar 200 gramos de cáscara de mandarina seca y triturada. Posteriormente, se adicionó etanol de 70° hasta cubrir la muestra 2 centímetros por encima. La mezcla se dejó macerar durante 5 días dentro de un entorno oscuro y seco, con agitación continua.

3.7.1.4. Preparación de un extracto seco

Una vez culminado el proceso de maceración, se procedió a filtrar el macerado con la finalidad de separar la cáscara de mandarina del extracto líquido, para ello se empleó papel filtro Whatman N°1, luego se concentró la muestra para la obtención del extracto seco.

3.7.1.5. Análisis de solubilidad

Se introdujo 1 mL de extracto seco en una serie de tubos de ensayo y a continuación se adicionó a cada uno 1 mL de diferentes solventes con propiedades apolares y polares.

3.7.1.6. Marcha fitoquímica del extracto

Implica una serie de pruebas de coloración y precipitación, donde se empleó 1 mL de solución etanólica obtenida de las cáscaras de *Citrus reticulata* (Mandarina) en cada uno de los 14 tubos de ensayo, seguido se adicionó 1ml de cada reactivo, para realizar el análisis fitoquímico. Se siguió el protocolo establecido por la Dra. Olga Lock.

3.7.1.7. Análisis antibacteriano por el método de difusión en agar - Kirby Bauer modificado en pozo.

Preparación de agar Mueller Hinton: Se pesó 18.24 gramos del agar y se añadió 480 mL de agua destilada. Se calentó el medio agitándolo para favorecer su completa disolución. Posteriormente se transfirió a una autoclave para lograr su esterilización a una temperatura de 121 °C por un lapso de 15 min. Una vez retirado el medio de cultivo de la autoclave, se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura entre 45 a 50 °C. Luego, se procedió a distribuir sobre placas petri estériles.

Preparación de agar Mueller Hinton con 5% de Sangre de Carnero: Se pesó 9.12 gramos del agar deshidratado y se añadió 240 ml de agua destilada. Se calentó el medio agitándolo para favorecer su completa disolución. Posteriormente se transfirió a una autoclave para lograr su esterilización a una temperatura de 121°C por un lapso de 15 minutos. Una vez retirado el medio de cultivo de la autoclave, se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura de 50 °C, en este

momento se adicionó un 5% de sangre de carnero estéril, se homogenizó y distribuyó en placas petri estériles.

Activación de las cepas de referencia: En el estudio se empleó *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* ATCC, las cuales fueron activadas a partir de su forma liofilizada. Estos microorganismos liofilizados fueron puestos en contacto con el líquido de hidratación proporcionado por el fabricante y utilizando el hisopo incorporado en el Kwik Stik se estrió sobre placas de agar nutritivo las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.; *Streptococcus pyogenes* fue estriado sobre una placa de agar sangre. Posteriormente, las cepas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas, solo *Streptococcus pyogenes* fue incubado en medio anaerobio a la misma temperatura y tiempo que las anteriores.

Preparación del estándar 0,5 de McFarland: La preparación del reactivo de McFarland implica el diseño de una solución estandarizada de turbidez utilizada en microbiología para ajustar la densidad celular de las suspensiones microbianas. Para lograr esto, se disuelven cristales de sulfato de bario en una mezcla de ácido sulfúrico y cloruro de sodio. Este proceso resulta en una solución con una turbidez específica, medida en unidades de McFarland. La solución de McFarland actúa como un estándar visual para evaluar la densidad celular mediante la comparación de la turbidez de la suspensión microbiana con la del estándar. Este método es fundamental para estandarizar la concentración de microorganismos antes de realizar pruebas microbiológicas, como las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, garantizando así resultados precisos y comparables en los estudios microbiológicos. La precisión en la preparación de este reactivo es esencial para mantener la reproducibilidad de los resultados en el ámbito de la microbiología clínica y de laboratorio.

Preparación del Inoculo: Se tomó con un asa de siembra estéril dos a tres colonias de una de las placas donde se activaron anteriormente las cepas; estas colonias se colocaron dentro de un tubo estéril con suero fisiológico y se homogenizó obteniendo una suspensión en la que se observa turbidez. Por último, se procedió a ajustar la turbidez comparándola con el patrón 0.5 de la escala de McFarland. Este procedimiento se repitió para cada una de las cepas.

Inoculación de las placas: Teniendo el inóculo ya preparado y con ayuda de un hisopo estéril se procedió a realizar la siembra de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* sobre placas de agar Müller-Hinton. *Streptococcus pyogenes* fue sembrado sobre placas de agar Muller Hinton sangre de carnero.

Elaboración de pozos: Una vez inoculadas las placas, se realizaron los pozos para cada una de las diferentes concentraciones. Los pozos se realizaron perforando el medio de cultivo con ayuda de un sacabocado estéril de 6 mm de diámetro.

Preparación de las concentraciones de solución con extracto seco de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina): Para la investigación, se tomó muestras de extracto seco en cantidades de 2.5 g, 5 g y 7.5 g para cada nivel de concentración del 25%, 50% y 75%. Estas muestras fueron disueltas en dimetilsulfoxido (DMSO). Después, se llenó a una fiola de 10 mL con la mezcla, hasta aforar su límite correspondiente.

- ✓ Grupo ext. etanólico de cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) 25 %
- ✓ Grupo ext. etanólico de cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) 50 %.
- ✓ Grupo ext. etanólico de cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) 75 %
- ✓ Grupo levofloxacino 5 µg.

- ✓ Grupo Dimetilsulfoxido (DMSO).

Posteriormente se adicionaron, con ayuda de una micropipeta, 20 ul de cada una de las sustancias experimentales a cada uno de los pozos realizados.

Las placas fueron colocadas dentro de una incubadora a una temperatura de 37°C durante un lapso de 24 horas. *Streptococcus pyogenes* fue incubado en condiciones anaerobias a la misma temperatura y tiempo que las otras dos bacterias. Finalmente, se evaluó los resultados con la "Escala de Duraffourd".

3.7.2. Descripción de instrumentos

Se desarrollaron un formulario de recopilación de información con el fin de obtener los datos necesarios (46).

3.7.3. Validación

Se llevó a cabo la validación del instrumento, a través, de juicios de expertos, se eligió a 3 docentes con el grado de Magister de la Universidad Norbert Wiener, quienes, fundamentados en su conocimiento, establecieron su pertinencia, claridad y relevancia. El instrumento fue concebido considerando la información previamente investigada y las publicaciones científicas asociadas al tema, con la finalidad de definir la variable a ser investigada.

3.7.4. Confiabilidad

No aplica por ser una guía de observación, se desarrolló mediante la supervisión del Dr. Collanque Pinto Jesús Daniel.

3.8. Procesamiento y análisis de datos

Después de llevar a cabo los experimentos, los hallazgos fueron recopilados en el instrumento de recolección de datos y anotados en una hoja de cálculo de Microsoft Excel. Estos datos fueron objeto de un análisis estadístico utilizando el software SPSS versión 27, a través de la utilización de pruebas descriptivas e inferenciales como ANOVA y Tukey.

3.9. Aspectos éticos

En este estudio se otorgó una consideración particular a los principios éticos en el ámbito de la biología con el propósito de evitar la diseminación de bacterias y salvaguardar la salud de los individuos como del entorno. Con este fin, se aplicaron precauciones de bioseguridad en todos los procedimientos relacionados con la manipulación, transporte, empleo, higienización y eliminación de desechos, con el objetivo de garantizar una adecuada protección frente a cualquier eventual peligro.

CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1. Resultados

En el presente apartado se muestran los resultados del análisis de solubilidad, análisis cualitativo preliminar y el ensayo microbiológico.

4.1.1. Contrastación de la hipótesis general.

Ho: El extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) no presenta efecto antibacteriano in vitro en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* ATCC, Lima 2023.

H1: El extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) presenta efecto antibacteriano in vitro en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* ATCC, Lima 2023.

En la tabla 1, 2 y 3 se evidencian los resultados de los halos de inhibición del análisis microbiológico.

Tabla 1.

Promedio de los halos de inhibición) frente Escherichia coli ATCC 25922

Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm				
	DMSO	25%	50%	75%	Levofloxacino 5 µg
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6	6	6	6	35.52
	6	6	6	6	35.50
	6	6	6	6	35.53
	6	6	6	6	35.49
	6	6	6	6	35.52
	6	6	6	6	35.48
	6	6	6	6	35.53
	6	6	6	6	35.50
	6	6	6	6	35.51
	6	6	6	6	35.52
	6	6	6	6	35.47
	6	6	6	6	35.48
Media	6	6	6	6	35.50

De acuerdo con la tabla 1, se muestra que *Escherichia coli* ATCC 25922 evidencia valores inferiores a 8 mm, tanto para las concentraciones del 25%, 50% y 75% lo que indica una ausencia de efecto antibacteriano, según la tabla de Duraffourd y Lapraz (1983).

Tabla 2.

Promedio de halos de inhibición frente Staphylococcus aureus ATCC 25923.

Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm				
	DMSO	25%	50%	75%	Levofloxacino 5 µg
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6	6.99	8.45	10.57	30.05
	6	7.02	8.47	10.55	29.99
	6	6.98	8.48	10.56	30.03
	6	6.95	8.41	10.52	29.96
	6	6.99	8.43	10.56	30.01
	6	6.96	8.40	10.53	30.03
	6	7.05	8.47	10.59	29.98
	6	6.97	8.46	10.57	30.00
	6	7.00	8.45	10.58	29.98
	6	7.02	8.43	10.53	30.05
	6	6.98	8.44	10.55	29.95
6	7.03	8.48	10.58	30.04	
Media	6	7.00	8.45	10.56	30.01

De acuerdo con la tabla 2, se observa que la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 muestra valores inferiores a 8 mm, en la concentración del 25%, lo que indica una ausencia en el efecto antibacteriano, en cuanto a la concentración del 50% tiene un promedio de 8.45, lo que

indica es sensible y para la concentración del 75% se observa un promedio de 10.56, lo que indica que es sensible, según la tabla de Duraffourd y Lapraz (1983).

Tabla 3.

Promedio de halos de inhibición frente Streptococcus pyogenes ATCC 19615

Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm				
	DMSO	25%	50%	75%	Levofloxacino 5 µg
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	6	6	6	8.27	27.53
	6	6	6	8.29	27.51
	6	6	6	8.26	27.55
	6	6	6	8.30	27.51
	6	6	6	8.27	27.54
	6	6	6	8.25	27.47
	6	6	6	8.32	27.52
	6	6	6	8.27	27.50
	6	6	6	8.31	27.52
	6	6	6	8.23	27.46
	6	6	6	8.25	27.49
Media	6	6	6	8.27	27.51

De acuerdo con la tabla 3, se observa que la cepa *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 evidencia valores inferiores a 8 mm en las concentraciones del 25% y 50% lo que indica una

ausencia de efecto antibacteriano. Por otra parte, a la concentración de 75%, se observa que es sensible, con un valor promedio 8.27 mm, según la tabla de Duraffourd y Lapraz (1983).

Decisión: Se rechaza la hipótesis nula (H0), debido a que si existe efecto antibacteriano de la especie vegetal en estudio.

4.1.2. Contrastación de hipótesis específicas

a) Hipótesis Específica N° 01

H0: El extracto etanólico de cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) no tiene afinidad química sobre los solventes mediante la prueba de solubilidad.

H1: El extracto etanólico de cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) tiene afinidad química sobre los solventes mediante la prueba de solubilidad.

Tabla 4.

Prueba de solubilidad del extracto etanólico de la cáscara de Citrus reticulata (mandarina).

TUBO	SOLVENTE	RESULTADOS
N° 1	Éter de petróleo	-
N° 2	Diclorometano	-
N° 3	Cloroformo	-
N° 4	Butanol	-
N° 5	Etanol 96°	+++
N° 6	Etanol 70°	+
N° 7	Metanol	++
N° 8	Agua destilada	+
N° 9	Dimetil sulfoxido	+++

En la tabla 4, se observó la capacidad de disolución del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (mandarina), utilizando distintos solventes con diferentes niveles de polaridad. Se observó que el solvente etanol 96° y dimetil sulfoxido mostraron mayor solubilidad (+++),

seguidos por el metanol que presentó una solubilidad mediana (++). Por otro lado, se observó una solubilidad baja (+) en etanol 70° y agua destilada.

Decisión: Se rechaza la hipótesis nula (H0), debido a que si existe solubilidad por parte del extracto en estudio.

b) Hipótesis Específica N° 02

H0: No existen metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) responsables de efecto antibacteriano mediante la marcha fitoquímica.

H1: Existen metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) responsables de efecto antibacteriano mediante la marcha fitoquímica.

Tabla 5.

Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de la cáscara de Citrus reticulata (mandarina)

TUBO	ENSAYOS	METABOLITO	RESULTADO
N° 1	Borntrager	Antraquinonas	+++
N° 2	Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	+++
N° 3	Liebermann-Burchard	Terpenos y esteroides	+
N° 4	Dragendorff	Alcaloides	+++
N° 5	Mayer	Alcaloides	+
N° 6	Wagner	Alcaloides	-
N° 7	Baljet	Lactonas α , β -insaturadas	+++
N° 8	Gelatina	Taninos	+++
N° 9	Gelatina-sal	Taninos	+
N° 10	NaOH 10%	Antocianinas	+++
N° 11	Benedict	Azúcares reductores	+++
N° 12	Fehling A y B	Azúcares reductores	+++
N° 13	Espuma	Saponinas	-
N° 14	Shinoda	Flavonoides	+++

En la tabla 5, se llevó a cabo el análisis fitoquímico siguiendo el protocolo establecido por Olga Lock para comprobar la hipótesis propuesta. Se evidenció la presencia de antraquinonas, lactonas α , β -insaturadas, compuestos fenólicos, alcaloides, taninos, azúcares reductores, antocianinas, con una abundante presencia (+++). También se registró una presencia mínima (+) de alcaloides, taninos, terpenos y esteroides.

Decisión: Se rechaza la hipótesis nula (H_0) debido a que el extracto en estudio si presenta metabolitos secundarios responsables de la actividad antibacteriana.

c) Hipótesis específica N° 03

H₀: El extracto etanólico de cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) no tiene efecto antibacteriano in vitro sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* ATCC en las concentraciones del 25%, 50% y 75%.

H₁: El extracto etanólico de cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) tiene efecto antibacteriano in vitro sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* ATCC en las concentraciones del 25%, 50% y 75%.

Tabla 6.

Comparaciones múltiples por T3 de Dunnett

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente	(I) Grupo1	(J) Grupo 1	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Levofloxacino 5 µg	25 %	29,50417*	0,00596	0,000	29,4839	29,5244
		50%	29,50417*	0,00596	0,000	29,4839	29,5244
		75%	29,50417*	0,00596	0,000	29,4839	29,5244
	DMSO	25 %	0,00000	0,00000	1,000	0,0000	0,0000
		50%	0,00000	0,00000	1,000	0,0000	0,0000
		75%	0,00000	0,00000	1,000	0,0000	0,0000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Levofloxacino 5 µg	25 %	23,01083*	0,01320	0,000	22,9701	23,0516
		50%	21,55833*	0,01253	0,000	21,5194	21,5972
		75%	19,44833*	0,01184	0,000	19,4112	19,4855
	DMSO	25 %	-,99500*	0,00866	0,000	-1,0244	-,9656
		50%	-2,44750*	0,00760	0,000	-2,4733	-2,4217
		75%	-4,55750*	0,00641	0,000	-4,5793	-4,5357
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Levofloxacino 5 µg	25 %	21,50667*	0,00801	0,000	21,4794	21,5339
		50%	21,50667*	0,00801	0,000	21,4794	21,5339
		75%	19,23333*	0,01112	0,000	19,1990	19,2676
	DMSO	25 %	0,00000	0,00000	1,000	0,0000	0,0000
		50%	0,00000	0,00000	1,000	0,0000	0,0000

75%	-2,27333*	0,00772	0,000	-2,2996	-2,2471
-----	-----------	---------	-------	---------	---------

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Al examinar la tabla 6, se observa que la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, tuvo resultados de significancia asintomática bilateral en las comparaciones entre el grupo (Levofloxacino 5 µg) y los grupos experimentales (25%, 50% y 75%), son menores a 0.05 ($p < 0.05$), lo cual indica que si hay diferencias estadísticamente. Esto implica que el grupo Levofloxacino 5 µg presenta un efecto inhibitor mayor que los experimentales en todas las concentraciones. Adicionalmente, se observa entre el (DMSO) y los grupos experimentales (25 %, 50% y 75%), dio $p > 0.05$, con un promedio de 6, lo cual indica que no existe efecto antibacteriano y no hay diferencias estadísticamente significativas entre dichos grupos.

Por otro lado, se puede observar en la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, tuvo resultados de significancia asintomática bilateral entre el grupo (Levofloxacino 5 µg) y los grupos experimentales (25 %, 50% y 75%), son menores a 0.05 ($p < 0.05$), el cual evidencia que Levofloxacino 5 µg muestra un efecto inhibitor significativamente mayor que los experimentales en todas las concentraciones. Asimismo, se observa que $p < 0.05$ entre (DMSO) y los grupos experimentales (dio efecto antibacteriano en la concentración del 50% con un promedio de 8.45, en la concentración del 75% con un promedio de 10.56, lo cual evidencia que existe efecto antibacteriano y en la concentración del 25%, no tiene efecto antibacteriano, ya que, tiene un promedio de 7.00), lo cual evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas.

Adicionalmente, se puede observar en la cepa de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, tuvo significancia asintomática bilateral entre el (Levofloxacino 5 µg) y los grupos experimentales (25 %, 50% y 75%), son menores a 0.05 ($p < 0.05$), lo que indica que el grupo Levofloxacino 5 µg

muestra un efecto inhibidor significativamente mayor que los grupos experimentales en todas las concentraciones. De igual manera, se observa que $p > 0.05$ entre el (DMSO) y los grupos experimentales (al 25% y 50%, no tuvo efecto antibacteriano, ya que, tiene un promedio de 6mm), evidenciando que no hay diferencias estadísticamente. Por otro lado, al 75% se muestra que $p < 0.05$ por lo que se interpreta que existe diferencias significativas.

Decisión: Se rechaza la hipótesis nula (H_0) debido a que si existe efecto antibacteriano.

d) Hipótesis Específica N° 04

H0: El extracto etanólico de cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) no presenta mayor efecto antibacteriano sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* ATCC en comparación con fármacos de referencia.

H1: El extracto etanólico de cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) presenta mayor efecto antibacteriano sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* ATCC en comparación con fármacos de referencia.

Tabla 7.

Subconjuntos frente Escherichia coli ATCC 25922

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922			
Grupo	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
DMSO	12	6,0000	
25 %	12	6,0000	
50 %	12	6,0000	
75 %	12	6,0000	
Levofloxacino 5 µg	12		35,5042
Sig.		1,000	1,000

En la tabla 7, se evidencia que frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, los halos de *Citrus reticulata* (mandarina) fueron menores que Levofloxacino 5 µg. Esto muestra que el control positivo muestra un diámetro de inhibición de 35,5042 mm, teniendo un efecto antibacteriano sumamente sensible, que los grupos de experimentación.

Tabla 8.*Subconjuntos frente Staphylococcus aureus ATCC 25923*

<i>Staphylococcus aureus ATCC 25923</i>						
Grupo	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
DMSO	12	6,0000				
25 %	12		6,9950			
50 %	12			8,4475		
75 %	12				10,5575	
Levofloxacino 5 µg	12					30,0058
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

En la tabla 8, se evidencia que frente a *Staphylococcus aureus ATCC 25923*, los halos de *Citrus reticulata* (mandarina) fueron menores que Levofloxacino 5 µg. Esto muestra que el control positivo muestra un diámetro de inhibición de 30,0058 mm, teniendo un efecto antibacteriano sumamente sensible, que los grupos de experimentación.

Tabla 9.*Subconjuntos frente Streptococcus pyogenes ATCC 19615*

<i>Streptococcus pyogenes ATCC 19615</i>				
Grupo__	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
DMSO	12	6,0000		
25 %	12	6,0000		
50 %	12	6,0000		

75 %	12		8,2733	
Levofloxacino 5 µg	12			27,5067
Sig.		1,000	1,000	1,000

En la tabla 9 se evidencia que frente a *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, los halos de *Citrus reticulata* (mandarina) fueron menores que Levofloxacino 5 µg. Esto muestra que el control positivo muestra un diámetro de inhibición de 27,5067 mm, teniendo un efecto antibacteriano sumamente sensible, que los grupos de experimentación.

Decisión: No se rechaza la hipótesis nula (H0), debido a que el extracto en estudio no supera el espectro de acción del fármaco de referencia.

4.1.3 Discusión de resultado

La evaluación se completó mediante la prueba de solubilidad, marcha fitoquímica, ensayo microbiológico y la contrastación de hipótesis, el cual permitió analizar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (mandarina) en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli*, Lima 2023.

Respecto al objetivo general, en la tabla 1 frente a la cepa *Escherichia coli*, no presentó efecto antibacteriano en la concentración de 25%, 50% y 75%, ya que, se obtuvo un diámetro de 6 mm. De acuerdo con el estudio de Sakya et al. (2019), determinaron que el extracto de la cascara de *Citrus reticulata* (Mandarina), no presentó efecto antibacteriano en la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, ya que, no presentó zona de inhibición, en una concentración del 10% (25). Asimismo, en la tabla 2, frente a la cepa del *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, a la concentración del 25% no se observó efecto antibacteriano, porque, se obtuvo un valor de 7mm, al 50% presentó efecto antibacteriano con un halo de 8,45 mm y el 75% presento un halo de 10,56 mm. El mismo que guarda relación con la investigación de Luque y Mendiguete (2021), quienes determinaron actividad del extracto de *Citrus limetta* Risso sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, observaron que la concentración del 25% se obtuvo un valor del 29 % de actividad antibacteriana, al 50% se obtuvo un valor de 50% de actividad antibacteriana y a la concentración del 100% del extracto de *Citrus limetta* Risso presentó 60% de actividad antibacteriana. Indicando que las cáscaras de *Citrus limetta* Risso presentaron actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* debido a la presencia de metabolitos secundarios (22). Por último, en la tabla 3, frente a la cepa de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 no presentó efecto antibacteriano en las concentraciones del 25% y 50%, donde se obtuvo un valor de 6 mm, pero, si presentó efecto

antibacteriano al 75%, con un valor de 8,27mm. Según los estudios muestran el efecto antibacteriano de los extractos de las cáscaras de *Citrus reticulata* (mandarina), aunque difieren en las cepas bacterianas evaluadas. Factores como la ubicación geográfica, las condiciones ambientales, los métodos de extracción y los controles utilizados podrían influir en las discrepancias observadas.

Respecto al objetivo específico 1, en la tabla 4 se realizó la prueba de solubilidad, identificando que el solvente etanol 96° y dimetil sulfoxido mostraron mayor solubilidad (+++), seguidos por el metanol que presentó una solubilidad mediana (++) y una solubilidad baja (+) en etanol 70° y agua destilada. Comparando con el estudio de Espinoza y Huiñac (2021), quienes examinaron la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Citrus x Limon* (Limón), observaron una alta solubilidad (+++) en cloroformo y ciclohexano; siendo muy soluble (++) el etanol y acetona, por último, con el agua no se observó solubilidad (-) (23). La coincidencia en la alta solubilidad de los extractos de las cáscaras de *Citrus reticulata* y *Citrus x Limon* en etanol de 96° y con agua destilada no mostro solubilidad, esto explica la concordancia en ambas investigaciones.

Respecto al objetivo específico 2, en la tabla 5, se observó la marcha fitoquímica, revelando resultados de mayor presencia (+++) para metabolitos secundarios, que correspondió a las antraquinonas, compuestos fenólicos; alcaloides; lactonas α , β -insaturadas, taninos, antocianinas, azúcares reductores y flavonoides. Seguido de una mínima presencia (+) para taninos, terpenos y esteroides. Cuando comparamos con el estudio de Hassan et al (2020), quienes examinaron la acción antibacteriana del extracto de jugo de la Naranja dulce (*Citrus Sinensis*), observaron en el ensayo de la marcha fitoquímica, una alta concentración de metabolitos secundarios como;

saponinas (+++), esteroides (+++), terpenoides (+++), alcaloides (+++), seguido de una concentración moderada (++) como; taninos, flavonoides y finalmente tuvieron una ligera concentración de aceites y grasas (+), aminoácidos (+) y carbohidrato(+) (28). Asimismo, es similar con la investigación de Ali *et al.* (2017) quienes analizaron la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de cáscara de *Citrus Limón* (Familia-*Rutaceae*). Obteniendo que el extracto de *Citrus Limon* contiene una alta presencia de metabolitos secundarios, como alcaloides, saponina, flavonoides, carbohidratos, glucósidos y ácidos cítricos y taninos (30). La presencia de metabolitos secundarios en el análisis fitoquímico de ambas investigaciones puede explicarse por la composición química inherente de las cáscaras de *Citrus reticulata* (mandarina), Extracto de jugo de la *Naranja dulce* (*Citrus Sinensis*) y *Citrus Limon* (limón), que comparten la capacidad de sintetizar y acumular compuestos bioactivos con propiedades químicas.

Respecto al objetivo específico 3, en la tabla 6, Se evidenció que el extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (mandarina) no presentó efecto antibacteriano, frente *Escherichia coli* al 25%, 50% y 75%, obteniendo un promedio de 6 mm ($p>0.05$) con un nivel de significancia de 1,000. Comparando con el estudio de Sakya *et al.* (2019) quienes investigaron el efecto antibacteriano del extracto de *Citrus reticulata* (mandarina), contra la cepa de *Escherichia Coli* ATCC 25922, no presentaron ningún efecto antibacteriano (25). En la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, no presentó un efecto antibacteriano en la concentración del 25%, dio un promedio de 7,00 mm y en la concentración del 50%, dio un promedio de 8,45 mm, y 75%, con un promedio de 10,56mm, por lo tanto, a las concentraciones del 50% y 75% presentó efecto antibacteriano; además, cuando se observó en las comparaciones múltiples (tabla 6) hay una diferencia significativa en las concentraciones del 25%, 50% y 75%, dando un nivel de

significancia de 0,000, con un ($p < 0.05$). Comparando con el estudio de Sakya et al. (2019), quienes investigaron el efecto antibacteriano del extracto de *Citrus reticulata* (mandarina), contra la cepa de *Staphylococcus aureus*, tuvo una zona máxima inhibitoria de 12 mm (25). En la cepa de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, no presentó efecto antibacteriano en las concentraciones del 25%, y 50%, con un promedio en ambos de 6mm, dando un ($p > 0.05$) y en la concentración del 75%, presentó un promedio de 8,27mm, dando un ($p < 0.05$). Comparando con el estudio de Pasco (2019), quienes realizaron efecto antibacteriano de *Myrciaria dubia* (Camú Camú) el cual presentó efecto antibacteriano frente al *Streptococcus mutans* al 25%, al 50% y 75% con un $p < 0.05$ (50). Podemos resumir que en la concentración del 25% y 50% no tuvo una diferencia significativa, ambos tuvieron un promedio de 6mm ($p > 0.05$) y en la concentración del 75% tuvo una diferencia significativa, con un ($p < 0.05$).

Respecto al objetivo específico 4, en las tablas 11, 12 y 13, se evidenció en las cepas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli*, los halos de inhibición a diferentes concentraciones 25%, 50% y 75% del extracto etanólico de cáscara de *Citrus reticulata* (mandarina) fueron menores en comparación con el Levofloxacino 5 µg. Comparados con el estudio de Tam (2015) quien evaluó el efecto inhibitorio del extracto del limón observó la presencia de actividad inhibitoria en todas las concentraciones evaluadas, aunque al comparar los halos de inhibición, se observó que la actividad bactericida del extracto fue significativamente inferior al de la vancomicina. Indicando que el extracto de *Citrus limon* tuvo actividad bactericida (24). Así mismo se corrobora con la investigación de Luque y Mendiguete (2021), determinaron el efecto bactericida del extracto etanólico de la lima frente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, donde el Ciprofloxacino (control positivo) mostró mayor actividad antibacteriana que los

obtenidos por las concentraciones del extracto. Indicando que las cáscaras de *Citrus limetta* Risso presentaron actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (22). La superioridad del control positivo sobre los extractos de cáscaras de cítricos se debe a la eficacia y especificidad de los fármacos diseñados para la actividad antibacteriana. Los compuestos naturales presentes en los extractos pueden variar en su composición y concentración, lo que limita su potencia.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se concluye:

- Que el extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (mandarina) presentó efecto antibacteriano en cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615. Excepto para la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, quien no presentó efecto antibacteriano.
- Que el solvente etanol 96° y dimetil sulfoxido mostraron mayor solubilidad (+++), seguido por el metanol, el cual fue medianamente soluble (++) , además, presentó poca solubilidad (+) en etanol de 70° y agua destilada.
- Que la abundante presencia de metabolitos secundarios (+++) correspondió, a las: antraquinonas, compuestos fenólicos, alcaloides, lactonas $\alpha\beta$ -insaturadas, taninos,

antocianinas, azúcares reductores y flavonoides; seguido de una mínima presencia de (+) terpenos y esteroides, por último, no se observó la presencia de Saponinas.

- Que la concentración del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (mandarina) presentó efecto antibacteriano en cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a las concentraciones del 50% y 75%, en cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 a la concentración del 75%. y en la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 no presentó efecto antibacteriano en las tres concentraciones.
- Las diámetros del 25%, 50% y 75% del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (mandarina) frente *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* ATCC fueron inferiores a los resultados obtenidos por el control positivo (Levofloxacino 5 µg).

5.2. Recomendaciones

Se recomienda:

- Realizar un estudio a profundidad, donde nos permita identificar los metabolitos secundarios responsables del efecto antibacteriano, de la cáscara de *Citrus reticulata* (mandarina).
- Investigar diferentes métodos de extracción para optimizar la eficacia de la cáscara de *Citrus reticulata* (mandarina).
- Evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (mandarina) en otros tipos de cepas bacterianas para determinar su espectro de acción.

- Realizar pruebas de toxicidad para evaluar la seguridad del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (mandarina) antes de considerar su aplicación clínica.
- Realizar estudios in vivo para confirmar la eficacia del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (mandarina) en animales de experimentación.

REFERENCIAS

1. Pulgarin F Celia M. Generalidades de la medicina crítica o intensivista. Reciamuc [Internet]. 2019;3(2):376–94. Available from: <https://www.reciamuc.com/index.php/RECIAMUC/article/view/345>
2. Flores R et al. Enfrentamiento de las infecciones de piel en el adulto. Rev Médica Clínica Las Condes [Internet]. 2021;32(4):429–41. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0716864021000754?via%3Dihub>
3. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. 13 de octubre. 2020. p. [citado el 05 de enero de 2023]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
4. France 24. Las infecciones de las 33 bacterias más comunes son la segunda causa de muerte en el mundo [Internet]. 22 de noviembre. 2022. p. [citado el 05 de enero de 2023]. Available from: <https://www.france24.com/es/programas/salud/20221122-las-infecciones-de-las-33-bacterias-más-comunes-son-la-segunda-causa-de-muerte-en-el-mundo>
5. Magnus J et al. Phytochemical and Antimicrobial Studies on Selected Medicinal Plants from the Iraqi Flora: Citrus Grandis, Citrus Sinensis and Ruta Chalepensis. Infect Genet Evol [Internet]. 2020;86(1):1–54. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134820304408?via%3Dihub>
6. Mouzo J. Las infecciones bacterianas comunes son la segunda causa de muerte en el mundo [Internet]. 21 de noviembre. 2022. p. [citado el 05 de enero de 2023]. Available from: <https://elpais.com/salud-y-bienestar/2022-11-21/las-infecciones-bacterianas-comunes-son-la-segunda-causa-de-muerte-en-el-mundo.html>

7. Li X, Huang T, Xu K, Li C, Li Y. Molecular characteristics and virulence gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolates in Hainan, China. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2019;19(1):1–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31640587/>
8. Barratt R et al. Sources of healthcare-associated *Staphylococcus aureus* bacteraemia in New Zealand acute hospitals. *he New Zeal Med J* [Internet]. 2022;1(1):29–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36201728/>
9. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. Las infecciones mortales por estafilococo siguen siendo una amenaza en los EE. UU. [Internet]. 05 de marzo. 2019. p. [citado el 05 de enero de 2023]. Available from: https://www.cdc.gov/spanish/mediosdecomunicacion/comunicados/p_vs_estafilococo_030519.html
10. Valderrama S et al. Guía de Práctica Clínica para el Diagnóstico y Manejo de las Infecciones de Piel y Tejidos Blandos en Colombia. *Infectio* [Internet]. 2019;23(4):318–46. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922019000400318
11. The Conversation. Un recuerdo no deseado de las vacaciones: la diarrea del viajero [Internet]. 15 de julio. 2022. Available from: <https://theconversation.com/un-recuerdo-no-deseado-de-las-vacaciones-la-diarrea-del-viajero-186307>
12. Ribeiro I et al. Antimicrobial photodynamic therapy with curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2022;37(1). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1572100022000187?via%3Dihub>

13. Leme R, Bispo P, Salles M. Community-genotype methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections in Latin America: a systematic review. *Brazilian J Infect Dis* [Internet]. 2021;25(1):1–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33607082/>
14. Gómez N, Vieyra J, Alonso O, Pirela M, Martínez O, Benítez E, et al. Surveillance of osteoarticular infections caused by *Staphylococcus aureus* in a paediatric hospital in Mexico City. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2022;12(1):1–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36569208/>
15. EL FINANCIERO. ¿Es el calor o el COVID? Esta es la razón del aumento de casos de diarrea en México [Internet]. 20 de julio. 2022. Available from: <https://www.elfinanciero.com.mx/salud/2022/07/20/es-el-calor-o-el-covid-esta-es-la-razon-por-la-que-han-aumentado-los-casos-de-diarrea-en-mexico/>
16. Suárez J et al. Susceptibilidad antibiótica de *Staphylococcus aureus* de aislados nasales en estudiantes del norte de Perú. *Gac Medica Boliv* [Internet]. 2020;43(1):49–55. Available from: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S1012-29662020000100009&script=sci_arttext
17. Cervantes E, García R, Salazar P. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* [Internet]. 2014;61(1):28–40. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
18. Aguirre P, Li V. Resistencia antibiótica de *Staphylococcus aureus* en portadores nasales menores de 2 años en Lima, Perú [Internet]. [Tesis para obtener el título profesional de Químico farmacéutico] Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2022. Available from:

- <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/11771>
19. Cabrejos L et al. Frecuencia de infección por MRSA adquirida en la comunidad en pacientes hospitalizados en el Hospital Cayetano Heredia, Lima-Perú [Internet]. [Tesis de bachiller] Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2020. Available from: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/7803>
 20. Riveros M, Ochoa T. Enteropatógenos de importancia en salud pública. Rev Peru Med Exp Salud Publica [Internet]. 2015;32(1):157–64. Available from: <https://rpmesp.ins.gob.pe/rpmesp/article/view/1588>
 21. Tineo, J. Valiente Y. Manejo de residuos sólidos para reducir la contaminación del medio ambiente: Revisión sistemática. Cienc Lat Rev Científica Multidiscip [Internet]. 2022;6(4):578–601. Available from: <https://ciencialatina.org/index.php/cienciala/article/view/2605>
 22. Luque, V. Mendiguete M. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de la cáscara de Citrus limetta risso (lima) frente a Staphylococcus aureus ATCC 25923 [Internet]. [Tesis de bachiller] Universidad Interamericana; 2021. Available from: <http://repositorio.unid.edu.pe/handle/unid/73?show=full>
 23. Espinoza A, Huiñac M. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cascara de citrus x limon (limón) frente a Cutibacterium acnes ATCC 6919 in vitro. Universidad Maria Auxiliadora; 2021.
 24. Tam M. Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de cáscara de citrus limon (limón) sobre staphylococcus aureus meticilino resistente. 2015. Universidad Privada Antenor Orrego; 2015.

25. Shakya A et al. Estudio comparativo de la actividad antibacteriana del jugo y el extracto de cáscara de cítricos. *Rev Microbiol la Univ Tribhuvan* [Internet]. 2019;6(1):82–8. Available from: <https://www.nepjol.info/index.php/tujm/article/view/26589>
26. Mohammad Z. Antimicrobial and Anti-Biofilm Activities of *Citrus sinensis* and *Moringa oleifera* Against the Pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* [Internet]. Tesis de bachiller Universidad de Tabuk; 2020. Available from: https://assets.cureus.com/uploads/original_article/pdf/47888/1612431921-1612431914-20210204-18590-uxwc7s.pdf
27. Ehigbai O et al. Quantitative phytochemical analysis and antimicrobial activities of fresh and dry ethanol extracts of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (sweet Orange) peels. *Clin Phytoscience* [Internet]. 2020;6(46):1–6. Available from: <https://clinphytoscience.springeropen.com/articles/10.1186/s40816-020-00193-w>
28. Hassan I et al. Antibacterial activity of sweet orange (*Citrus sinensis*) juice extract on selected bacteria. *African J Microbiol Res* [Internet]. 2021;15(4):178–82. Available from: <https://academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text/5EC9EFC66590>
29. Wenling Z et al. Composición del aceite esencial de cáscara y actividades antibacterianas de *Citrus x sinensis* L. Osbeck “Tarocco” y *Citrus reticulata* Blanco. *Horticultrae* [Internet]. 2022;8(9). Available from: <https://www.mdpi.com/2311-7524/8/9/793>
30. Ali J, Das B, Saikia T. Antimicrobial activity of lemon peel (citrus limon) extract. *Int J Curr Pharm Res*. 2017;9(4):79–82.
31. Hasan M, Roy P, Alam M, Hoque M, Zzaman W. Antimicrobial activity of peels and physicochemical properties of juice prepared from indigenous citrus fruits of Sylhet region,

- Bangladesh. *Heliyon*. 2022;8(7):1–10.
32. Clery R et al. Chemical Diversity of Citrus Leaf Essential Oils. *Chem Biodivers* [Internet]. 2022;19(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35061334/>
 33. Guohong A et al. Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Nature* [Internet]. 2018;15(554):311–316. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29414943/>
 34. Guarnaccia V et al. *Phyllosticta citricarpa* and sister species of global importance to Citrus. *Mol Plant Pathol* [Internet]. 2019;20(12):1619–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31512371/>
 35. Imtiyaz I et al. Cardioprotection by Citrus grandis (L.) Peel Ethanolic Extract in Alloxan-Induced Cardiotoxicity in Diabetic Rats. *Biomed Res Int* [Internet]. 2022;1(1):1–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35757467/>
 36. Cheung G et al. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence* [Internet]. 2021;12(1):547–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33522395/>
 37. Daza R. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf Ter del Sist Nac Salud* [Internet]. 1998;22(3):1–11. Available from: <https://www.sanidad.gob.es/ca/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>
 38. Guevara J, Aguirre J, Guevara E, Williams F, Cuéllar E. Prevalencia de *Streptococcus beta hemolítico* en pacientes con faringoamigdalitis aguda, en un hospital de la ciudad de Chachapoyas, Amazonas. *An Fac med* [Internet]. 2008;69(2):88–90. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832008000200004
 39. Quispe C CD. Contaminación con *Escherichia coli* en tipos de aderezos expendidos en puestos de comida de un mercado de Huancayo – 2020 [Internet]. 2021. Available from:

- <https://repositorio.upla.edu.pe/handle/20.500.12848/3116>
40. Becton Dickinson. Instrucciones de uso – medios en placa listos para usar [Internet]. BD. 2017. p. 1–11. Available from: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8774>
 41. Técnicas de control metrológico. Cepas de referencia y control de medios [Internet]. TCM. 2023. p. 1–5. Available from: <https://www.tcmetrologia.com/blog/cepas-de-referencia/>
 42. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Levofloxacino [Internet]. AEMPS. 2021. p. 1–10. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/75614/FichaTecnica_75614.html
 43. Guija M, Guija R. Metodología de la investigación Científica. 1st ed. Lima: Editorial USMP; 2019. 166 p.
 44. Hernandez R, Mendoza C. Metodología de la Investigación. Ciudad de México: Mc Graw Hill; 2018. 714 p.
 45. Baena G. Metodología de la Investigación. 3 ed. Grupo Editorial Patria; 2017. 141 p.
 46. Gallardo E. Metodología de la Investigación. 1 ed. Huancayo: Universidad Continental; 2017. 96 p.
 47. Shakya A, Luitel B, Kumari P, Devkota R, Dahal P, Chaudhary R. Comparative Study of Antibacterial Activity of Juice and Peel Extract of Citrus Fruits. TUJM. 2019;6(1):1–7.
 48. Hussin A, Abdulrhman R, Yahya A, Al-Shamahy H, Al-labani M. Association between the Streptococcus mutans biofilm formation and dental caries experience and antibiotics resistance in adult females. Univers J Pharm Res. 2021;5(6):18–23.
 49. Valenzuela C, Gongora N, Dueñas M, Velazquez L, Ramos A, Valenzuela N. Efecto de los extractos secos clorofórmico y de diclorometano de Tropaeolum tuberosum (Ruiz & Pavón)

mashua sobre los parámetros seminales y toxicidad aguda. *Rev Colomb Cienc Quím Farm* [Internet]. 2019;48(1):94–111. Available from: <http://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v48n1.80068>

50. Pasco C. Efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico de *Myrciaria dubia* “camu-camu” frente *Streptococcus mutans* ATCC 35668 [Internet]. Universidad Señor de Sipan; 2019. Available from: <https://repositorio.uss.edu.pe/handle/20.500.12802/6606>

ANEXOS

Anexo 1. Matriz de Consistencia

Formulación del Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Diseño metodológico
<p>Problema General</p> <p>¿Cuál fue el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina) en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Escherichia coli</i> ATCC, Lima 2023?</p> <p>Problemas Específicos</p> <p>¿Cuál fue la afinidad química del extracto etanolito de cáscara de <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina) mediante la prueba de solubilidad?</p>	<p>Objetivo General</p> <p>Analizar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina) en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Escherichia coli</i> ATCC, Lima 2023.</p> <p>Objetivos Específicos</p> <p>Identificar la afinidad química del extracto etanólico de cáscara de <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina) sobre los solventes mediante la prueba de solubilidad.</p>	<p>Hipótesis General</p> <p>H1: El extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina) presenta efecto antibacteriano in vitro en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Escherichia coli</i> ATCC, Lima 2023.</p> <p>H0: El extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina) no presenta efecto antibacteriano in vitro en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Escherichia coli</i> ATCC, Lima 2023.</p> <p>Hipótesis específicas</p> <p>El extracto etanólico de cáscara de <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina) tiene afinidad química sobre los solventes mediante la prueba de solubilidad</p>	<p>Variable independiente:</p> <p>Extracto etanólico de cáscara de <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina)</p> <p>Dimensiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Pruebas de solubilidad ▪ Marcha Fitoquímica 	<p>Método</p> <p>Hipotético deductivo</p> <p>Tipo de Investigación</p> <p>Aplicada</p> <p>Diseño de la Investigación</p> <p>Experimental, transversal</p> <p>Población</p> <p>Los 10 kg del fruto de <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina) que fue originaria del “Mercado Mayorista de frutas” del puesto N° 312 “La Victoria-Lima”.</p>

Formulación del Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Diseño metodológico
<p>Problemas Específicos</p> <p>¿Cuáles fueron los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina) mediante la marcha fitoquímica?</p> <p>¿Cuál fue el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina) sobre las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Escherichia coli</i> ATCC, en la concentración del 25%, 50% y 75%?</p> <p>¿Cómo fue la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus reticulata</i> (mandarina) a diferentes concentraciones y el fármaco de referencia, frente a las cepas <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Escherichia coli</i> ATCC?</p>	<p>Objetivos Específicos</p> <p>Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina) mediante la marcha fitoquímica</p> <p>Determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina) sobre las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Escherichia coli</i> ATCC, en la concentración del 25%, 50% y 75%.</p> <p>Comparar la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina) a diferentes concentraciones y el fármaco de referencia, frente a las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Escherichia coli</i> ATCC.</p>	<p>Hipótesis específicas</p> <p>Existen metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de la cáscara de <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina) responsables de efecto antibacteriano mediante la marcha fitoquímica.</p> <p>El extracto etanólico de cáscara de <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina) tiene efecto antibacteriano in vitro sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Escherichia coli</i> ATCC en la concentración del 25%, 50% y 75%.</p> <p>El extracto etanólico de cáscara de <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina) presenta mayor efecto antibacteriano sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Escherichia coli</i> ATCC en comparación con fármacos de referencia.</p>	<p>Variable dependiente:</p> <p>Efecto antibacteriano in vitro en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Escherichia coli</i></p> <p>Dimensiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Escherichia coli</i> ▪ Antibiótico de referencia. 	<p>Muestra</p> <p>La muestra fue 1 kg de la cáscara obtenida de 10 k del fruto de <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina).</p> <p>Muestreo</p> <p>La cascará de <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina), se tomó del “Mercado Mayorista de frutas del puesto N° 312 “La Victoria- Lima”, para realizar el extracto etanólico.</p> <p>Técnica</p> <p>Observación</p> <p>Instrumento</p> <p>Ficha de recolección de datos</p>

Anexo 2. Instrumento

Instrumento sobre el extracto etanólico de cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina)

PRUEBA DE SOLUBILIDAD Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Prueba de solubilidad

TUBO	SOLVENTE	RESULTADOS
N° 1	Éter de petróleo	
N° 2	Diclorometano	
N° 3	Cloroformo	
N° 4	Butanol	
N° 5	Etanol 96	
N° 6	Etanol 70	
N° 7	Metanol	
N° 8	Agua destilada	

Resultados -: Insoluble; +: Poco soluble; ++: Medianamente soluble; +++: Muy soluble

Tamizaje fitoquímico

TUBO	ENSAYOS	METABOLITO	RESULTADO
N° 1	Boritrager	Antraquinonas	
N° 2	Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	
N° 3	Liebermann-Burchard	Terpenos y esteroides	
N° 4	Dragendorff	Alcaloides	
N° 5	Mayer	Alcaloides	
N° 6	Wagner	Alcaloides	
N° 7	Baljet	Lactonas α , β -insaturadas	
N° 8	Gelatina	Taninos	
N° 9	Gelatina-sal	Taninos	
N° 10	NaOH 10%	Antocianinas	
N° 11	Benedict	Azúcares reductores	
N° 12	Fehling A y B	Azúcares reductores	
N° 13	Espuma	Saponinas	
N° 14	Shinoda	Flavonoides	

Resultados (-): Ausencia; (+): Mínima; (++): Mediana (+++): Abundante presencia

Instrumento de recolección de datos

N°	Frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923				
	Control negativo	Control positivo levofloxacino 5 µg	Ext 25 %	Ext 50 %	Ext 75 %
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
N°	Frente a <i>Streptococcus pyogenes</i> 19615				
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
N°	Frente a <i>Escherichia coli</i> 25922				
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					

Anexo 3: Validez del instrumento

TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN: Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*; Lima 2023

Nº	DIMENSIONES / ítems	Pertinencia ¹		Relevancia ²		Claridad ³		Sugerencias
		Si	No	Si	No	Si	No	
	VARIABLE INDEPENDIENTE: Extracto etanólico de cáscara de <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina)							
	DIMENSIÓN 1: Pruebas de solubilidad	Si	No	Si	No	Si	No	
1	Éter de petróleo	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
2	Diclorometano	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
3	Cloroformo	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
4	Butanol	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
5	Etanol 96°	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
6	Metanol	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
7	Agua destilada	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
	DIMENSIÓN 2: Marcha Fitoquímica	Si	No	Si	No	Si	No	
8	Antraquinonas	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
9	Compuestos fenólicos	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
10	Terpenos y esteroides	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
11	Alcaloides	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		

12	Lactonas α , β -insaturadas	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
13	Taninos	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
14	Antocianinas	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
15	Azúcares reductores	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
16	Saponinas	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
17	Flavonoides	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
	VARIABLE 2: Efecto antibacteriano in vitro en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus pyogenes</i>, <i>Escherichia coli</i>							
	DIMENSIÓN 1: Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Escherichia coli</i>.	Si	No	Si	No	Si	No	
18	Concentración al 25 %	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
19	Concentración al 50 %	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
20	Concentración al 75 %	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
	DIMENSIÓN 2: Antibiótico de referencia.	Si	No	Si	No	Si	No	
21	Levofloxacino	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		

Observaciones (precisar si hay suficiencia): Si hay suficiencia

Opinión de aplicabilidad: Aplicable [] Aplicable después de corregir [] No aplicable []

Apellidos y nombres del juez validador. Dr. Juan Manuel Parreño Tipian

DNI: 10326579

Especialidad del validador: Doctor en Farmacia y Bioquímica

¹**Pertinencia:** El ítem corresponde al concepto teórico formulado.

²**Relevancia:** El ítem es apropiado para representar al componente o dimensión específica del constructo

³**Claridad:** Se entiende sin dificultad alguna el enunciado del ítem, es conciso, exacto y directo

Nota: Suficiencia, se dice suficiencia cuando los ítems planteados son suficientes para medir la dimensión

16 de Marzo del 2023



Dr. Juan Manuel Parreño Tipian
D.F. Especialista en Análisis Bioquímicos
C.C.F. N° 06892

Firma del Experto Informante

TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN: Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*; Lima 2023

N°	DIMENSIONES / ítems	Pertinencia ¹		Relevancia ²		Claridad ³		Sugerencias
		Si	No	Si	No	Si	No	
	VARIABLE INDEPENDIENTE: Extracto etanólico de cáscara de <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina)							
	DIMENSIÓN 1: Pruebas de solubilidad	Si	No	Si	No	Si	No	
1	Éter de petróleo	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
2	Diclorometano	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
3	Cloroformo	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
4	Butanol	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
5	Etanol 96°	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
6	Metanol	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
7	Agua destilada	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
	DIMENSIÓN 2: Marcha Fitoquímica	Si	No	Si	No	Si	No	
8	Antraquinonas	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
9	Compuestos fenólicos	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
10	Terpenos y esteroides	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
11	Alcaloides	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		

12	Lactonas α , β -insaturadas	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
13	Taninos	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
14	Antocianinas	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
15	Azúcares reductores	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
16	Saponinas	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
17	Flavonoides	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
	VARIABLE 2: Efecto antibacteriano in vitro en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus pyogenes</i>, <i>Escherichia coli</i>							
	DIMENSIÓN 1: Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Escherichia coli</i>.	Si	No	Si	No	Si	No	
18	Concentración al 25 %	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
19	Concentración al 50 %	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
20	Concentración al 75 %	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
	DIMENSIÓN 2: Antibiótico de referencia.	Si	No	Si	No	Si	No	
21	Levofloxacino	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		

Observaciones (precisar si hay suficiencia): Si hay suficiencia_____

Opinión de aplicabilidad: **Aplicable [X]** **Aplicable después de corregir []** **No aplicable []**

Apellidos y nombres del juez validador. Dr/ Mg: Daniel Ñañez del Pino

DNI: 23528875

Especialidad del validador: Gestión Ambiental

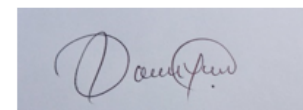
¹**Pertinencia:** El ítem corresponde al concepto teórico formulado.

²**Relevancia:** El ítem es apropiado para representar al componente o dimensión específica del constructo

³**Claridad:** Se entiende sin dificultad alguna el enunciado del ítem, es conciso, exacto y directo

Nota: Suficiencia, se dice suficiencia cuando los ítems planteados son suficientes para medir la dimensión

21 de Marzo del 2023



Firma del Experto Informante

TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN: Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*; Lima 2023

N°	DIMENSIONES / ítems	Pertinencia ¹		Relevancia ²		Claridad ³		Sugerencias
		Si	No	Si	No	Si	No	
	VARIABLE INDEPENDIENTE: Extracto etanólico de cáscara de <i>Citrus reticulata</i> (Mandarina)							
	DIMENSIÓN 1: Pruebas de solubilidad	Si	No	Si	No	Si	No	
1	Éter de petróleo	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
2	Diclorometano	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
3	Cloroformo	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
4	Butanol	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
5	Etanol 96°	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
6	Metanol	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
7	Agua destilada	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
	DIMENSIÓN 2: Marcha Fitoquímica	Si	No	Si	No	Si	No	
8	Antraquinonas	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
9	Compuestos fenólicos	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
10	Terpenos y esteroides	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
11	Alcaloides	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
12	Lactonas α , β -insaturadas	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		

13	Taninos	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
14	Antocianinas	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
15	Azúcares reductores	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
16	Saponinas	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
17	Flavonoides	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
	VARIABLE 2: Efecto antibacteriano in vitro en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus pyogenes</i>, <i>Escherichia coli</i>							
	DIMENSIÓN 1: Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Escherichia coli</i>.	Si	No	Si	No	Si	No	
18	Concentración al 25 %	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
19	Concentración al 50 %	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
20	Concentración al 75 %	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
	DIMENSIÓN 2: Antibiótico de referencia.	Si	No	Si	No	Si	No	
21	Levofloxacino	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		

Observaciones (precisar si hay suficiencia): Existe suficiencia para recolección de datos

Opinión de aplicabilidad: Aplicable [X] Aplicable después de corregir [] No aplicable []

Apellidos y nombres del juez validador: Mg. | Jose Rincon Chavez

DNI: 08863131

Especialidad del validador: Magister en salud pública y gestión sanitaria

¹**Pertinencia:** El ítem corresponde al concepto teórico formulado.

²**Relevancia:** El ítem es apropiado para representar al componente o dimensión específica del constructo

³**Claridad:** Se entiende sin dificultad alguna el enunciado del ítem, es conciso, exacto y directo

Nota: Suficiencia, se dice suficiencia cuando los ítems planteados son suficientes para medir la dimensión

23 de Marzo del 2023



Firma del Experto Informante

Anexo 4: Programa de intervención

ACTIVIDADES Y ACCIONES DESARROLLADAS POR EL TESISISTA	CRONOGRAMA												OBSERVACIONES	
	Enero/23	Febrero/23	Marzo/23	Abril/23	Mayo/23	Junio/23	Julio/23	Agosto/23	Septiembre/23	Octubre/23	Noviembre/23	Diciembre/23		
Búsqueda bibliográfica mediante navegadores académicos	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Recolección de la especie vegetal teniendo en cuenta el traslado.	X													
Presentación del proyecto de investigación al comité de ética.								X						
Elaboración de los instrumentos de recolección de datos	X	X	X											
Validación de los instrumentos de recolección de datos				X	X									
Adquisición de la especie vegetal				X	X									
Pruebas de solubilidad					X									
Análisis cualitativo preliminar					X	X								
Análisis microbiológico por Kirby-Bauer							X	X						
Procesamiento estadístico							X	X		X				
Proyecto de tesis actualizado							X	X	X	X	X			
Redacción de la tesis								X	X	X	X			
Revisión y corrección									X	X		X	X	
Entrega de redacción de tesis al jurado									X	X				
Aprobación del informe										X	X			
Sustentación de la Tesis Experimental											X	X		

Anexo 5: Informe del asesor de Turnitin

Reporte de similitud	
NOMBRE DEL TRABAJO	AUTOR
tesis de mandarina.docx	Mirian Irizabal y Ana Julca
RECuento DE PALABRAS	RECuento DE CARACTERES
10448 Words	58375 Characters
RECuento DE PÁGINAS	TAMAÑO DEL ARCHIVO
55 Pages	285.3KB
FECHA DE ENTREGA	FECHA DEL INFORME
Dec 7, 2023 3:46 PM GMT-5	Dec 7, 2023 3:47 PM GMT-5
<p>● 12% de similitud general El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos</p> <ul style="list-style-type: none"> • 12% Base de datos de Internet • 1% Base de datos de publicaciones • Base de datos de Crossref • Base de datos de contenido publicado de Crossref • 3% Base de datos de trabajos entregados 	
<p>● Excluir del Reporte de Similitud</p> <ul style="list-style-type: none"> • Material bibliográfico • Coincidencia baja (menos de 10 palabras) 	

Anexo 6: Resolución de proyecto

**Universidad
Norbert Wiener**

RESOLUCIÓN N° 100-2023-DFFB/UPNW

Lima, 10 de julio de 2023

VISTO:

El Acta N° 095 donde la Unidad Revisora de Asuntos Éticos de la FFYB aprueba la no necesidad de ser evaluado el proyecto por el Comité de Ética de la Universidad que presenta el/la tesista: IRAZABAL GALLEGOS MIRIAM y JULCA ASENJO ANA VILMA egresado (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

CONSIDERANDO:

Que es necesario proseguir con la ejecución del proyecto de tesis, presentado a la facultad de farmacia y bioquímica.

En uso de sus atribuciones, el decano de la facultad de farmacia y bioquímica;

RESUELVE:


ARTÍCULO ÚNICO: Aprobar el proyecto de tesis titulado "Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* ATCC, Lima 2023" presentado por el/la tesista: IRAZABAL GALLEGOS MIRIAM y JULCA ASENJO ANA VILMA autorizándose su ejecución.

Regístrese, comuníquese y archívese.



Dr. Rubén Eduardo Cueva Mestanza
Decano (e) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica

Anexo 7: Informe de análisis de laboratorio



"Año de la unidad, la paz y el desarrollo"

Informe de Resultados

Solicitado por: JULCA ASENJO ANA VILMA
IRAZABAL GALLEGOS MIRIAM BELEN

Muestra: Extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina)

Fecha de ensayo: 03-06-2023

Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm				
	75%	50%	25%	Levofloxacino 5 µg	DMSO
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6	6	6	35.52	6
	6	6	6	35.50	6
	6	6	6	35.53	6
	6	6	6	35.49	6
	6	6	6	35.52	6
	6	6	6	35.48	6
	6	6	6	35.53	6
	6	6	6	35.50	6
	6	6	6	35.51	6
	6	6	6	35.52	6
	6	6	6	35.47	6
6	6	6	35.48	6	
Microorganismo	75%	50%	25%	Levofloxacino 5 µg	DMSO
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10.57	8.45	6.99	30.05	6
	10.55	8.47	7.02	29.99	6
	10.56	8.48	6.98	30.03	6
	10.52	8.41	6.95	29.96	6
	10.56	8.43	6.99	30.01	6
	10.53	8.40	6.96	30.03	6
	10.59	8.47	7.05	29.98	6
	10.57	8.46	6.97	30.00	6
	10.58	8.45	7.00	29.98	6
	10.53	8.43	7.02	30.05	6
	10.55	8.44	6.98	29.95	6
10.58	8.48	7.03	30.04	6	

*Tamaño de pozo: 6mm, por lo que al reportarse 6 mm es indicativo que no existe formación halo de inhibición

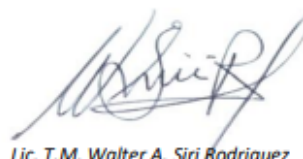
*Concentración del inoculo: 1.5×10^8 UFC/mL

Jr. Comercio N° 597 Pachacámac Telf: 2311053 Cel. 941708196- 993446913

Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm				
	75%	50%	25%	Levofloxacino 5 µg	DMSO
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	8.27	6	6	27.53	6
	8.29	6	6	27.51	6
	8.26	6	6	27.55	6
	8.30	6	6	27.51	6
	8.27	6	6	27.54	6
	8.25	6	6	27.47	6
	8.32	6	6	27.52	6
	8.27	6	6	27.50	6
	8.31	6	6	27.52	6
	8.23	6	6	27.46	6
	8.25	6	6	27.49	6
	8.26	6	6	27.48	6

*Tamaño de pozo: 6mm, por lo que al reportarse 6 mm es indicativo que no existe formación halo de inhibición

*Concentración del inoculo: 1.5×10^8 UFC/mL



Lic. T.M. Walter A. Siri Rodriguez

CTMP. 10808

Anexo 8: Certificado de Agar Mueller Hinton

HIMEDIA [®]		Certified : ISO 9001:2015, ISO 13485:2012 , WHO GMP				
<p>HiMedia Laboratories Private Limited 23, Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg, Mumbai - 400086 , Website : www.himedialabs.com, Email : info@himedialabs.com</p>						
Certificate of Analysis, Quality and Conformity						
Material Code : M173	Material Name : Mueller Hinton Agar	Lot No : 0000357521				
Report No.: 040000849057	Date of Release & Report : 2018-09-24	Expiry Date : 2023-09				
<p>Appearance Cream to yellow homogeneous free flowing powder . Observed : Light yellow</p>						
<p>Gelling Firm, comparable with 1.7% agar gel.</p>						
<p>Colour and Clarity of prepared medium Light amber coloured clear to slight opalescent gel forms in Petri plates.</p>						
<p>Reaction Reaction of 3.8% w/v aqueous solution at 25°C.</p>						
<p>pH pH Range :7.20-7.40 Observed : 7.39</p>						
<p>Cultural Response Cultural characteristics observed after incubation at 30-35°C for 18 -24 hours for bacterial cultures. For testing <i>S.pneumoniae</i> : The medium was supplemented with 5% Sheep blood and incubated at 35°C for 16-18 hours at 5% CO2 For testing <i>H.influenzae</i> : Yeast extract & 2 vials /l of Haemophilus Growth Supplement (FD117 containing 15 mg/l of Haematin + 15 mg/l of NAD) and incubated at 35°C for 20-24 hours at 5% CO2</p>						
<p>Antibiotic Sensitivity test Various discs were tested for standard ATCC strains and zone of inhibition were measured after an incubation 30-35°C for 18 hours. (As per the latest CLSI Protocol M6 & Standards as per the current CLSI M100)</p>						
<p>Thymine/Thymidine Content # The zones for these discs are indicative of the Thymine/Thymidine content of the medium.</p>						
<p>Divalent Cation Content * The zones for these discs are indicative of the Divalent Cation content of the medium</p>						
Organism	Inoculum (CFU)	Growth	Observed Lot value (CFU)	Recovery	Standard Zone	Zone of inhibition Observed
Escherichia coli ATCC 25922						
<i>Growth promoting</i>	85	luxuriant	72	84%	-	-
<i>Amoxyclav AMC 30 mcg</i>	-	-	-	-	18-24 mm	22mm
<i>Ampicillin AMP 10 mcg</i>	-	-	-	-	16-22 mm	21mm
<i>Cefotaxime CTX 30 mcg</i>	-	-	-	-	29-35 mm	33mm
<i>Cefaxitin CX 30 mcg</i>	-	-	-	-	23-29 mm	28mm
<i>Cephalothin CEP 30mcg</i>	-	-	-	-	15-21 mm	20mm



Certified : ISO 9001:2015, ISO 13485:2012 , WHO GMP

HiMedia Laboratories Private Limited

23, Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg,
Mumbai - 400086 , Website : www.himedialabs.com,
Email : info@himedialabs.com

Certificate of Analysis, Quality and Conformity

Material Code : M173	Material Name : Mueller Hinton Agar	Lot No : 0000357521
Report No.: 040000849057	Date of Release & Report : 2018-09-24	Expiry Date : 2023-09

<i>Chloramphenicol C 30 mcg</i>	-	-	-	-	21-27 mm	26mm
<i>Ciprofloxacin CIP 5mcg</i>	-	-	-	-	30-40 mm	38mm
<i>Gentamicin GEN 10 mcg</i>	-	-	-	-	19-26 mm	24mm
<i>Sulphafurazole SF 300 mcg</i>	-	-	-	-	15-23 mm	21mm
<i>Tetracycline TE 30 mcg *</i>	-	-	-	-	18-25 mm	24mm
<i>Co-Trimoxazole COT 25 mcg #</i>	-	-	-	-	23-29 mm	28mm

Staphylococcus aureus ATCC 25923

<i>Growth promoting</i>	76	luxuriant	64	84%	-	-
<i>Amoxycylav AMC 30 mcg</i>	-	-	-	-	28-36 mm	35mm
<i>Ampicillin/Sulbactam A/S 10/10 mcg</i>	-	-	-	-	29-37 mm	36mm
<i>Cephalothin CEP 30mcg</i>	-	-	-	-	29-37 mm	35mm
<i>Ciprofloxacin CIP 5mcg</i>	-	-	-	-	22-30 mm	29mm
<i>Erythromycin E 15 mcg</i>	-	-	-	-	22-30 mm	28mm
<i>Linezolid LZ 30 mcg</i>	-	-	-	-	25-32 mm	31mm
<i>Oxacillin OX 1mcg</i>	-	-	-	-	18-24 mm	23mm
<i>Pristinomyacin RP 15 mcg</i>	-	-	-	-	21-28 mm	27mm
<i>Tetracycline TE 30 mcg *</i>	-	-	-	-	24-30 mm	29mm
<i>Vancomycin VA 30 mcg</i>	-	-	-	-	17-21 mm	20mm
<i>Co-Trimoxazole COT 25 mcg #</i>	-	-	-	-	24-32 mm	31mm
<i>Cefoxitin CX 30 mcg</i>	-	-	-	-	23-29 mm	27mm

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

<i>Growth promoting</i>	83	luxuriant	71	85%	-	-
<i>Amikacin AK 30 mcg *</i>	-	-	-	-	18-26 mm	25mm
<i>Aztreonam AT 3mcg</i>	-	-	-	-	23-29 mm	27mm
<i>Cephotaxime CTX 30 mcg</i>	-	-	-	-	18-22 mm	21mm
<i>Ceftazidime CAZ 30 mcg</i>	-	-	-	-	22-29 mm	27mm
<i>Ciprofloxacin CIP 5mcg</i>	-	-	-	-	25-33 mm	31mm
<i>Gentamicin GEN 10 mcg *</i>	-	-	-	-	16-21 mm	20mm
<i>Imipenem IPM 10 mcg</i>	-	-	-	-	20-28 mm	27mm
<i>Piperacillin PI 100 mcg</i>	-	-	-	-	25-33 mm	31mm
<i>Ticarcillin/Clavulanic acid FCC 75/10mcg</i>	-	-	-	-	20-28 mm	27mm
<i>Tobramycin TOB 10 mcg *</i>	-	-	-	-	19-25 mm	23mm

Escherichia coli ATCC 35218



Certified : ISO 9001:2015, ISO 13485:2012 , WHO GMP

HiMedia Laboratories Private Limited
 23, Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg,
 Mumbai - 400086 , Website : www.himedialabs.com,
 Email : info@himedialabs.com

Certificate of Analysis, Quality and Conformity

Material Code : M173	Material Name : Mueller Hinton Agar	Lot No : 0000357521
Report No.: 040000849057	Date of Release & Report : 2018-09-24	Expiry Date : 2023-09

<i>Growth promoting</i>	75	luxuriant	63	84%	-	-
<i>Amoxyclav AMC 30 mcg</i>	-	-	-	-	17-22 mm	21mm
<i>Ampicillin AMP 10 mcg</i>	-	-	-	-	6 mm	6mm
<i>Ampicillin/Sulbactam A/S 10/10 mcg</i>	-	-	-	-	13-19 mm	18mm
<i>Piperacillin PI 100 mcg</i>	-	-	-	-	12-18 mm	16mm
<i>Piperacillin/Tazobactam PIT 100/10 mcg</i>	-	-	-	-	24-30 mm	29mm
<i>Ticarcillin TI 75 mcg</i>	-	-	-	-	6 mm	6mm
<i>Ticarcillin/Clavulanic acid TCC 75/10mcg</i>	-	-	-	-	21-25 mm	23mm

Enterococcus faecalis ATCC 29212

<i>Growth promoting</i>	69	luxuriant	58	84%	-	-
<i>Co-Trimoxazole COT 25 mcg #</i>	-	-	-	-	# 20 mm (Clear zone)	23mm
<i>Trimethoprim TR 5 mcg #</i>	-	-	-	-	# 20 mm	21mm
<i>Vancomycin VA 30 mcg</i>	-	-	-	-	# 17 mm	22mm

Staphylococcus aureus ATCC 43300 (MRSA)

<i>Growth promoting</i>	88	luxuriant	76	86%	-	-
<i>Oxacillin OX 1 mcg</i>	-	-	-	-	Very Hazy to No Zone	No zone

Sterptococcus pneumoniae ATCC 49619 (On Medium with 5% Sheep Blood)

<i>Growth promoting</i>	80	luxuriant	69	86%	-	-
-------------------------	----	-----------	----	-----	---	---

Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226 (Incubated w/5% CO2)

<i>Growth promoting</i>	71	luxuriant	63	88%	-	-
-------------------------	----	-----------	----	-----	---	---

Haemophilus influenzae ATCC 49247 (On medium w/ Y.E.,NAD & Hematin)

<i>Growth promoting</i>	84	luxuriant	72	85%	-	-
-------------------------	----	-----------	----	-----	---	---

- . ATCC is a registered trade mark of the American Type Culture Collection
- . NCTC and National Collection of Type Culture are registered trade mark of the Health Protection Agency

Control Media :

- . For Bacteria : Soyabean Casein Digest Agar / Columbia Blood Agar base enriched with 5% v/v Sheep/Horse blood.
- . For Yeast & Mold : Sabouraud Dextrose Agar.

- . All ISO 11133 : 2014(E) control strains are included in the Quality parameter
- . HiMedia Laboratories Pvt Ltd is Certified for ISO 9001:2015, ISO 13485:2012 , WHO GMP



Certified : ISO 9001:2015, ISO 13485:2012 , WHO GMP

HiMedia Laboratories Private Limited
 23, Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg,
 Mumbai - 400086 , Website : www.himedialabs.com,
 Email : info@himedialabs.com

Certificate of Analysis, Quality and Conformity

Material Code : M173	Material Name : Mueller Hinton Agar	Lot No : 000357521
Report No.: 040000849057	Date of Release & Report : 2018-09-24	Expiry Date : 2023-09

. Information for BSE/TSE Risk: The material was subjected to pH <= 7.0 and/or a temperature in excess of 75°C for no less than 2 hours during the manufacturing process. The bovine raw material for this product was collected entirely from Indian Origin animals in a licensed based establishment. The animals are inspected under a Govt. approved veterinarian's supervision and were apparently free from infectious and contagious diseases. BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy)/ TSE (Transmissible Spongiform Encephalopathy) and dioxine are not known to exist in India. This material does not contain, nor is derived from the specific risks material as defined in The Maharashtra Animal Preservation Act Govt. of Maharashtra, India.

STATUS OF THE MATERIAL : APPROVED

This is to certify that this lot passes and it confirms to the above mentioned tests and specifications . The information given here is believed to be correct and accurate, however, both the information and products are offered without warranty for any particulars use, other than that specified in the current HiMedia manual or product sheets. The results reported were obtained at the time of release.

This document has been produced electronically and is valid

Sheetal Shewale
 Microbiologist/Sr.Executive
 Microbiologist

Ujjwala M. Kokate
 Asst./Dy/QC Manager

Dr. Sanjosh Kaul
 Dy/QA Manager

24.09.2018

Anexo 9: Certificado sangre de carnero estéril**Certificado de Análisis**Fecha de Emisión
29/05/2023

Código Producto: SC001


Descripción: Sangre de Carnero, Estéril.

Lote: B01641

Fecha de Colección: 26/05/2023

Fecha de Vencimiento: 26/06/2023

El producto fue colectado empleando técnica aséptica y se comprobó la esterilidad por cultivo en medio nutritivo.


Luis Alvarado Rios
CTMP 6765

Anexo 10: Certificado taxonómico *Citrus reticulata* (Mandarina)

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. 3796
Cel: 963689079
Email: jocamde@gmail.com



CERTIFICACION DE IDENTIFICACION BOTANICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO. CBP 3796 - INSCRITO EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIONES DE IDENTIFICACION TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N.º 0311-2013-MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

CERTIFICA:

Que, IRAZABAL GALLEGOS MIRIAM y JULCA ASENJO ANA VILMA, con grado académico de Bachiller, tesis de la Universidad Norbert Wiener, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica, con fines de investigación para desarrollar el proyecto de tesis titulado: EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA CÁSCARA DE *Citrus reticulata* (MANDARINA) EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* ATCC, LIMA 2023, han solicitado la identificación y certificación botánica de una planta procedente del Fundo San Jorge, distrito de San Andrés, provincia de Pisco, departamento de Ica, donde es cultivada con el nombre común de "mandarina", la muestra fértil con flores y frutos ha sido identificada como *Citrus reticulata* Blanco. Según la base de datos de W³Tropicos del Missouri Botanical Garden que sigue el sistema moderno de clasificación de las angiospermas (APG), publicado en 1998 por el Grupo para la Filogenia de las Angiospermas, el sistema APG evita el uso de la nomenclatura taxonómica clásica por arriba de orden. - Mark W. Chase & James L. Reveal (2009 - APG III) consideran a todas las plantas verdes en la Clase Equisetopsida. Teniendo en cuenta los datos de la base de W³Tropicos, APG III y APG IV, la especie identificada tiene las siguientes categorías taxonómicas y clados:

Reino: Plantae
División: Angiospermae
Clase: Equisetopsida
Subclase: Magnoliidae
Superorden: Rosanae
Orden: Sapindales
Familia: Rutaceae
Género: *Citrus*
Especie: *Citrus reticulata* Blanco.

Nombre vulgar: "mandarina"

Se expide la presente certificación para los fines de investigación.

Lima, 13 de junio del 2023


José R. Campos De La Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

Anexo 11: Evidencias fotográficas**Figura 2.** Recolección de la muestra**Figura 3.** Recolección de la muestra**Figura 4.** Recolección de la muestra

Figura 5. Muestra de tipo *Citrus reticulata*
(mandarina)



Figura 6. Selección de la muestra

Figura 7. Lavado de la muestra





Figura 8. Enjuague con agua destilada

Figura 9. Separación de la cáscara



Figura 10. Procedimiento de secado de la muestra

Figura 11. Procedimiento de molienda de la muestra

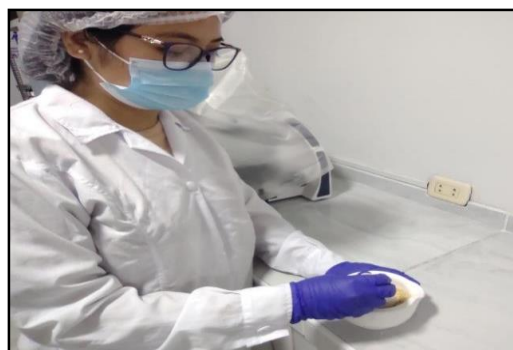




Figura 12. Preparación del macerado del extracto etanólico



Figura 13. Procedimiento de filtración del macerado del extracto etanólico

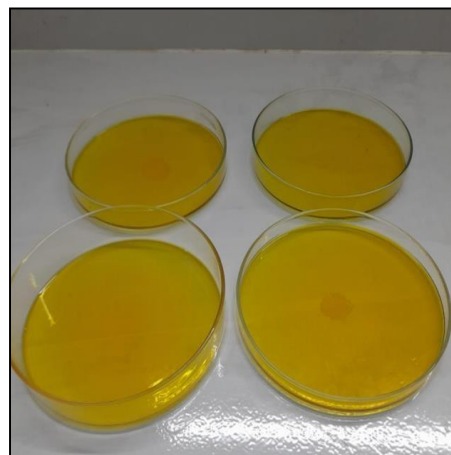
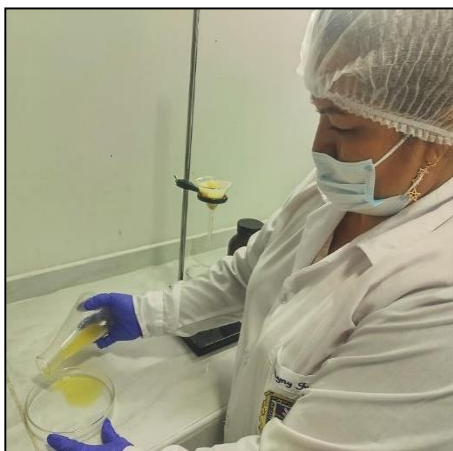


Figura 14. Obtención del extracto seco

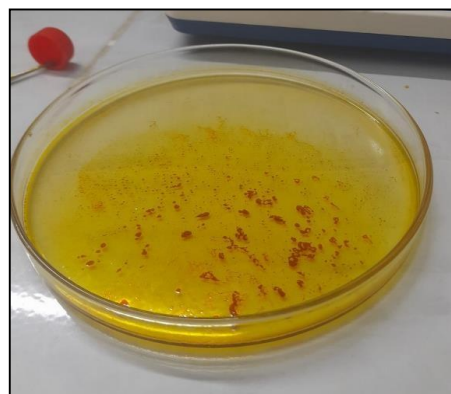


Figura 15. Obtención del extracto seco

PRUEBA DE SOLUBILIDAD



Figura 16. Añadiendo el extracto seco al tubo de ensayo para prueba de solubilidad

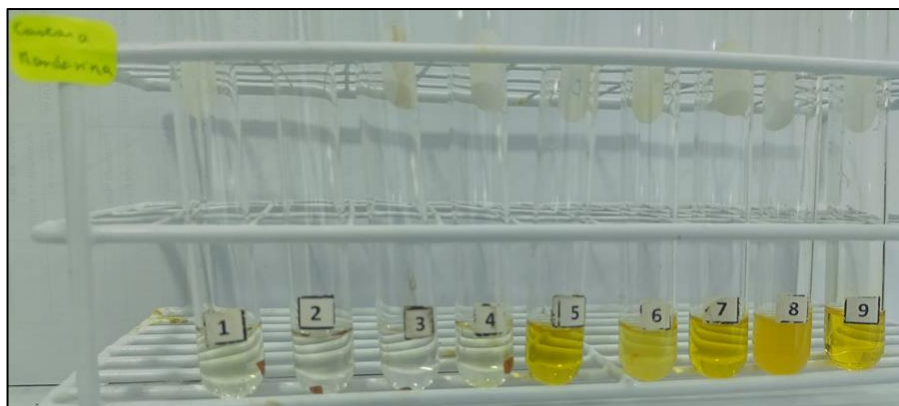


Figura 17. Resultado de la prueba de solubilidad

MARCHA FITOQUÍMICA



Figura 18. Adición del extracto seco a los tubos de ensayo

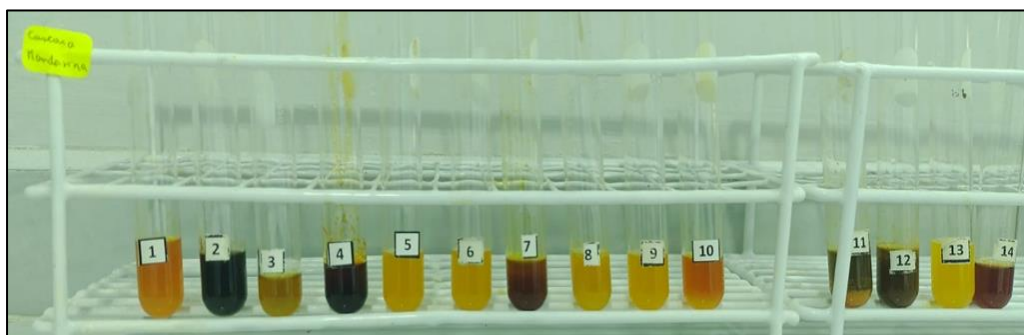


Figura 19. Resultado de la marcha fitoquímica

ENSAYO MICROBIOLÓGICO

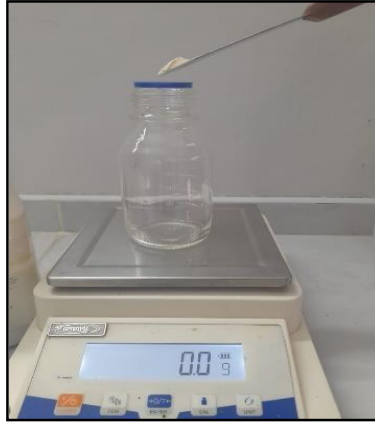


Figura 20. Pesando del Agar



Figura 21. Autoclave para el uso en la prueba microbiológica

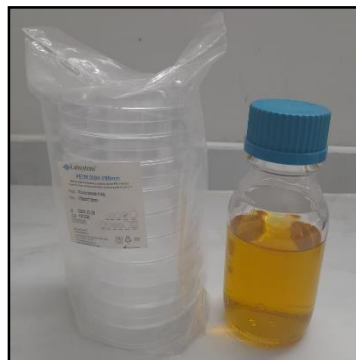


Figura 22. Agar Mueller Hinton

Figura 23. Placas preparadas de Agar sangre y Agar Mueller Hinton



Figura 24. Placas con cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922

Figura 25. Placas con *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 en jarra Gaspack

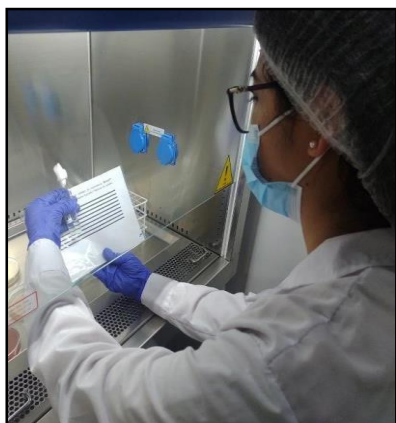


Figura 26. Comparación de turbidez mediante el reactivo de Mc. Farland



Figura 27. Rotulado de placas

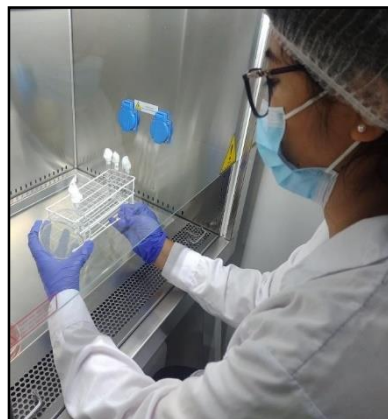


Figura 28. Sembrado de la cepa biológicas en las placas

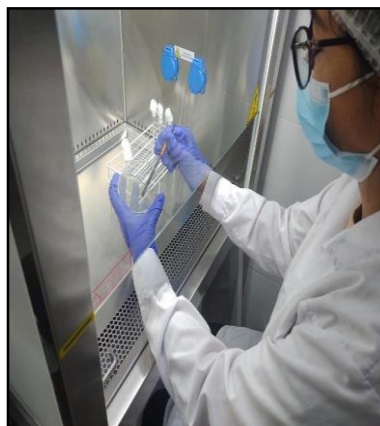
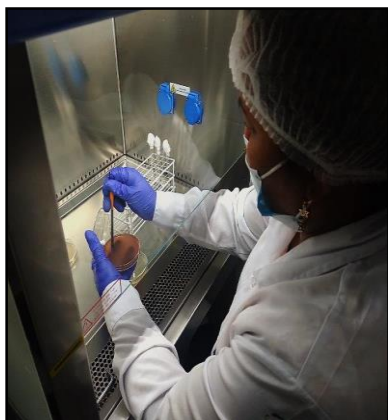


Figura 29. Efectuando pozos en agar con ayuda de un sacabocado

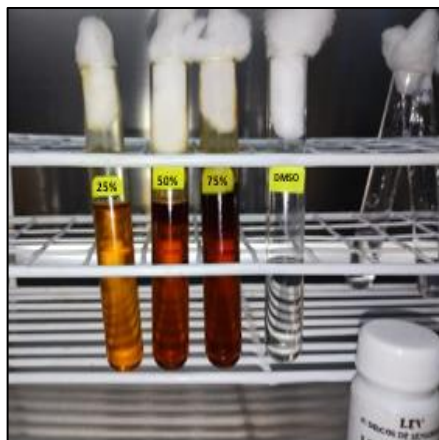


Figura 30. Sustancias experimentales y controles



Figura 31. Incubación de las cepas

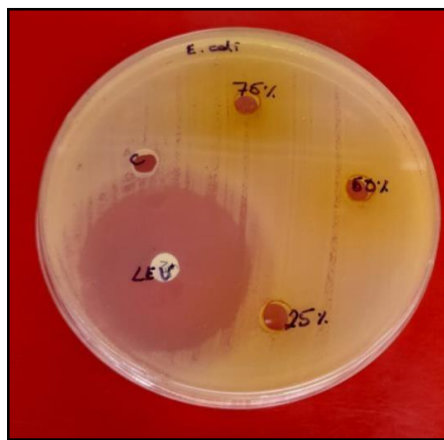


Figura 32. Lectura de resultados: *Escherichia coli* ATCC 25922

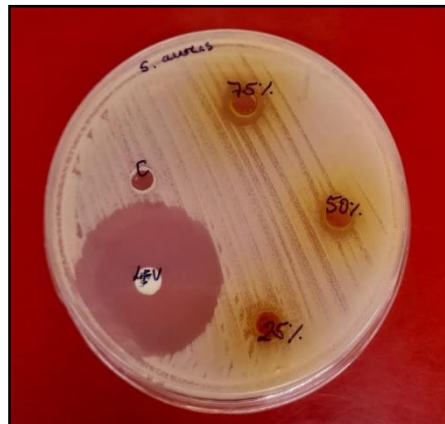


Figura 33. Lectura de resultados: *Staphylococcus aureus* ATCC25923

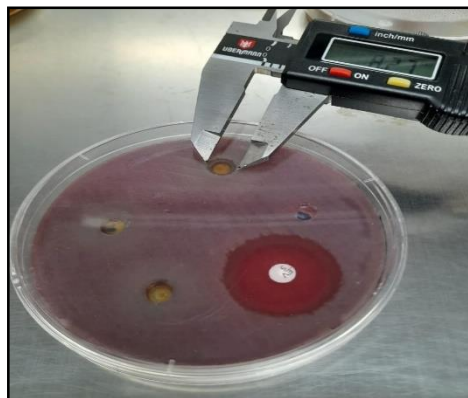
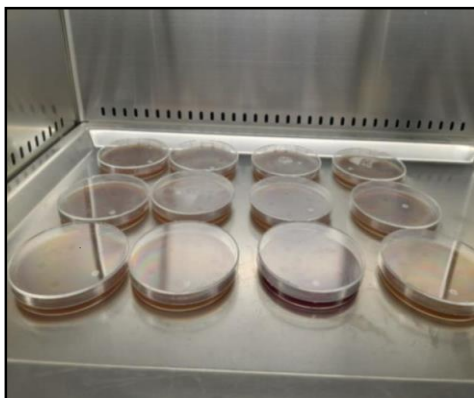







Figura 34. Lectura de resultados: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

Anexo 12: Certificado de análisis de cepas bacterianas

	
Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release	
Specifications Microorganism Name: Streptococcus pyogenes (group A) Catalog Number: 0385 Lot Number: 385-248** Reference Number: ATCC® 19615™** Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2024/10/31 Release Information: Quality Control Technologist: Mariah H Smith Release Date: 2022/12/16
Performance	
Macroscopic Features: Two colony types, both are circular, convex, entire edge; one is medium & beta hemolytic, other is small and alpha hemolytic, turning to beta as culture ages.	Medium: SBAP
Microscopic Features: Gram positive cocci	Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase(3% Hydrogen Peroxide): negative Bacitracin differential: Sensitive
 Amanda Kuperus Director of Quality Control AUTHORIZED SIGNATURE	
<p>**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;">  ACCREDITED REFERENCE MATERIAL PRODUCER CERT #2655.02 </div> <div style="text-align: center;">  ATCC Licensed Derivative </div> <div style="text-align: center;"> <p>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologica, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> <p>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.</p> </div> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  ACCREDITED TESTING CERT #2655.01 </div>	
© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303	
Page 1 of 1	DOC.286



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 0360 Lot Number: 360-575** Reference Number: ATCC® 25923™** Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2024/10/31 Release Information: Quality Control Technologist: Mariah H Smith Release Date: 2022/11/22
---	---

Performance	
Macroscopic Features: Medium to large, convex, entire edge, both white and pale white colonies, SBAP smooth, opaque, beta hemolytic	Medium: SBAP
Microscopic Features: Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters	Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 27 - 35 mm (1) Penicillin (10 units - Disk Susceptibility): 26 - 37 mm (1) Oxacillin (1 mcg - Disk Susceptibility): 18 - 24 mm
	 Amanda Kuperus Director of Quality Control AUTHORIZED SIGNATURE

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.





Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Escherichia coli Catalog Number: 0335 Lot Number: 335-552** Reference Number: ATCC® 25922™** Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2024/8/31 Release Information: Quality Control Technologist: Mariah H Smith Release Date: 2022/11/21
--	--

Macroscopic Features: 2 colony types, both are gray & beta hemolytic; one is circular to irregular, convex, slightly erose edge & smooth, other is larger, irregular, low convex, erose edge & rough Microscopic Features: Gram negative straight rod	Performance Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 15 - 22 mm (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 19 - 26 mm (1) SXT (1.25/23.75 mcg - Disk Susceptibility): 23 - 29 mm
	 Amanda Kuperus Director of Quality Control AUTHORIZED SIGNATURE

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.




(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.



Anexo 13: Constancia de autorización de análisis



“Año de la unidad, la paz y el desarrollo”

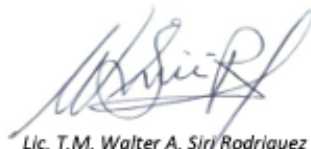
Constancia

El que suscribe Lic. T.M. Walter A. Siri Rodriguez encargado de supervisar el presente trabajo de investigación en el Laboratorio Biológico y Análisis Clínico Santa Rosa E.I.R.L., hace constar que:

Las tesis egresadas de la EAP de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Privada Norbert Wiener, JULCA ASENJO ANA VILMA e IRAZABAL GALLEGOS MIRIAM BELEN; realizaron ensayos microbiológicos para el desarrollo de su proyecto de tesis titulado: “Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus reticulata* (Mandarina) en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* ATCC, Lima 2023.” dentro de las instalaciones del Laboratorio.

Se expide la presente constancia a solicitud de los interesados, para los fines correspondientes.

Lima 09 de junio del 2023.



Lic. T.M. Walter A. Siri Rodriguez
CTMP. 10808

Anexo 14: Pruebas de Normalidad

Tabla 10.

Pruebas de normalidad

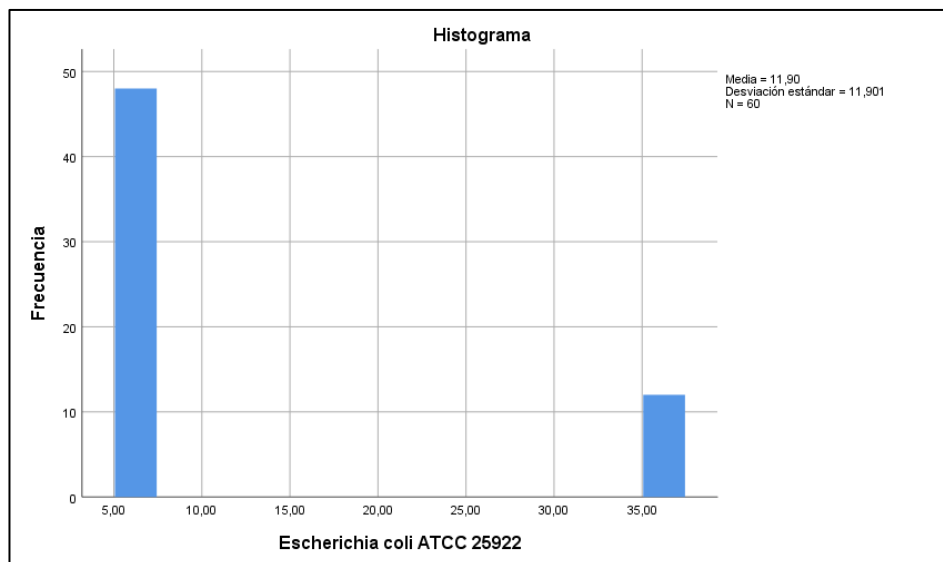
	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,490	60	0,000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,633	60	0,000
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	0,554	60	0,000

Con el fin de poner a prueba la hipótesis, se llevaron a cabo análisis de normalidad mediante tablas y gráficos, así como pruebas de igualdad de varianzas.

Los datos proporcionados en la tabla 10, indican que ($p < 0.05$), según el análisis de Shapiro-Wilk. Esta prueba respalda la inferencia de que los resultados no siguen una distribución normal.

Figura 35.

Histograma según Escherichia coli ATCC 25922



Nota. Irazabal y Julca (2023)

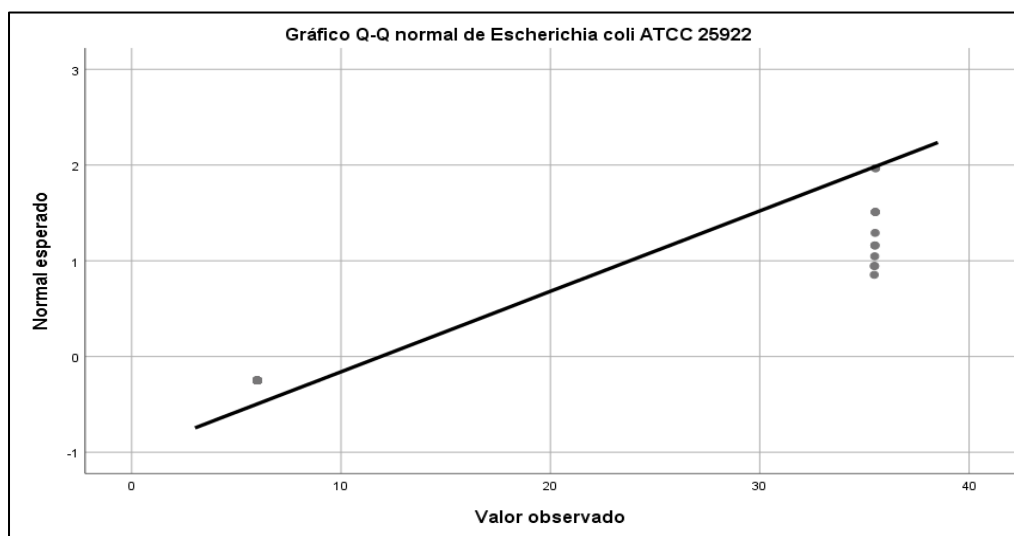
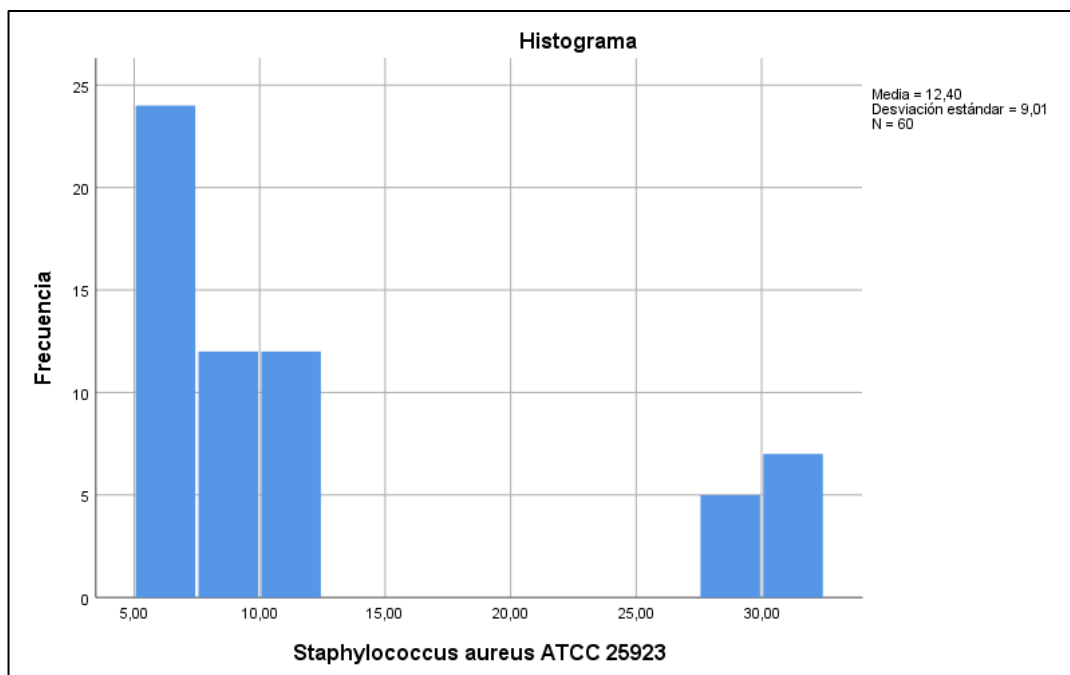
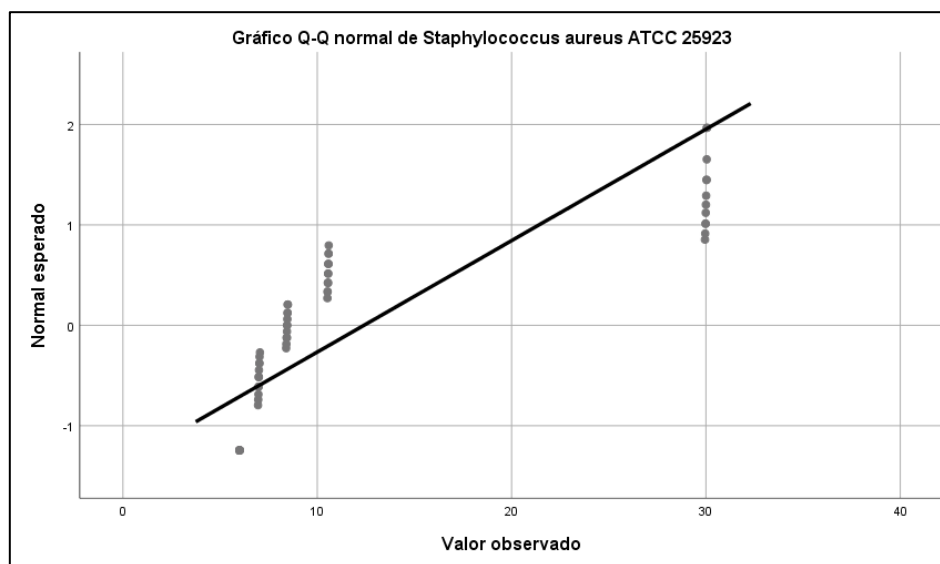
Figura 36.*Gráfico Q-Q según Escherichia coli ATCC 25922***Nota.** Irazabal y Julca (2023)**Figura 37.***Histograma según Staphylococcus aureus ATCC 25923***Nota.** Irazabal y Julca (2023)

Figura 38.

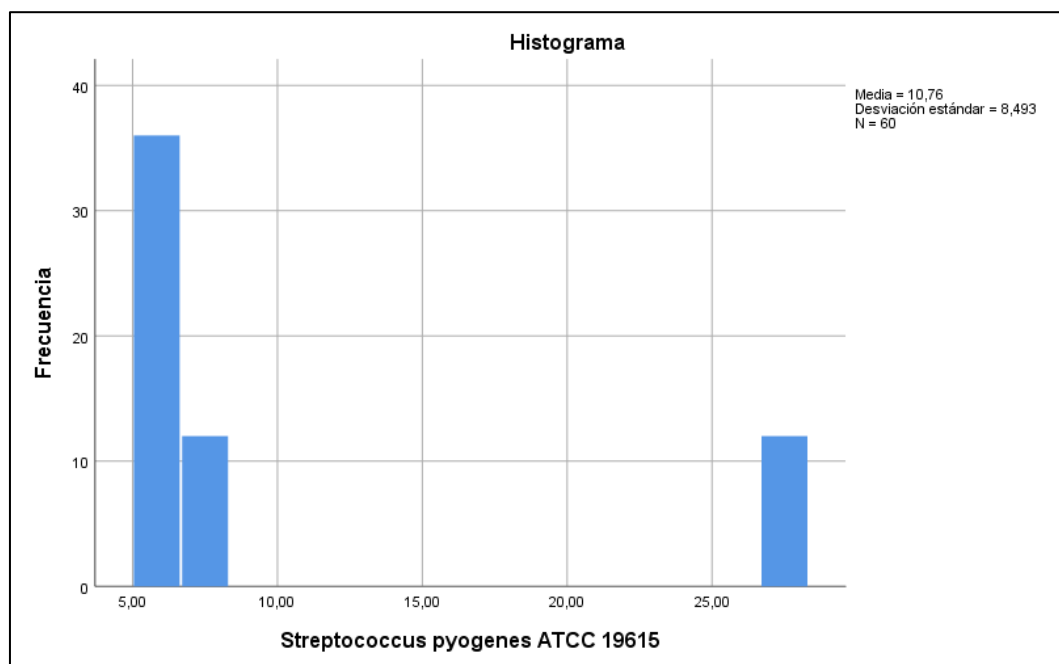
Gráfico Q-Q según *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



Nota. Irazabal y Julca (2023)

Figura 39.

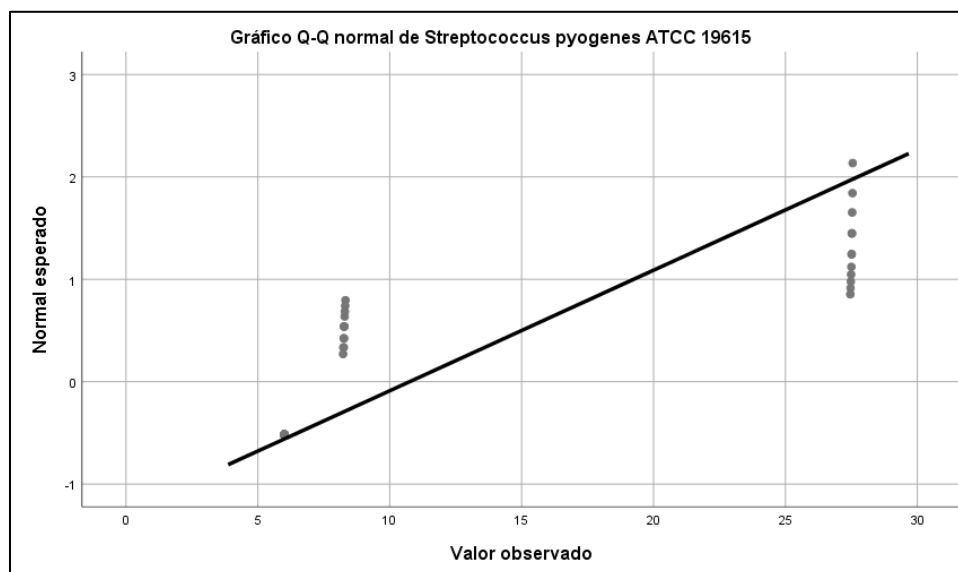
Histograma según *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615



Nota. Irazabal y Julca (2023)

Figura 40.

Gráfico Q-Q según *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615



Nota. Irazabal y Julca (2023)

Tabla 11.

Prueba de homogeneidad

Pruebas de homogeneidad de varianzas				
	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	39,762	4	55	0,000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	8,567	4	55	0,000
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	18,392	4	55	0,000

En la tabla 11, Con el propósito de verificar la igualdad de las dispersiones en las cepas ATCC, se empleó el test de Levene, el cual reveló un nivel de significancia ($p < 0.05$). Este resultado

indica que las dispersiones no son uniformes, lo que implica la utilización de métodos estadísticos no paramétricos.

Con el objetivo de contrastar la tercera hipótesis específica, se utilizó el estadístico de H de Kruskal-Wallis, el cual es una prueba no paramétrica empleada para determinar si existe diferencia entre las poblaciones, como los diversos grupos de investigación que abarcan el extracto de cáscara de *Citrus reticulata* (mandarina) al 25%, 50% y 75%, y controles. Además, se empleó un cuadro estadístico para llevar a cabo comparaciones múltiples de las variaciones heterogéneas, como el T3 de Dunnett.

Tabla 12.

Prueba de Rangos de H de Kruskal-Wallis

Rangos			
	Grupo 1	N	Rango promedio
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Levofloxacino 5 µg	12	54,50
	DMSO	12	24,50
	25 %	12	24,50
	50 %	12	24,50
	75 %	12	24,50
	Total	60	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Levofloxacino 5 µg	12	54,50
	DMSO	12	6,50
	25 %	12	18,50
	50 %	12	30,50
	75 %	12	42,50
	Total	60	
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Levofloxacino 5 µg	12	54,50
	DMSO	12	18,50
	25 %	12	18,50
	50 %	12	18,50
	75 %	12	42,50
	Total	60	

Tabla 13.*Pruebas de H de Kruskal-Wallis*

Estadísticos de prueba^{a,b}			
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615
H de Kruskal-Wallis	58,063	57,134	57,821
gl	4	4	4
Sig. asin.	0,000	0,000	0,000
a. Prueba de Kruskal Wallis			
b. Variable de agrupación: Grupo1			

En la tabla 13, El análisis de Kruskal-Wallis es estadísticamente relevante, lo cual indica que al menos dos de los grupos comparados presentan diferencias significativas. Sin embargo, esta prueba no proporciona detalles sobre qué grupos específicos presentan estas diferencias, por eso es necesario realizar pruebas de comparación múltiple T3 de Dunnett.

● 12% de similitud general

Principales fuentes encontradas en las siguientes bases de datos:

- 12% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 3% Base de datos de trabajos entregados
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

FUENTES PRINCIPALES

Las fuentes con el mayor número de coincidencias dentro de la entrega. Las fuentes superpuestas no se mostrarán.

1	repositorio.uma.edu.pe Internet	4%
2	repositorio.unid.edu.pe Internet	1%
3	repositorio.ucv.edu.pe Internet	<1%
4	intra.uigv.edu.pe Internet	<1%
5	repositorio.uigv.edu.pe Internet	<1%
6	repositorio.upao.edu.pe Internet	<1%
7	repositorio.uwiener.edu.pe Internet	<1%
8	cybertesis.unmsm.edu.pe Internet	<1%