

EFECTO INHIBITORIO DEL JUGO Y DESECADO DEL JUGO DE LIMÓN

Citrus aurantifolia EN *Staphylococcus aureus* Y *Escherichia coli*

INHIBITORY EFFECT OF THE JUICE AND DESICCATED OF THE
LEMON JUICE

Citrus aurantifolia IN *Staphylococcus aureus* ANDEscherichia coli

Olinda del Pilar Bustamante Canelo¹
Edgardo Delgado Ramos²

Fecha de recepción: 15 enero 2015

Fecha de aceptación: 22 abril 2015

Resumen

*En la presente investigación se evaluó el efecto inhibitorio del jugo y desecado del jugo de limón **Citrus aurantifolia** en **S.aureus** y **E. coli**. El jugo de limón se obtuvo previa eliminación de la cáscara y el desecado, colocando el jugo a 40°C por 7 días. El jugo se empleó a concentraciones de 10, 20 y 30% probadas durante 30, 60 y 90 min. y el desecado a 3, 6 y 9% por 5, 10 y 15 min. El jugo de limón a concentraciones de 10, 20 y 30% por 90 min. inhibió las UFC/ml de **S. aureus** de 7.5 x 10⁷ UFC/ml a 9.58 x 10⁴, 1.05 x 10⁴ y 18.5 respectivamente. A las mismas concentraciones y*

1 Adscrita en la Escuela de Estomatología, Universidad Señor de Sipán. Magíster en Ciencias Mención en Ingeniería Ambiental. Laboratorio de Investigación del Hospital Regional Lambayeque, Chiclayo, Perú. Email: olypibuca@hotmail.com

2 Adscrito en Instituto de Medicina Legal, Lima, Perú. Microbiólogo. Email: edelrrems@hotmail.com

tiempo las UFC/ml de **E.coli** disminuyeron a 28.3, 3.3 y 0. El desecado del jugo de limón al 3, 6 y 9% en 15 min. disminuyó las UFC/ml de 7.5×10^7 UFC/ml hasta 2.26×10^4 , 2.98×10^3 , 3.13×10^2 respectivamente en **S. aureus** mientras que en **E. coli** la inhibición fue 1.25×10^2 , 5 y 0.

Las cepas de **E. coli**, tanto para el jugo como para el desecado del jugo de limón, fueron más sensibles que **S. aureus**. Así mismo, existen diferencias estadísticas entre la sensibilidad de las cepas de **S. aureus** pero no entre la sensibilidad de las cepas de **E. coli**. El desecado del jugo de limón tiene mayor poder de inhibición del crecimiento bacteriano que el jugo de limón.

Palabras clave: desecado del jugo de limón, efecto inhibitorio, jugo de limón.

Abstract

In this investigation it was evaluated the inhibitory effect of the juice and desiccated of the lemon juice **Citrus aurantifolia** in **S.aureus** and **E. coli**. The lemon juice was obtained previous elimination of the rind and the desiccated placing the juice at 40°C for 7 days. The juice used to concentrations of 10, 20 and 30 % proved during 30, 60 and 90 min. and the desiccated to 3, 6 and 9 % for 5, 10 and 15 min. The lemon juice of the concentrations of 10, 20 and 30 % for 90 min. inhibited the UFC/ml of **S. aureus** of 7.5×10^7 UFC/ml to 9.58×10^4 , 1.05×10^4 and 18.5 respectively. To the same concentrations and time the UFC/ml de **E.coli** diminished to 28.3, 3.3 and 0. The desiccated of the lemon juice to 3, 6 and 9 % in 15 min. diminished the UFC/ml of 7.5×10^7 UFC/ml to 2.26×10^4 , 2.98×10^3 , 3.13×10^2 respectively in **S. aureus** whereas in **E. coli** the inhibition was 1.25×10^2 , 5 and 0.

The cultures of **E. coli**, both for the juice and for the desiccated of the juice, were more sensitive than **S. aureus**. Likewise, there were statistical differences between the sensibility of the cultures of **S. aureus** but not between the sensibility of the cultures of **E. coli**. The desiccated lemon juice has a higher power of inhibition of the bacterial growth than the lemon juice.

Keywords: desiccated of the juice of lemon, inhibitory effect, juice of lemon.

1. Introducción

En nuestra región el cultivo de limón representa una actividad productiva significativa lo que conlleva a ampliar las posibilidades de aprovechamiento de este recurso natural, de manera particular del jugo y desecado del jugo de limón a los cuales se les atribuye múltiples aplicaciones medicinales y son de mucho uso en la preparación de alimentos y bebidas. En

el campo medicinal, el jugo y el polvo desecado del limón se usa para tratar afecciones respiratorias, gastrointestinales, genitourinarias, heridas, llagas y quemaduras; en gargarismos para afecciones de la boca y garganta y en colirios para conjuntivitis (Cáceres, 1996). El poder antibacteriano se debe a los ácidos que posee el jugo, entre ellos el ácido cítrico que se encuentra en mayor proporción y a los ácidos málico, acético y fórmico que están en menor cantidad (Font Quer, 1997).

La acción inhibitoria del limón ha sido demostrada en productos como el aceite de limón, el cual tiene ácidos volátiles como el D-limoneno y el citral; el jugo y el desecado del jugo de limón, aunque no contienen ácidos volátiles, su composición en ácido cítrico y acético, entre otros, también le confieren efectos antimicrobianos (Francia y Aguayo, 1993). La ventaja de estos últimos productos respecto a los primeros, radica principalmente en su forma de obtención la cual puede realizarse aún bajo condiciones domésticas. Resulta obvio que no todo microorganismo puede ser inhibido por los mismos mecanismos, de ahí la importancia de determinar el efecto inhibitorio del jugo y desecado del jugo de limón sobre las diferentes especies bacterianas, de manera particular sobre los patógenos comúnmente identificados.

Staphylococcus aureus es considerado como el principal patógeno humano capaz de colonizar e infectar tanto al individuo sano como al inmunocomprometido y es predominante en infecciones de la piel (Morell 1998). Así mismo, en forma frecuente ha sido identificado como el responsable de enfermedades supurativas siendo las más comunes dermatitis, foliculitis, otitis y abscesos entre otras. Así mismo, ocupa el segundo lugar después de ***Escherichia coli*** como causa de infecciones adquiridas en el hospital. Por su parte ***Escherichia coli*** es el principal patógeno humano aislado de infecciones de vías urinarias y de heridas e implicado en enfermedades gastrointestinales (Joklik et al 1997). La importancia tanto de ***Staphylococcus aureus*** como de ***Escherichia coli*** deriva de su aumento progresivo de resistencia a antibióticos y a agentes externos lo que permite difundirse, producir infecciones y agravar los cuadros clínicos de los pacientes, prolongando su recuperación (Vergara y Delgado, 1993).

Esto conlleva a buscar alternativas en el campo de la medicina tradicional para el tratamiento de infecciones producidas por las mencionadas bacterias, particularmente de aquellas que requieren de un tratamiento local.

Por todo esto se plantea el presente estudio a fin de:

- Determinar el efecto inhibitorio del jugo de limón *Citrus aurantifolia* a concentraciones de 30, 20 y 10% aplicados por 30, 60 y 90 minutos en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

- Determinar el efecto inhibitorio del desecado del jugo de limón *Citrus aurantifolia* al 9, 6 y 3% aplicados por 5, 10 y 15 minutos en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

- Comparar el efecto inhibitorio del jugo de limón y el efecto inhibitorio del desecado del jugo de limón con *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

2. Material y métodos

En la presente investigación se utilizó material biológico: Jugo de limón "*Citrus aurantifolia*", desecado del jugo de limón. 2 cepas de *Staphylococcus aureus* y 2 cepas de *Escherichia coli*, aisladas del Laboratorio de Patología y Análisis Clínico del Hospital Provincial Docente Belén de Lambayeque.

Para la preparación y estandarización del inóculo, las cepas se sembraron en caldo nutritivo y se incubaron a 37°C por 24 horas, ajustándose la densidad poblacional al tubo N° 0.5 (1.5 x 10⁸ bacterias/ml) de la escala de Mac Farland, utilizando agua destilada estéril como diluyente (Al-Delaimy and Ali, 1970).

El jugo de limón se obtuvo por medio de un exprimidor, previa eliminación de la cáscara. Se preparó tres concentraciones: 30%, 20% y 10%. La suspensión bacteriana contenida en las concentraciones (7.5 x 10⁷ UFC/ml) se sometió a la acción del jugo de limón por periodos de 30, 60 y 90 minutos.

Una suspensión semejante se enfrentó al desecado del jugo de limón a concentraciones de 3, 6 y 9 % por periodos de 5, 10 y 15 minutos.

Luego de la exposición bacteriana, tanto al jugo de limón como al desecado de este, se tomó 0.1 ml de cada concentración y se depositó en la superficie del agar (2 placas por cada tiempo). Rápidamente se extendió la alícuota sobre la superficie utilizando espátula de Drigalsky (una espátula distinta por cada placa), luego se dejó secar la superficie del agar por 15 minutos y posteriormente las placas fueron invertidas e incubadas a 37 °C durante 24 horas, pasadas las cuales se realizó el recuento de UFC/ml.

Para el análisis estadístico de los datos se empleó el Análisis de Varianza (ANAVA), ajustándose al diseño factorial 4 x 3 x 3 para establecer las diferencias entre cepas, concentraciones y tiempos de exposición para cada forma de presentación del limón. El análisis estadístico de estas diferencias se complementó con la prueba de Tukey (0.05); para ello se utilizó el software Estadístico SPSS 18.

3. Resultados

A. Del jugo de limón

Teniendo en cuenta la concentración inicial de UFC/ml de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (7.5×10^7 UFC/ml) expuestas al jugo y los promedios de UFC/ml encontrados se observa que hubo una disminución de UFC/ml tanto al incrementarse los tiempos de exposición como las concentraciones del jugo de limón (Figura 1).

De acuerdo a los promedios de UFC/ml de *S. aureus* se observó que a menor concentración y tiempo de exposición para el jugo de limón (10% por 30 min.) se alcanzó un promedio de 5.75×10^6 UFC/ml y a mayor concentración y tiempo de exposición (30% por 90 min.) se alcanzó un promedio de 18.5 UFC/ml. (Tabla 1).

Tabla 1

Concentración de Staphylococcus aureus (UFC/ml) en el efecto inhibitorio del jugo de limón.

Tiempo (Min)	CONC %	R1		R2		R3		Promedio
		A1	A2	A1	A2	A1	A2	
30	10	6×10^6	5.8×10^6	5.9×10^6	5.2×10^6	6.2×10^6	5.4×10^6	5.75×10^6
	20	1.18×10^6	1.3×10^6	1.16×10^6	1.1×10^6	1.2×10^6	1.2×10^6	1.19×10^6
	30	4.04×10^5	3.92×10^5	4×10^5	3.67×10^5	4.05×10^5	3.8×10^5	3.91×10^5
60	10	1.86×10^6	1.77×10^6	1.81×10^6	1.6×10^6	1.93×10^6	1.75×10^6	1.71×10^6
	20	1.4×10^5	1.1×10^5	1.4×10^5	1.02×10^5	1.5×10^5	1.06×10^5	1.25×10^5
	30	2.6×10^3	2.3×10^3	2.5×10^3	2.1×10^3	2.9×10^3	2.2×10^3	2.43×10^3
90	10	1×10^5	9×10^4	1×10^5	8×10^4	1.2×10^5	8.5×10^4	9.58×10^4
	20	1.08×10^4	1.05×10^4	1.04×10^4	1×10^4	1.1×10^4	1.2×10^4	1.05×10^4
	30	20	18	19	15	22	17	18.5

Fuente: *Elaboración propia*

CONC. = Concentración

R = Repetición

A1 y A2 = *Staphylococcus aureus*

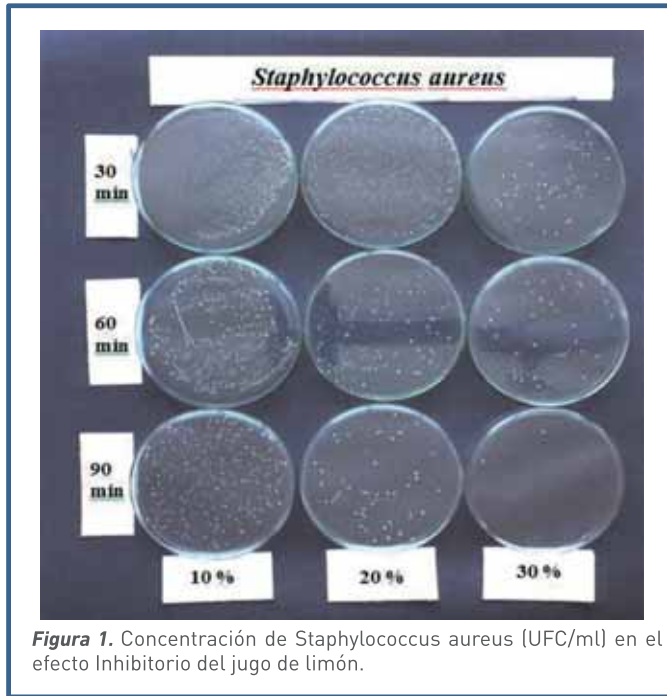


Figura 1. Concentración de Staphylococcus aureus (UFC/ml) en el efecto Inhibitorio del jugo de limón.

En la tabla 2 se aprecian los resultados del efecto inhibitorio del jugo de limón sobre *Escherichia coli* a una concentración de 7.5×10^7 UFC/ml. A 10% del jugo de limón aplicado por 30 minutos las UFC/ml fueron 6.25×10^2 y a 30% de concentración expuesta por 90 minutos no se obtuvieron UFC de *Escherichia coli*

Tabla 2

Concentración de *Escherichia coli* (UFC/ml) en el efecto inhibitorio del jugo de limón.

Tiempo (Min)	CONC %	R1		R2		R3		Promedio
		E1	E2	E1	E2	E1	E2	
30	10	6×10^2	4.2×10^2	7.8×10^2	6.1×10^2	7.4×10^2	6×10^2	6.25×10^2
	20	4×10^2	2.8×10^2	6.3×10^2	4.3×10^2	5.6×10^2	3.9×10^2	4.48×10^2
	30	1.7×10^2	1.1×10^2	4×10^2	2.6×10^2	3.2×10^2	2.2×10^2	2.47×10^2
60	10	1.2×10^2	70	4.8×10^2	2.8×10^2	2.8×10^2	1.6×10^2	2.32×10^2
	20	80	40	1.4×10^2	90	1.3×10^2	60	90
	30	30	10	80	50	50	30	41.6
90	10	20	20	50	30	30	20	28.3
	20	10	0	0	0	10	0	3.3
	30	0	0	0	0	0	0	0

Fuente: *Elaboración propia*

CONC. = Concentración

R= Repetición

A1 y A2 = **Escherichia coli**

El efecto inhibitorio del jugo de limón se evaluó a través del ANAVA (Tabla 3), encontrándose diferencias estadísticas significativas tanto para los promedios de UFC/ml hallados en cepas, concentraciones y tiempos, así como en sus interacciones.

CEPAS :

$$H_0 : U_{s,a} = U_{e,c}$$

CONCENTRACIONES:

$$H_0 : K_{10} = K_{20} = K_{30}$$

TIEMPOS:

$$H_0 : T_{30} = T_{60} = T_{90}$$

INTERACCIONES:

H_0 : No existen diferencias significativas entre las interacciones.

Tabla 3

Análisis de Varianza del efecto inhibitorio del jugo de limón a tres concentraciones y tres tiempos de exposición en Staphylococcus aureus y Escherichia coli.

FV	GL	CM	Fc	Ft 0,05	Decisión
CEPAS (C)		2.11398721	12641.22	2.700	RECHAZAR H_0
CONCENTRACIÓN (K)	3	170.87783600	1021815.19	2.700	RECHAZAR H_0
TIEMPO (T)	2	170.87783600	13238.44	3.090	RECHAZAR H_0
C x K	9	0.81254262	4858.84	1.970	RECHAZAR H_0
C x T	6	0.73667943	4405.19	2.190	RECHAZAR H_0
K x T	6	0.61685574	3688.67	2.190	RECHAZAR H_0
C x K x T	18	0.20566428	1229.17	1.715	RECHAZAR H_0
ERROR	96	0.00016723			
TOTAL	143	177.57759302			

Fuente: *Elaboración propia*

FV = Fuente de variación

GL = Grados de libertad

CM= Cuadrados medios

Los promedios de UFC/ml de Staphylococcus aureus y Escherichia coli obtenidos después de la exposición bacteriana al jugo de limón, fueron sometidos a la prueba de Tukey, según la cual el jugo de limón produjo un efecto inhibitorio diferente en las cepas de S. aureus; sin embargo, sobre las cepas de E. coli el efecto fue similar (Tabla 4).

Tabla 4

Prueba de significación de Tukey (0.05) del Promedio de UFC ml de cepas de S. aureus y E. coli en el efecto inhibitorio del jugo de limón.

CEPAS	PROMEDIOS	SIGNIFICANCIA
S. aureus (C1)	1.583128	a
S. aureus (C 2)	1.563810	b
E. coli (C3)	1.154006	c
E. coli (C4)	1.153935	c

Fuente: *Elaboración propia*

Letras diferentes: Diferencia significativa

Estadísticamente se demostró que los promedios de UFC/ml de los microorganismos expuestos a las diferentes concentraciones de jugo limón (0%, 10% y 30%) fueron diferentes, demostrándose que a mayor concentración del producto menor promedio de UFC de microorganismos (Tabla 5).

Tabla 5

Prueba de significación de Tukey (0.05) del Promedio de UFC ml de cepas de S. aureus y E. coli en el relación a las concentraciones en el efecto inhibitorio del jugo de limón.

CONCENTRACIONES	PROMEDIOS	SIGNIFICANCIA
0 %	4.6151200	a
10 %	0.5828444	b
20 %	0.1863390	c
30 %	0.0705756	d

Fuente: *Elaboración propia*

Letras diferentes: Diferencia significativa

En relación al factor tiempo se determinó estadísticamente que el promedio de UFC/ ml de las cepas empleadas es diferente, siendo menor cuando el microorganismo ha sido expuesto por mayor tiempo al producto (Tabla 6).

Tabla 6

Prueba de significancia de Tukey (0.05) del Promedio de UFC ml de S. aureus y E. coli en relación a los tiempos de exposición en el efecto inhibitorio del jugo de limón

TIEMPOS (Min.)	PROMEDIOS	SIGNIFICANCIA
30	1.594970	a
60	1.325650	b
90	1.170540	c

Fuente: *Elaboración propia*

Letras diferentes: Diferencia significativa

B. Del desecado del jugo de limón

En la siguiente tabla se muestran las UFC/ml de *Staphylococcus aureus* obtenidas después de su exposición al desecado del jugo de limón, las 7.5×10^7 UFC/ml de concentración bacteriana inicial, también disminuyen, observándose que a menor concentración del desecado (3%) expuesto por menos tiempo (5 minutos) alcanzó un promedio de 7.45×10^4 UFC/ml y que a mayor concentración y tiempo (9% en 15 minutos) se alcanzó un promedio de 3.13×10^3 UFC/ml (Tabla 7).

Tabla 7

Concentración de S. aureus (UFC ml) en el efecto inhibitorio del desecado del jugo de limón.

Tiempo (Min)	CONC %	R1		R2		R3		Promedio
		A1	A2	A1	A2	A1	A2	
5	3	6.95×10^4	7.88×10^4	7×10^4	7.38×10^4	7.5×10^4	7.99×10^4	7.45×10^4
	6	1.95×10^4	2.9×10^4	2.27×10^4	2.27×10^4	2.8×10^4	3×10^4	2.53×10^4
	9	9.8×10^3	1.6×10^4	1.07×10^4	1.2×10^4	1.22×10^4	1.61×10^4	1.28×10^4
10	3	3.68×10^4	4.7×10^4	4.01×10^4	4.1×10^4	4.6×10^4	4.93×10^4	4.34×10^4
	6	6.23×10^3	8.56×10^3	7.2×10^3	7.93×10^3	8.2×10^3	8.8×10^3	7.82×10^3
	9	1.42×10^3	2.8×10^3	2×10^3	2.34×10^3	2.72×10^3	3.1×10^3	2.4×10^3
15	3	1.99×10^4	2.4×10^4	2.1×10^4	2.24×10^4	2.33×10^4	2.5×10^4	2.26×10^4
	6	2.2×10^3	3.2×10^3	2.96×10^3	3.14×10^3	3.05×10^3	3.3×10^3	2.98×10^3
	9	1.7×10^2	3.7×10^2	3×10^2	3.3×10^2	3.2×10^2	3.9×10^2	3.13×10^2

Fuente: *Elaboración propia*

CONC. = Concentración R= Repetición A1 y A2 = *Staphylococcus aureus*

En la tabla 8 se presentan los resultados del efecto inhibitorio del desecado del jugo de limón sobre *Escherichia coli*. Se observa que a menor concentración y tiempo de exposición (3% en 5 minutos), se alcanzó un promedio de 2.89×10^3 UFC/ml y que a mayor concentración y tiempo (9% en 15 minutos) hubo una inhibición total de las UFC.

Tabla 8

Concentración de *E. coli* (UFC ml) en el efecto inhibitorio del desecado del jugo de limón.

Tiempo (Min)	CONC %	R1		R2		R3		Promedio
		E1	E2	E1	E2	E1	E2	
5	3	2.8X10 ³	2.77X10 ³	2.79X10 ³	2.9X10 ³	2.97X10 ³	3.1X10 ³	2.89X10 ³
	6	2.9X10 ²	2.3X10 ²	2.7X10 ²	3X10 ²	3.2X10 ²	4.1X10 ²	3.03X10 ²
	9	90	80	60	80	1X10 ²	1X10 ²	85
10	3	5.4X10 ²	4.9X10 ²	5.8X10 ²	6.4X10 ²	6.6X10 ²	7X10 ²	6.02X10 ²
	6	80	60	50	70	70	80	68.3
	9	20	10	20	30	20	50	25
15	3	1.1X10 ²	1X10 ²	1.2X10 ²	1.2X10 ²	1.4X10 ²	1.6X10 ²	1.25X10 ²
	6	10	0	20	0	0	20	5
	9	0	0	0	0	0	0	0

Fuente: *Elaboración propia*

CONC. = Concentración

R= Repetición

A1 y A2 = *Escherichia coli*

Estadísticamente el efecto inhibitorio del desecado del jugo de limón se evaluó a través del ANAVA (Tabla 9), se encontró diferencias estadísticas significativas, tanto para los promedios de UFC/ml hallados en cepas, concentraciones y tiempos, así como sus interacciones.

CEPAS

: Ho : $U_{S.a} = U_{E.c}$

CONCENTRACIONES

: Ho : $K_3 = K_6 = K_9$

TIEMPOS

: Ho : $T_5 = T_{10} = T_{15}$

INTERACCIONES

: Ho : No existen diferencias significativas entre la

interacciones.

Tabla 9

*Análisis de Varianza del efecto inhibitorio del desecado del jugo de limón a tres concentraciones y tres tiempos de exposición en **Staphylococcus aureus** y **Escherichia coli**.*

FV	GL	CM	Fc	Ft 0.05	Decisión
CEPAS (C)	3	0.00496	1382.5	2.700	RECHAZAR Ho
CONCENTRACIÓN (K)	3	190.52829	53061512.0	2.700	RECHAZAR Ho
TIEMPO (T)	2	0.00258	720.4	3.090	RECHAZAR Ho
C x K	9	0.00208	581.9	1.970	RECHAZAR Ho
C x T	6	0.00074	207.0	2.190	RECHAZAR Ho
K x T	6	0.00065	182.6	2.190	RECHAZAR Ho
C x K x T	18	0.00017	48.2	1.715	RECHAZAR Ho
ERROR	96	3.59138E-06			
TOTAL	143	190.53950			

Fuente: *Elaboración propia*

FV = Fuente de variación GL = Grados de libertad CM= Cuadrados medios

Los promedios de UFC/ml de **Staphylococcus aureus** y **Escherichia coli** obtenidos después del efecto inhibitorio del desecado del jugo de limón, fueron sometidos a la prueba de Tukey, según la cual el desecado del jugo de limón produjo un efecto inhibitorio diferente en las cepas de S. aureus; sin embargo, en las cepas de E. coli el efecto fue similar (Tabla 10).

Tabla 10

*Prueba de significación de Tukey (0.05) del promedio de UFC/ml de **Staphylococcus aureus** y **Escherichia coli** en el efecto inhibitorio del desecado del jugo de limón.*

CEPAS	PROMEDIOS	SIGNIFICANCIA
S. aureus (C 2)	1.17574	a
S. aureus (C 1)	1.173261	b
E. coli (C 4)	1.154242	c
E. coli (C3)	1.154229	c

Fuente: *Elaboración propia*

Letras diferentes: Diferencia significativa

Se determinó estadísticamente que los promedios de UFC/ml de los microorganismos expuestos a las diferentes concentraciones del desecado

del jugo de limón (0%, 3%, 6% y 9%) mostraron diferencias significativas y que a mayor concentración del producto, menor promedio de UFC de microorganismos (Tabla 11).

Tabla 11

Prueba de significación de Tukey (0.05) del promedio de UFC/ml de Staphylococcus aureus y Escherichia coli en relación a las concentración en el efecto inhibitorio del desecado del jugo de limón.

CONCENTRACIONES	PROMEDIOS	SIGNIFICANCIA
0 %	4.6151200	a
3 %	0.0308983	b
6 %	0.0080042	c
9 %	0.0034486	d

Fuente: *Elaboración propia*

Letras diferentes: Diferencia significativa

Respecto al factor tiempo se demostró estadísticamente que los promedios de UFC/ml de las cepas utilizadas fueron diferentes, siendo menor cuando el microorganismo fue expuesto por mayor tiempo al desecado del jugo de limón (Tabla 12).

Tabla 12

Prueba de significación de Tukey (0.05) del promedio de UFC/ml de Staphylococcus aureus y Escherichia coli en relación a los tiempos de exposición en el efecto inhibitorio del jugo de limón.

TIEMPOS (Min.)	PROMEDIOS	SIGNIFICANCIA
5	1.172428	a
10	1.162615	b
15	1.158061	c

Fuente: *Elaboración propia*

Letras diferentes: Diferencia significativa

4. Discusión

En el presente estudio se demuestra el efecto inhibitorio del jugo de limón sobre el crecimiento de las especies bacterianas, Staphylococcus aureus

y *Escherichia coli*, atribuyéndose tal efecto a su composición en ácidos, como los ácidos cítrico, málico, acético y fórmico (Font Quer, 1997) que le confiere un pH de 2.4 (Meyer et al, 1976), el cual desestabiliza el normal funcionamiento de la membrana citoplasmática inhibiendo la actividad de las enzimas y las proteínas transportadoras. (Prescott et al, 2009). La membrana citoplasmática es una estructura multifuncional y entre sus funciones se encuentra la regulación de la concentración del pH manteniendo la composición iónica interna que permite una adecuada actividad enzimática, dicha estructura está cargada negativamente en su interior (OH) y positivamente en su exterior (H). La muerte bacteriana se produce si el pH interno desciende por debajo de 5 a 5.5, los cambios de pH externo pueden modificar también la ionización de las moléculas de nutrientes, disminuyendo así su disponibilidad para el organismo. El jugo de limón es utilizado como un excelente depurativo y antiséptico natural que combate todo tipo de enfermedades infecciosas (Baye, 1979).

Se sabe que algunos ácidos orgánicos como el ácido cítrico tienen efectos “quelantes” sobre los cationes divalentes, uniéndose a ellos lo cual, por un lado, permeabiliza la membrana a moléculas grandes y por otro permite la difusión por transporte pasivo de los ácidos del jugo de limón hacia el interior celular, esto último provoca la coagulación de proteínas y consecuentemente la muerte bacteriana (Brooks, et al. 2010).

Respecto al efecto inhibitorio del jugo de limón a diferentes concentraciones, se encontró que a mayor concentración hubo mayor inhibición demostrándose por la disminución del número de colonias tanto de *Staphylococcus aureus* como *Escherichia coli*; sin embargo, según Borrows en Arrascue y Zuta, 1996 considera que puede haber una zona máxima de inhibición a dosis bajas de un determinado producto, así como una menor inhibición a dosis más elevadas. Este fenómeno es apreciado particularmente en la determinación de inhibición del crecimiento bacteriano, empleando el método de difusión; en el presente estudio, la relación directa entre la concentración y el efecto del jugo de limón se fundamenta en el hecho de que la suspensión de microorganismos se expuso directamente al jugo de limón.

El efecto inhibitorio del limón es diferente en *Escherichia coli* que en *Staphylococcus aureus*, siendo mayor en la primera de ellas e inclusive con la muerte del 100% de microorganismos, esto se explica en la conformación de la estructura externa de las especies bacterianas particularmente de la pared celular. A pesar de que el mayor impacto del jugo de limón es en la membrana citoplasmática, el producto debe atravesar la pared celular para llegar al sitio blanco. La pared celular de una bacteria gramnegativa como *E. coli*, aunque

es más compleja que la de una grampositiva, en su parte más externa está constituida por lipopolisacáridos, fosfolípidos y proteínas (membrana externa) que son más susceptibles a los ácidos, por tanto, estos alteran fácilmente dicha estructura permitiendo el paso del jugo de limón hacia la membrana citoplasmática, a esto debe agregársele la menor cantidad de peptidoglucano en la pared celular de estos microorganismos que llega solo al 5-10% del peso seco total de la pared; en bacterias grampositivas como *S. aureus* el peptidoglucano representa el 40-80% del peso seco total de la pared celular (Murray et al, 2006), como se sabe este compuesto confiere a la pared celular impermeabilidad y rigidez lo que permite que dichas bacterias ofrezcan mayor resistencia al ingreso del jugo de limón, situación que es demostrada estadísticamente.

Los resultados son similares a los encontrados por Francia y Aguayo, 1993 quienes trabajaron con aceite esencial de limón y especies de bacterias gramnegativas, siguiendo el método de difusión en discos de Kirby-Bauer; resulta obvio que el aceite de limón tiene como principios activos ácidos volátiles como el D- limoneno y el citral mientras que el jugo posee ácidos no volátiles (ácido cítrico, málico, acético y fórmico), ambos productos tienen como blanco de acción a la membrana citoplasmática.

Por otro lado, Arce y Valle, 2000 trabajaron con aceite de limón y cepas de *S. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* mostrando sus resultados algunas diferencias respecto a este trabajo, así la bacteria gramnegativa *P. aeruginosa* fue menos sensible que *S. aureus*, mientras que con el jugo de limón la bacteria gramnegativa *E. coli* fue más sensible que *S. aureus*; además de lo expuesto anteriormente debe señalarse que la permeabilidad de la membrana externa varía ampliamente entre las especies de gramnegativas; así en *P. aeruginosa* la membrana externa es 10 veces menos permeable que la de *E. coli* (Brooks et al, 2010). Así mismo, *P. aeruginosa* posee una gran variedad de plásmidos, entre ellos de resistencia: aceites esenciales de menta, eucalipto y limoncillo (Ratto, 1984). También se observa que las concentraciones inhibitorias de aceite esencial de limón encontradas por Arce y Valle (2000) son menores a las determinadas en este trabajo, lo que se debería al efecto dilución de los ácidos orgánicos en el jugo de limón que no resulta en los ácidos del aceite esencial.

Adicionalmente se encuentra diferencias para el efecto inhibitor del jugo de limón en las cepas de *S. aureus* pero no entre cepas de *E. coli*, lo que podría deberse a la mayor variabilidad entre el número de capas de peptidoglicano en bacterias grampositivas aún en cepas de la misma especie, así como a la posibilidad de otras estructuras externas, como la cápsula en

algunas cepas, en contraste con las bacterias gramnegativas que si bien tienen una pared más compleja son menos variables en su composición respecto al peptidoglicano (Murray et al, 2006).

El jugo de limón tiene entre sus componentes 90% de agua (Cáceres, 1996) al obtener de este jugo el desecado, la concentración de los componentes cristalizables se incrementan, esto explica el mayor efecto inhibitorio sobre *S. aureus* y *E. coli* del desecado del jugo de limón a menores concentraciones y tiempo de exposición que el jugo. Las características de este efecto son similares a las ya explicadas para el jugo de limón, además sugiere que el desecado podrá utilizarse en aplicaciones tópicas a una mayor concentración que el jugo.

5. Conclusiones

- El jugo de limón *Citrus aurantifolia* a concentraciones de 10, 20 y 30% aplicados por 30, 60 y 90 min. inhibe el crecimiento de *S. aureus*, disminuyendo a los 90 min. las UFC/ml. de 7.5×10^7 a 9.58×10^4 , 1.05×10^4 , 18.5 respectivamente. A las mismas concentraciones y tiempo las UFC/ml. de *E. coli* disminuye hasta 28.3, 3.3 y 0.
- El desecado del jugo de limón a 3, 6 y 9% aplicados por 5, 10 y 15 min. inhibe el crecimiento de *S. aureus*, disminuyendo a los 15 min. Las UFC/ml. de 7.5×10^7 a 2.26×10^4 , 2.98×10^3 y 3.13×10^2 respectivamente. A las mismas concentraciones y tiempo las UFC/ml. de *E. coli* disminuye hasta 1.25×10^2 , 5 y 0.
- Las cepas de *E. coli*, tanto para el jugo como para el desecado del jugo de limón, fueron más sensibles que *S. aureus*. Así mismo, existen diferencias estadísticas entre la sensibilidad de las cepas de *S. aureus* pero no entre la sensibilidad de las cepas de *E. coli*.
- El desecado del jugo de limón tiene mayor poder de inhibición del crecimiento bacteriano que el jugo de limón.

6. Referencias

- Al-Delaimy and Ali, S. (1970). Antibacterial Action of vegetable Extracts on the grown of pathogenic bacteria. *Revista Sci. Fd. Agric.* 21(2) 110.
- Arce, Z. y Valle, I. (2000). Efecto antibacteriano "in vitro" del aceite esencial de limón (*Citrus aurantifolia*) frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

(Tesis Lic. Biología- Microbiología-Parasitología) Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Perú.

Arrascue, C y Zuta, N. (1996). *Acción inhibitoria in vitro del extracto de Tropaeolum majus L. (mastuerzo) frente a dermatofitos y bacterias de importancia clínica*. (Tesis Lic. Biología-Microbiología-Parasitología). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Perú.

Baye, R. (1979). *Plantas para la salud*. Barcelona: Editorial Bruguera S.A.

Brooks, G.; Butil, J. y Morse, S. (2010). *Microbiología Médica de Jawetz*. (25ª edición). México: Editorial Manual Moderno S.A.

Cáceres, A. (1996). *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Guatemala: Editorial Universitaria.

Font Quer, P. (1997). *Plantas medicinales*. (7ª edición). Barcelona: Editorial Labor S.A.

Francia, O. y Guayo, A. (1993). *Efecto del aceite esencial de limón (Citrus aurantifolia) en el crecimiento de S. typhi, V. cholerae y V. parahaemolyticus*. Lambayeque, Perú.

Joklik, W., Willet, H., Amos, B. y Wilfert, C. (1997). *Zinsser Microbiología*. (20ª edición). Editorial Médica Panamericana S.A.

Meyer, B., Anderson, D y Bohning, R. (1976). *Introducción a la fisiología vegetal*. (4ª edición). Argentina: Editorial Universitaria de Buenos Aires.

Morell, J. 1998. Infecciones por Estafilococos. *Rev. Medicine* 7 (78): 4505-4508.

Murray, P., Kobayashi, G., Pfaller, M y Rosenthal, K. (2006). *Microbiología médica*. (5ª edición). España: Editorial Harcourt Brace S.A.

Prescott, L., Marley, J. y Klein, D. (2009). *Microbiología*. (7ª edición). España: Editorial Mc. Graw Hill Interamericana.

Ratto, M. (1984). *Guía de trabajos Prácticos: Técnicas Actualizadas para el control microbiológico de alimentos*. Dpto. Académico de Farmacotecnia. UNMSM. Lima, Perú.

Vergara, M. y Delgado, N. (1993). *Guía Teórico-Práctica de Bacteriología Veterinaria*. Lambayeque, Perú.