



Efecto antibacteriano del aceite esencial de la cáscara del *Citrus latifolia tanaka* “limón” sobre *Staphylococcus aureus* comparado con oxacilina

Antibacterial effect of *Citrus latifolia tanaka* “lemon” peel essential oil on *Staphylococcus aureus* compared to oxacillin

Ana Belén Alvarez Tufinio^{1,a}, David René Rodríguez Díaz^{1,a,b},
Jaime Abelardo Polo Gamboa^{1,c}

¹ Universidad Cesar Vallejo. Lima, Perú.

^a Médico cirujano

^b Maestro en Gestión de los Servicios de Salud

^c Biólogo microbiólogo, Maestro en Docencia Universitaria

RESUMEN

Introducción: El aceite esencial de la cáscara del limón presenta una composición química con potencial antibacteriano. **Objetivo:** Determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de la cáscara del *Citrus latifolia tanaka* “limón” sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 comparado con oxacilina en un estudio *in vitro*. **Materiales y métodos:** Se elaboró el aceite esencial de *Citrus latifolia tanaka* “limón”, originario del norte peruano, al 100%, 75%, 50% y 25%. El efecto antibacteriano se determinó a través de la medición de los halos de inhibición (HI) sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* cultivados en agar Mueller Hinton. Se realizaron 10 repeticiones para cada grupo y se comparó con oxacilina 1 µg como control positivo y dimetil sulfoxido (DMSO) como control negativo. **Resultados:** Las concentraciones con efecto antibacteriano (≥ 13 mm) fueron al 75% con un HI de 13,90 mm y al 100% con un HI de 16,00 mm. La oxacilina tuvo un halo de inhibición de 26,60 mm. La prueba ANOVA resultó con un valor de *p* menor a 0,001, mostrando diferencias significativas entre los grupos de tratamiento. **Conclusión:** El aceite esencial del *Citrus latifolia tanaka* “limón” tiene efecto antibacteriano contra *Staphylococcus aureus*, aunque menor que la oxacilina.

Palabras claves: Citrus; Antibacterianos; oxacilina; Staphylococcus. (Fuente: DeCS Bireme)

ABSTRACT

Introduction: The essential oil of lemon peel has a chemical composition with antibacterial potential. **Objective:** To determine the antibacterial effect of the essential oil from the peel of *Citrus latifolia tanaka* “lemon” on strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 compared with oxacillin in an *in vitro* study. **Materials and methods:** The essential oil of *Citrus latifolia tanaka* “lemon”, originally from northern Peru, was elaborated at 100%, 75%, 50% and 25%. The antibacterial effect was determined by measuring the inhibition halos (HI) on the *Staphylococcus aureus* strains grown on Mueller Hinton agar. 10 repetitions were made for each group and compared with oxacillin 1 µg as a positive control and dimethyl sulfoxide (DMSO) as a negative control. **Results:** The concentrations with antibacterial effect (≥ 13 mm) were 75% with an HI of 13.90 mm and 100% with an HI of 16.00 mm. Oxacillin had an inhibition halo of 26.60 mm. The ANOVA test resulted with *p* less than 0.001, showing significant differences between the treatment groups. **Conclusion:** The essential oil of *Citrus latifolia tanaka* “lemon” has an antibacterial effect against *Staphylococcus aureus*, less than oxacillin.

Keywords: Citrus; Anti-Bacterial Agents; Oxacillin; Staphylococcus (Source: MeSH NLM).

Información del artículo

Fecha de recibido
03 de junio del 2022

Fecha de aprobado
04 de agosto 2022

Correspondencia
Ana Belén Alvarez Tufinio
aalvarezt0802@gmail.com

Conflictos de interés
Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Contribuciones de autoría
Los autores participaron en la génesis de la idea, diseño de proyecto, recolección e interpretación de datos, análisis de resultados y preparación del manuscrito del presente trabajo de investigación.

Financiamiento
Autofinanciado

Citar como: Alvarez Tufinio AB, Rodríguez Díaz DR, Polo Gamboa JA. Efecto antibacteriano del aceite esencial de la cáscara del *Citrus latifolia tanaka* “limón” sobre *Staphylococcus aureus* comparado con oxacilina. Rev Peru Med Integrativa. 2022; 7(2).

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas ocupan el tercer lugar en mortalidad a nivel mundial, donde los agentes virulentos representan el 75% y los agentes bacterianos el 48%. La Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA) indica que estas afecciones están en el cuarto puesto de mortalidad en América con 20 a 30 casos por año por cada 1 000 nacidos vivos⁽¹⁾. Entre las bacterias, la morbimortalidad de la infección de *Staphylococcus aureus* continúa latente tanto en los nosocomios como en la comunidad. Las infecciones de la piel son las más frecuentes, y en casos de inmunosupresión se encuentran la osteomielitis, la endocarditis y el shock séptico por la diseminación de la bacteria⁽²⁾.

La medicina alternativa ha empezado a ser utilizada con el fin de reducir la resistencia antimicrobiana, debido a que la automedicación y el indiscriminado uso de medicamentos se han incrementado notablemente hasta un 58% en el Perú⁽³⁾. Por ejemplo, los aceites esenciales son empleados con fines terapéuticos por la vía cutánea, ya que poseen capacidad de penetración en la epidermis⁽⁴⁾. Estos aceites esenciales se pueden producir a partir de la cáscara del limón, debido a sus componentes como hidrocarburos monoterpénicos, limoneno, pineno y gama-terpineno, los cuales han demostrado tener excelentes efectos antibacterianos^(5,6). En virtud a ello, es propicio seguir investigando plantas nuevas, como la del *Citrus latifolia tanaka* o limón, puesto que diversos estudios notifican convenientes resultados referentes a su utilización con diversas bacterias.

Racowski I. *et al* reportaron que la cáscara del *Citrus latifolia tanaka* posee excelente actividad para bacterias contra bacterias Gram negativas, ya que generó un halo de inhibición 18,77 mm contra *E. coli* y 5,53mm contra *Staphylococcus aureus*⁽⁷⁾. De igual manera, Nasser N. *et al.*, estimaron con el método Kirby-Bauer el efecto antibacteriano del aceite esencial y reportaron un halo inhibitorio de 15 mm \pm 0,39 para *E. coli*, 7mm \pm 0,22 para *P. aeruginosa* y 6 mm \pm 0,18 para *Staphylococcus aureus*⁽⁸⁾.

En cambio, Halima S. *et al.* encontraron que la eficacia de la cáscara fue mayor sobre cepas bacterianas gram positivas, ya que reportaron halo inhibitorio de 22 mm para *S. aureus*, 31 mm para *S. epidermidis*, 20 mm para *Pseudomonas aeruginosa*, y 20 mm para *E. coli*⁽⁹⁾. De igual manera, Ehigbai I. *et al* encontraron un mayor el efecto del *Citrus latifolia tanaka* contra bacterias gram positivas porque hallaron un halo inhibitorio de 20mm para *Staphylococcus aureus*, 10mm para *Enterococcus faecalis* y 12mm *E. coli*⁽¹⁰⁾.

En la costa norte del Perú, en los departamentos de Piura, Tumbes y Lambayeque, se centra la mayor producción del limón debido a los suelos y la temperatura que oscila entre 24 y 25 °C⁽¹¹⁾. Debido a que la fitoterapia representa una

posibilidad terapéutica segura y eficaz, el objetivo de este estudio es determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de la cáscara del *Citrus latifolia tanaka* "limón" sobre cepas de *Staphylococcus aureus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño y área de estudio

Estudio experimental, analítico, prospectivo. Realizado en la ciudad de Trujillo, al norte del Perú.

Población y muestra

La población estuvo constituida por colonias de cepas de *Staphylococcus aureus* que se cultivaron en el laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo, en la ciudad de Trujillo. Se incluyeron cepas de cultivos viables en placas Petri durante 18 a 24 horas. Se excluyeron cepas de cultivos que no desarrollaron y que fueron contaminadas. Se determinó 10 repeticiones para cada grupo⁽¹²⁾.

Variables e instrumentos

La variable independiente fue el tratamiento con el aceite esencial del *Citrus latifolia tanaka* "limón" en diferentes concentraciones. Esta variable se clasificó de la siguiente forma: grupo 1) *Citrus latifolia tanaka* al 100%, grupo 2) *Citrus latifolia tanaka* al 75%, grupo 3) *Citrus latifolia tanaka* al 50%, grupo 4) *Citrus latifolia tanaka* al 25%, grupo 5) Oxacilina 1 μ g y 6) Control negativo con dimetil sulfoxido (DMSO). La variable dependiente fue la actividad antibacteriana. Esta fue medida a partir de los halos de inhibición (HI), a) con efecto, cuando el halo de inhibición es mayor o igual a 13 mm y b) sin efecto antibacteriano, cuando el halo de inhibición es menor a 13 mm.

La técnica fue la observación directa del desarrollo bacteriológico de cultivos en placas Petri. El instrumento fue la ficha de observación de datos donde se registró información sobre diluciones, placas y halos inhibidos después de 48 horas⁽¹³⁾. Esta fue validada por tres profesionales del área, evaluando variables e ítems considerados en la ficha.

Procedimientos

Procesamiento de la muestra vegetal

Se obtuvieron 5 kg de cáscara del *Citrus latifolia tanaka* "limón", en junio del 2017 en el mercado Modelo del distrito Piura, región Piura, Latitud -5.19722, Longitud -80.6267. Estas se llevaron al laboratorio de microbiología de la Universidad César Vallejo de Trujillo, donde se seleccionó la "muestra fresca" (MF). La MF se lavó con agua destilada clorada, se colocó sobre una bandeja de cartulina y se llevó a un horno a 40-45°C por 3 a 4 días para la deshidratación. Después, se estrujó manualmente el vegetal seco hasta que se obtuvieron partículas muy pequeñas, las cuales se almacenaron herméticamente en bolsas negras. A esto se le consideró como "muestra seca" (MS).

Preparación del aceite esencial

El aceite esencial (AE) de la cáscara del *Citrus latifolia tanaka* "limón" se obtuvo por el método de arrastre de vapor de agua; para ello, en un balón de 2 litros (L) se colocó 1,5 L de agua destilada y en un balón de 4 L se colocó la MS hasta que llenó las 3/4 partes del balón. Ambos balones se taparon herméticamente y estuvieron conectados a través de un ducto. Al mismo tiempo, el balón con la MS estuvo conectado a un condensador recto, el cual desembocó en un embudo decantador tipo pera. De este modo, el balón con agua se calentó con una cocina eléctrica y el vapor de agua pasó a través del ducto hacia el balón con la MS y arrastró los componentes fitoquímicos. Este vapor se condujo hacia el condensador en donde se convirtió en líquido que fue recepcionado por el decantador tipo pera. Este líquido se disoció en dos fases, quedando el aceite en la superficie por diferencia de densidades. Este proceso se realizó en 2 horas. De este modo, se obtuvo el AE considerado al 100%; el cual se colocó en un frasco de vidrio ámbar y se reservó a 4°C hasta su utilización.

A partir del AE, se prepararon 4 concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) utilizando como solvente el DMSO; para ello, se rotularon 4 tubos de ensayo de 13x100mm estériles con las 4 concentraciones y se colocó 750 µL de AE y 250 µL de DMSO al tubo de 75%, 500 µL de AE y 500 µL de DMSO al tubo de 50%, y 250 µL de AE y 750 µL de DMSO al tubo de 25%. A partir de cada una de las concentraciones, se colocó 10 µL en cada disco de papel filtro Whatman N° 1 de 6mm de diámetro, previamente esterilizados. Este último procedimiento se repitió 10 veces.

Preparación de las cepas

El inóculo se preparó colocando 3 a 4 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo estéril, al cual se le adicionó una alícuota del microorganismo *Staphylococcus aureus*, cultivado hace 18-20 horas, de tal modo que se observó una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml). Se utilizó agar Mueller-Hinton como medio de cultivo para las 10 placas Petri. Este medio se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Después, se sirvió en placas Petri estériles de plástico desechables, 18-20 ml por cada placa, y se dejó reposar hasta que solidificó completamente.

Se sembró el microorganismo *Staphylococcus aureus*, embebiendo un hisopo estéril en el inóculo y deslizándolo sobre toda la superficie del medio de cultivo en las placas Petri (siembra por estrías en superficie); de tal modo que el microorganismo quedó como una capa en toda la superficie.

Prueba de susceptibilidad

Se evaluó utilizando el método de Kirby-Bauer de disco difusión en agar. Para ello, se consideró los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) de Estados Unidos. Se tomó en cuenta los estándares M02-A12 y M100⁽¹⁴⁾.

Con la ayuda de una pinza metálica estéril, se tomaron los discos de sensibilidad preparados, uno de cada concentración con AE, y se colocaron en la superficie del agar sembrado con el microorganismo, y de este modo, quedaron los discos a un cm del borde de la placa Petri y de forma equidistante. Adicionalmente, se colocó el disco con oxacilina (control positivo). Se dejaron en reposo por 15 min y después las placas se incubaron de forma invertida en la estufa a 35-37°C por 18-20 horas.

Para la lectura, se observó y midió el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento microbiano con una regla Vernier. Esta medición se realizó para cada una de las concentraciones de AE de cáscara del *Citrus latifolia tanaka* y para la oxacilina. Se interpretó como sensible o resistente según lo establecido en el estándar M100 del CLSI.

Análisis estadístico

Se digitaron los resultados encontrados en software de cálculo MS Excel, posteriormente se analizaron los datos en la aplicación SPSS versión 25. El análisis de varianza (ANOVA) fue la prueba estadística realizada, evaluando así la disimilitud representativa comparada entre los diámetros de los halos. Luego se realizó la prueba de Tukey para la evaluación de la homogeneidad entre los grupos de estudio. Se consideró un valor de p estadísticamente significativo si era menor a 0,05.

Aspectos éticos

Se aplicaron las medidas de bioseguridad otorgadas por el Ministerio de Salud. Asimismo, se obtuvo el consentimiento de la delegación de Investigación de la Facultad De Ciencias Médicas de la Universidad Cesar Vallejo. Por último, se respetó el capítulo 6 del código de ética del Colegio Médico del Perú, Artículo 48^(14,15).

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestra la media de los HI para cada grupo de tratamiento. A una concentración de 25% se obtuvo un halo de 11,50 mm, a diferencia de la concentración al 100% con un halo de 16,00 mm.

La prueba ANOVA resultó con p menor a 0,001, mostrando diferencias significativas entre los grupos de tratamiento. Finalmente, en la Tabla 2 se observa la comparación de los HI entre cada grupo a partir de la diferencia de medias y comparados según la prueba de Tukey.

DISCUSIÓN

Se efectuó un estudio experimental in vitro, utilizando la técnica de difusión en disco, para evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial de la cáscara del *Citrus*

Tabla 1. Efecto antibacteriano del aceite esencial de la cáscara del *Citrus latifolia tanaka* "limón" sobre *Staphylococcus aureus*.

Grupo de tratamiento	Número de repeticiones	Media del HI	Desviación estándar	95% del IC para la media	
				Límite inferior	Límite superior
<i>Citrus latifolia tanaka</i> al 100%	10	16,00	1,333	15,05	16,95
<i>Citrus latifolia tanaka</i> al 75%	10	13,90	0,738	13,37	14,43
<i>Citrus latifolia tanaka</i> al 50%	10	13,20	1,033	12,46	13,94
<i>Citrus latifolia tanaka</i> al 25%	10	11,50	0,707	10,99	12,01
Control positivo: Oxacilina 1µg	10	26,60	0,516	26,23	26,97
Control negativo: DMSO	10	0	0	0	0

*HI: Halo de inhibición. DMSO: dimetil sulfóxido.

Tabla 2. Análisis de homogeneidad prueba de Tukey del efecto antibacteriano del aceite esencial de la cáscara del *Citrus latifolia tanaka* "limón" sobre *Staphylococcus aureus*

Grupos de tratamiento	1	2	3	4	5
<i>Citrus latifolia tanaka</i> al 25% (1)					
<i>Citrus latifolia tanaka</i> al 50% (2)	1,7				
<i>Citrus latifolia tanaka</i> al 75% (3)	2,4	0,7*			
<i>Citrus latifolia tanaka</i> al 100% (4)	-4,5	-2,8	-2,1		
Control positivo: Oxacilina 1µg (5)	15,1	13,4	12,7	10,6	
Control negativo: DMSO	11,5	13,2	13,9	16,0	26,6

ANOVA: p<0,001 *p=0,981. El resto de comparaciones tuvo un valor de p menor a 0,001. DMSO: dimetil sulfóxido

latifolia tanaka comparado con el antibiótico oxacilina. A concentraciones de 75% y 100% se halló un efecto inhibitorio importante, ya que estas diluciones sobrepasan los resultados inhibitorios dados por CLSI como sensible (≥ 13 mm). Estos valores son significativos comparados con el antibiótico oxacilina que alcanza un valor de 26,60 mm.

Los resultados son menores a los de Halima S. *et al.*, quienes encontraron un halo inhibitorio de 22 mm para *S. aureus*⁽⁹⁾, pero a diferencia emplearon metanol al 25% para la preparación del extracto. Asimismo, Oikeh E. *et al.* reportó un halo de 20mm, Nozad A. *et al.* de 20mm y Hasija S. *et al.* un halo de 20,33 mm para *S. aureus*⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. Los estudios hallaron un halo inhibitorio similar, lo que expresa, el aceite esencial induce formación de halos de inhibición sobre *S. aureus*, demostrando que sus componentes activos tienen actividad antibacteriana y que la bacteria es sensible al aceite de estos.

En cambio, nuestros resultados fueron superiores a los halos inhibitorios de Pires C. *et al* quienes hallaron, un halo inhibitorio de 8,7mm $\pm 1,8$ por la método Kirby-Bauer a diferentes concentraciones como 10, 20, 40, 80, 160 ul/ml⁽¹⁹⁾. De igual manera, Racowski I. *et al* hallaron un halo inhibitorio de 5,53mm, ligeramente menor que el de Nasser N. *et al.* de 6 mm para *S. aureus*^(7,8). Si bien ningún grupo supera el halo de inhibición del antibiótico oxacilina de 26,60mm, se evidencia el efecto contra *S. aureus*. Este rendimiento valida los reportados por Halima S. *et al* concluyendo que la cáscara

del *Citrus latifolia tanaka* dispone actividad antibacteriana buena contra cepas gram positivas⁽⁹⁾.

Finalmente cabe resaltar el estudio de Nozad A. *et al* del *Citrus latifolia tanaka* contra el *Staphylococcus aureus* en comparación con el *E. coli*, tuvo efecto mayor en la primera bacteria por el uso de la cáscara y el jugo, obteniendo un halo de inhibición de 32,0 \pm 0,1 mm, lo cual sugiere un potencial efecto sinérgico⁽¹⁷⁾. La diferencia con los otros estudios puede deberse a los diferentes factores que influyen en el medio ambiente (terreno, mineral en la tierra de cultivo, ciclo vegetativo, proceso de extracción, temperatura, humedad) en el desarrollo de los vegetales y sus frutos, ya que estos factores ayudan a determinar la composición, componentes fotoquímicos y la totalidad de los mismos.

Una de las limitaciones del presente estudio es el uso de una sola cepa bacteriana *Staphylococcus aureus*, ya que el análisis del efecto contra cepas resistentes potenciaría los resultados que se buscan ante el crecimiento exponencial de la resistencia antibiótica.

CONCLUSIÓN

El aceite obtenido de la cáscara del limón tiene efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 a la concentración de 75% y al 100% de disolución, por sus diferentes componentes terpenoides, pero fue inferior que el antibiótico oxacilina.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Berbari EF, Kanj SS, Kowalski TJ, Darouiche RO, Widmer AF, Schmitt SK, et al. 2015 Infectious Diseases Society of America (IDSA) Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Native Vertebral Osteomyelitis in Adults. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2015;61(6):e26-46. doi:10.1093/cid/civ482
2. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):603-61. doi:10.1128/CMR.00134-14
3. Ministerio de Salud (MINSa). Protocolo para la evaluación de la prescripción y uso de antimicrobianos en la consulta ambulatoria de hospitales. [Internet]. Ministerio de Salud; 2007 [citado el 2 de marzo de 2022]. Disponible en: http://bvs.minsa.gob.pe/local/DIGEMID/836_DIGEMID57.pdf
4. Arévalo V. G. Las plantas medicinales y su beneficio en la salud Shipibo-Conibo. 1. ed. Lima, Perú: Edición AIDSESP; 1994. 354 p.
5. Krapp K, Longe J. *Medicina alternativa*. 1a ed. Barcelona: Oceano/Ergon; 2010.
6. Benoudjit F, Maameri L, Ouared K. Evaluation of the quality and composition of lemon (*Citrus limon*) peel essential oil from an Algerian fruit juice industry. *Algerian J Environ Sci Technol.* 2020;6(4). Disponible en: <https://www.aljest.net/index.php/aljest/article/view/318>
7. Racowski I, Piotto J, Procópio V, Freire V. T. Evaluation of Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Thaiti Lemon Peels (*Citrus latifolia* Tanaka). *J Microbiol Res.* 2017;7(2):39-44.
8. Nasser AL-Jabri N, Amzad Hossain M. Comparative chemical composition and antimicrobial activity study of essential oils from two imported lemon fruits samples against pathogenic bacteria. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci.* 2014;4(3):247-53. doi:10.1016/j.bjbas.2014.10.011
9. Halima-Mansour S, Allem R. Evaluation of antimicrobial activity of Algerian Lemon (*Citrus limon*L.) peels and seeds extracts. *Pharma Chem.* 2016;8(12):127-34. Disponible en: <https://www.derpharmachemica.com/pharma-chemica/evaluation-of-antimicrobial-activity-of-algerian-lemoncitrus-limonl-peels-and-seeds-extracts.pdf>
10. Oikeh EI, Omoregie ES, Oviasogie FE, Oriakhi K. Phytochemical, antimicrobial, and antioxidant activities of different citrus juice concentrates. *Food Sci Nutr.* 2015;4(1):103-9. doi:10.1002/fsn3.268
11. García Huamán F, Mostacero León J. *Flora Etnomedicinal de la Región Amazonas* [Internet]. Primera edición. Chachapoyas, Perú: COMPUGRAPH SRL; 2009 [citado el 2 de marzo de 2022]. Disponible en: http://www.redkuelap.com/libros/Flora_etsnomedicinal.pdf
12. Forbes B, Sanm D, Weissfeld A, Trevio E. *Diagnostico microbiológico*. 11a ed. Uruguay: Medica Panamericana; 2004.
13. Dawson B, Trapp R. *Bioestadística Médica*. 3a ed. México: Manual Moderno; 1999.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* [Internet]. 32nd ed. United States of America: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2022 [citado el 2 de marzo de 2022]. 362 p. Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
15. Ministerio de Salud (MINSa). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión [Internet]. 2002 [citado el 2 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/informes-publicaciones/353004-manual-de-procedimientos-para-la-prueba-de-sensibilidad-antimicrobiana-por-el-metodo-de-disco-difusion>
16. Oikeh EI, Omoregie ES, Oviasogie FE, Oriakhi K. Phytochemical, antimicrobial, and antioxidant activities of different citrus juice concentrates. *Food Sci Nutr.* 2015;4(1):103-9. doi:10.1002/fsn3.268
17. Nozad Adham A. Comparative Antimicrobial Activity of Peel and Juice Extract of Citrus Fruits Growing in Kurdistan/Iraq. *Am J Microbiol Res.* 2015;3(5):155-9. doi:10.12691/ajmr-3-5-1
18. Hasija S, Ibrahim G, Wadia A. Antimicrobial Activity of Citrus Sinensis (Orange), Citrus Limetta (Sweet Lime) and Citrus Limon (Lemon) Peel Oil on Selected Food Borne Pathogens. *Int J Life Sci Res.* 2015;3(3):5.
19. Pires TC, Piccoli RH. Efeito inibitório de óleos essenciais do gênero Citrus sobre o crescimento de micro-organismos. *R Inst Adolfo Lutz.* 2012;378-85. doi:10.53393/rial.2012.v71.32438