



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA

Efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *Punica granatum*
sobre el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae*, in vitro

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

Médico Cirujano

AUTORA:

Carbonell Olivares, Brasilia Estefania (orcid.org/0000-0002-8107-4612)

ASESOR:

Dr. Salazar Castillo, Marco Leoncio (orcid.org/0000-0001-6234-0092)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Enfermedades Infecciosas y Transmisibles

LÍNEA DE RESPONSABILIDAD SOCIAL UNIVERSITARIA:

Promoción de la salud, nutrición y salud alimentaria

PIURA – PERÚ

2023

DEDICATORIA

Dedico mi tesis con todo mi corazón al forjador de mi camino, quien me sostuvo de su mano en todo momento, a Jehová Dios padre. Asimismo, a mis padres, a quienes amo con todo mi corazón, a mi hermanita que es mi motor para seguir adelante. A mis abuelitas que nunca me dejaron sola. A mis abuelitos que aún desde el cielo me siguen acompañando siempre. A todos y a cada uno de ustedes quienes me ayudaron a ser una mejor persona y mejor profesional.

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios por permitirme haber llegado hasta aquí, gracias a mi familia por su apoyo incondicional en cada decisión y proyecto mío. En especial a mis padres por haber confiado en mí y haberme motivado constantemente para alcanzar mis anhelos.

Gracias a mis docentes y a mi asesor por cada aprendizaje que me brindaron y que a lo largo de mi carrera me ayudaron mucho como persona y profesional.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Carátula	
Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Índice de contenidos	iv
Índice de tablas	v
Resumen.....	vi
Abstrac.....	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
III. METODOLOGÍA.....	9
3.1. Tipo y diseño de investigación.....	9
3.2. Variables y operacionalización	10
3.3. Población, muestra y muestreo	10
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	11
3.5. Método de análisis de datos	14
3.6. Aspectos éticos.....	14
IV. RESULTADOS	15
V. DISCUSIÓN.....	20
VI. CONCLUSIONES.....	25
VII. RECOMENDACIONES	26
REFERENCIAS.....	27
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Variables y operalización.....pág 20
- Tabla 2. recolección de datos del efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum* sobre el crecimiento de *K. pneumoniae*, trabajadas en condiciones aeróbicas a la temperatura de incubación 36°C por 24 horas.....pág 22
- Tabla 3. recolección de datos para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum* sobre el crecimiento de *K. pneumoniae*..... pág 24
- Tabla 4. recolección de datos para la determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum* sobre el crecimiento de *K. pneumoniae* en medio agar Mueller_Hinton..... página 25
- Tabla 5. recolección de datos para la determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum* sobre el crecimiento de *K. pneumoniae* en medio agar Mueller_Hinton.....pág 26
- Tabla 6. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto hidroalcohólico de *P. granatum* sobre el crecimiento de *K. pneumoniae*, in vitro.....pág 28
- Tabla 7. Determinación del efecto in vitro del extracto hidroalcohólico de *P. granatum* sobre el crecimiento de *K. pneumoniae*..... pág 29
- Tabla 8. Identificación fitoquímica preliminar del extracto hidroalcohólico de *P. granatum*, según Loock, 1996..... página 30

RESUMEN

El objetivo de la presente tesis fue evaluar el efecto de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum* sobre el crecimiento de *K. pneumoniae*, in vitro; para ello se realizó un estudio experimental, cuya variable independiente es la exposición a las concentraciones de 0.560, 1.130, 2.125, 4.250 y 5.600 % extracto hidroalcohólico de hojas de *P granatum* y la variable dependiente es el crecimiento de *K. pneumoniae*, además se determinó el CMI y la CMB y el tipo de efecto que genera dicho extracto sobre la bacteria en estudio. Se encontró que las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum* inhiben el crecimiento de *K. pneumoniae*, in vitro, generando halos de inhibición de crecimiento bacteriano desde 1.86, 2.14, 2.34, 2.62 hasta 2.64 cm respectivamente, una CMI de 25.0uL/mL y una CMB de 50 ug/mL y el efecto de dicho extracto fue de tipo bactericida. Se concluye que el extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum* inhibe el crecimiento de *K. pneumoniae*, in vitro y que es de tipo bactericida.

Palabras clave: *P granatum*; enfermedades infecciosas, *klebsiella pneumoniae*.

ABSTRACT

The objective of this thesis was to evaluate the effect of the concentrations of the hydroalcoholic extract of *P. granatum* leaves on the growth of *K. pneumoniae*, in vitro; For this, an experimental study was carried out, whose independent variable is exposure to concentrations of 0.560, 1.130, 2.125, 4.250 and 5.600% hydroalcoholic extract of *P granatum* leaves and the dependent variable is the growth of *K. pneumoniae*, in addition it was determined the MIC and the MBC and the type of effect that said extract generates on the bacteria under study. It was found that different concentrations of the hydroalcoholic extract of *P. granatum* leaves inhibit the growth of *K. pneumoniae*, in vitro, generating halos of bacterial growth inhibition from 1.86, 2.14, 2.34, 2.60 to 2.64 cm respectively, a MIC of 25.0 uL/mL and a CMB of 50 ug/mL and the effect of said extract was bactericidal. It is concluded that the hydroalcoholic extract of *P. granatum* leaves inhibits the growth of *K. pneumoniae*, in vitro and that it is bactericidal.

Keywords: *Punica granatum*; infectious diseases, *klebsiella pneumoniae*.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas han representado una amenaza constante para la vida humana desde tiempos inmemoriales. A pesar de los avances logrados mediante el descubrimiento de antibióticos y las cepas resistentes a antibióticos y los organismos mutantes representan un potencial de riesgo a infecciones y reinfecciones. Por otro lado, la resistencia desarrollada por algunos organismos a los antibióticos complica aún más el tratamiento de dichas infecciones y la generación de los biofilms microbianos, intratables con antibióticos, lo cual puede dar lugar a infecciones crónicas¹.

En este contexto de desafíos persistentes en el ámbito de las enfermedades infecciosas, el empleo de hierbas medicinales para abordar diversas problemáticas de salud se ha expandido considerablemente a nivel mundial. Existe un notorio aumento en la aceptación e interés público por las terapias naturales como lo son en países en vías de desarrollo como en países ya desarrollados. Estos remedios a base de hierbas no solo se encuentran disponibles en farmacias, sino también en tiendas de alimentos². En los países en desarrollo, los productos medicinales que son derivados de plantas son la principal fuente de atención sanitaria para la extensa población. India, en particular, cuenta con un rico sistema de medicina tradicional, donde tratamientos terapéuticos como Ayurveda, Unani, Homeopatía, Sidha, entre otros, hacen uso predominante de hierbas; las mismas que se emplean para obtener ciertos productos naturales que sirven de base, tanto para el desarrollo de medicamentos modernos como de suplementos dietéticos en los alimentos y bebidas³.

En este contexto, la medicina tradicional ha generado confianza en términos de seguridad y eficacia, respaldada por su empleo a lo largo del tiempo. El creciente interés en los productos naturales como fuente de nuevas entidades químicas para el desarrollo de medicamentos modernos y de suplementos dietéticos, ya como ingredientes de alimentos, bebidas y fitocosméticos entre otros. La medicina

herbaria, en forma de extracto o dilución, es relevante cuando la medicina convencional resulta ineficaz debido a la creciente resistencia a los medicamentos. En la India, la industria herbaria hace uso de numerosas especies de plantas, cuyo conocimiento está basado en las experiencias terapéuticas de generaciones de médicos que han conllevado a la formulación de combinaciones naturales de compuestos que exhiben acciones antivirales, antibacterianas, antiprotozoarias y antioxidantes⁴. En el contexto actual, donde la resistencia a los medicamentos convencionales es una preocupación constante, aparecen las hierbas medicinales tradicionales como una opción para una atención médica efectiva⁵.

Punica granatum L., comúnmente llamada granada, es un árbol perteneciente a la familia Lythraceae, nativa de Persia y cultivada extensamente en regiones mediterráneas como Túnez, Turquía, Egipto y España, así como en California, China, Japón y Rusia⁶. Los fitoconstituyentes de *P. granatum* han demostrado diversas actividades biológicas y farmacológicas, destacando una contribución significativa de los fenoles diversos compuestos bioactivos, como elagitaninos, flavonoides y ácidos fenólicos, presentes en las hojas a las propiedades beneficiosas para la salud⁷. Estos fenoles exhiben una fuerte capacidad de unión a estructuras moleculares diversas, como proteínas o glicoproteínas, lo que sugiere un potencial antagonista contra la resistencia bacteriana⁸ como se ha podido observar en diferentes estudios^{9,10}

La justificación de esta tesis se fundamenta en la creciente amenaza de enfermedades infecciosas, exacerbada por la resistencia a los antibióticos y en buscar alternativas efectivas respecto al tratamiento de estas infecciones. Siendo el uso de hierbas medicinales, como la *Punica granatum*, una alternativa como potencial terapéutico contribuyendo en el control de diferentes patógenos.

Por lo antes descrito, se planteó como problema lo siguiente ¿Cuál es el efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *Punica granatum* sobre el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae*, in vitro? Cuyo objetivo principal de la presente tesis fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico de hojas *P. granatum* sobre el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae*, in vitro.

Los objetivos específicos fueron; Determinar el efecto de cada concentración de extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum* sobre el crecimiento de *K. pneumoniae* mediante el método de difusión en agar, Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *P. granatum*, sobre *K. pneumoniae*, Identificar preliminarmente los fitoconstituyentes contenidos en el extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum*. La hipótesis planteada en este trabajo fue: A medida que se incrementa la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum*, disminuye el crecimiento de *K. pneumoniae*, in vitro.

II. MARCO TEÓRICO

Punica granatum, conocida como granada, es un arbusto de dimensiones reducidas, alcanzando alturas de entre cinco y ocho metros, y se distribuye principalmente en Irán, el Himalaya septentrional de la India, China, Estados Unidos y la región mediterránea. Esta especie constituye una planta endémica de relevancia en Irán, prosperando en diversas zonas del país, incluyendo áreas áridas y semiáridas, gracias a la gran capacidad que tiene de adaptación a condiciones ecológicas adversas⁹. Durante una recolección de germoplasma, se recopilieron más de 764 cultivares de *P. granatum*, los cuales fueron cultivados en las localidades de Saveh y Yazd, Irán. Estos cultivares presentan características frutales distintivas, abarcando dimensiones, coloración, sabor, período de maduración y resistencia a enfermedades^{10, 11}.

La anatomía de *P. granatum* se segmenta en compartimentos que incluyen semillas, jugo, cáscara, hojas, flores, corteza y raíces, cada uno de los cuales exhibe fascinantes propiedades farmacológicas y toxicológicas. Se postula que ciertos fitoconstituyentes de las hojas podrían dirigirse a componentes cruciales de la maquinaria celular bacteriana, como las enzimas clave o las proteínas estructurales, inhibiendo así procesos esenciales para la supervivencia bacteriana. Este mecanismo de acción molecular podría incluir la interferencia con la síntesis de la pared celular, la perturbación de la replicación del ADN o la inhibición de rutas metabólicas cruciales.¹²

Las hojas y la fruta de *P. granatum* ha sido extensamente utilizada en la medicina tradicional para abordar diversas afecciones, tales como infecciones, disentería, acidosis, diarrea, helmintiasis, hemorragias y patologías respiratorias¹³. Las semillas de *P. granatum* han revelado la presencia de compuestos estrogénicos, estrona y estradiol. Asimismo, el pericarpio seco y el jugo de la fruta son considerados importantes para el fitotratamiento de diferentes afecciones intestinales, cutáneas de piel y boca, entre otras, ampliando el conocimiento científico sobre los usos tradicionales de *P. granatum*^{14, 15}.

En un estudio realizado por algunos autores, se muestra que las hojas de *P. granatum* presenta entre otras propiedades las antimicrobianas, antifúngicos y antivirales; por lo que los autores proponen el fuerte potencial como fuente segura de conservantes y que los componentes del fruto podrían ser utilizados como excipiente en las industrias de alimentos y de farmacia, debido a sus propiedades mencionadas¹⁶.

En otra investigación, los autores analizaron las propiedades biofarmacéuticas y antimicrobianas del extracto del exocarpio coriáceolas hojas de la granada, el extracto acuoso que se obtuvo por el método de microextracción de fase sólida demostró actividad de característica antifúngica contra diferentes fitopatógenos tales como *Penicillium digitatum*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, y *Phytophthora cinnamomi*, y así también como actividad antibacteriana frente a diversos organismos como *Escherichia coli*, *Xanthomonas campestris*, *Clavibacter michiganensis* y *Bacillus megaterium*; además, tiene efecto inhibitorio de la actividad de antiacetilcolinesterasa y antioxidante¹⁷ y con un potencial sobre las enfermedades neurodegenerativas¹⁸.

En otro trabajo titulado "Actividad antibacteriana y efectos sinérgicos de la lectina PgTeL de la sarcotesta de *P. granatum* contra *Escherichia coli* productora de β -lactamasas", los autores evaluaron la actividad antimicrobiana de la lectina PgTeL proveniente de hojas fruta *P. granatum*, contra cinco aislamientos de *E. coli* resistentes a fármacos y capaces de producir β -lactamasas. Se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) y bactericidas mínimas (MBC) mediante dilución en caldo. El análisis morfométrico y de viabilidad se realizó mediante citometría de flujo, y se evaluaron cambios ultraestructurales mediante microscopía electrónica de barrido. También se investigaron posibles efectos sinérgicos de PgTeL con antibióticos y su efecto antibiofilm. PgTeL mostró actividad antibacteriana contra todos los aislamientos, con valores de MIC y MBC que oscilaron entre 12.5 y 50.0 $\mu\text{g/mL}$ y 25.0 y 100.0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. La lectina causó alteraciones en tamaño, forma y estructura de las células bacterianas. La

combinación PgTeL-ceftazidima mostró un efecto sinérgico para todos los aislamientos, y también se detectó sinergia con otros antibióticos. PgTeL exhibió actividad antibiofilm contra todos los aislamientos, causando una inhibición del biofilm del $\geq 50\%$ a 6.25 $\mu\text{g/mL}$ o superior. Estos resultados sugieren que PgTeL podría tener potencial para el tratamiento futuro de infecciones multirresistentes¹⁹.

En otro estudio desarrollados en Arabia Saudita, los autores abordaron la problemática de las infecciones del aparato urinario, destacando que es una infección muy importante y común en el cuerpo humano, afectando la vejiga, riñones y uretra. El estudio se centró en las cepas de patógenos de *E. coli* y de *K. pneumoniae* generadoras de β -lactamasas de espectro extendido, que complican el tratamiento convencional con antibióticos y pueden generar cepas resistentes. Ante estos desafíos, se exploró el potencial inhibidor de extractos de *P. granatum*, conocida por sus propiedades medicinales y actividad antimicrobiana. La revisión resalta la relevancia de encontrar alternativas naturales para el manejo efectivo de las infecciones, considerando la sinergia con estrategias antibióticas convencionales²⁰.

Estos estudios abren la posibilidad de optimizaciones en el tratamiento de algunas bacterias. *K. pneumoniae*, una bacteria gramnegativa encapsulada y no móvil, presenta un riesgo significativo para la salud pública al asociarse con casos de neumonía, especialmente en poblaciones de pacientes con trastorno por consumo de alcohol o diabetes mellitus. Su presencia habitual en las superficies mucosas humanas de la orofaringe y el tracto gastrointestinal la convierte en una amenaza potencial una vez que ingresa al cuerpo, ya que puede exhibir niveles elevados de virulencia y resistencia a los antibióticos²¹.

K. pneumoniae ocasiona infecciones en diversos sitios del cuerpo, incluyendo el tracto urinario, el tracto respiratorio, el torrente sanguíneo y el sitio quirúrgico. Es especialmente relevante en pacientes con comorbilidades que se someten a intervenciones invasivas, pudiendo incluso provocar abscesos hepáticos piógenos

adquiridos en la comunidad. Destaca como la responsable de aproximadamente el 83% de las neumonías adquiridas en entornos hospitalarios, siendo también la principal causa de neumonía asociada al ventilador²². Actualmente, la neumonía causada por *K. pneumoniae* se considera la principal responsable de las neumonías adquiridas en entornos hospitalarios en los Estados Unidos, representando del 3 al 8% de todas las infecciones bacterianas nosocomiales²³. Aunque habita de manera asintomática en el microbiota intestinal común, la cepa hipervirulenta de *Klebsiella* puede desencadenar enfermedades graves como meningitis, neumonía grave, endoftalmitis y celulitis²⁴⁻²⁶. Además, investigaciones recientes están revelando el papel emergente de *K. pneumoniae* en la etiología y progresión de enfermedades del tracto gastrointestinal²⁷.

Las infecciones por *Klebsiella* se tratan principalmente mediante el uso de antibióticos β -lactámicos^{28, 29}. Algunos aislados clínicos de *K. pneumoniae* exhiben resistencia a antibióticos β -lactámicos debido a la generación de β -lactamasas, incluyendo las de espectro extendido (BLEE). Estas enzimas hidrolizan penicilinas y cefalosporinas, anulando la eficacia de estos antibióticos y restringiendo las opciones de tratamiento convencionales³⁰. Como alternativa, los carbapenémicos, como meropenem e imipenem, se han convertido en fármacos de elección para combatir infecciones causadas por cepas de *Klebsiella* productoras de BLEE³¹.

K. pneumoniae, a menudo resistente a carbapenémicos, ha desarrollado resistencia debido al uso intensivo de antibióticos. Las cepas con resistencia a carbapenemes poseen carbapenemasas, como la KPC y la NDM-1, que hacen ineficaces estos antibióticos, generando resistencia a la mayoría de los β -lactámicos³². La cepa KPC- Kp ST258, preeminente en el 70% de los aislados resistentes en EE. UU., muestra una menor sensibilidad a fluoroquinolonas y aminoglucósidos³³. Este patógeno multirresistente, clasificado en el grupo ESKAPE, plantea un desafío significativo en la salud pública, limitando las opciones de tratamiento³⁴. Además, los cultivos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos han demostrado resistencia a múltiples antibióticos, lo que destaca la necesidad de estrategias terapéuticas alternativas, como colistina y

tigeciclina, aunque su uso está asociado con efectos secundarios, incluida la nefrotoxicidad³⁵. La evolución de la resistencia plantea preocupaciones globales y destaca que tan importante es abordar este tema que se convierte en un problema para la medicina y salud pública.

Se ha encontrado en una investigación realizada en Iraq, donde evaluaron el efecto inhibitorio de diferentes extractos, tanto alcohólico como acuoso de *P. granatum* (cáscara de granada) frente a cepas bacterianas resistentes a múltiples antibióticos de *Streptococcus pneumoniae* y *K. pneumoniae*, aisladas de muestras de esputo y orina de pacientes en el Hospital de Enseñanza de Tikrit. Los resultados revelaron distintos efectos de los extractos utilizados, destacando que el extracto alcohólico mostró el mayor efecto inhibitorio contra *S. pneumoniae* a una concentración de 150 (24 mm), superando al extracto acuático (16 mm). Además, se observó un significativo efecto de inhibición del extracto alcohólico contra *K. pneumoniae* a una concentración de 150 (23 mm), mientras que el extracto acuático mostró resultados similares para ambas cepas (16 mm). Además, se comparó la eficacia del antibiótico Imipenem, siendo más efectivo contra *S. pneumoniae* (38 mm) que contra *K. pneumoniae* (37 mm)³⁶.

El estudio de Pinheiro et al en el cual se demostró que el tratamiento con extracto de hojas de *P. granatum* mostró una reducción significativa en la inflamación pulmonar en ratones, marcada por una disminución de colonias y citoquinas. Estos resultados resaltan el potencial antiinflamatorio y antibacteriano de dicho extracto³⁷. En otro estudio, se demostró que el extracto de *P. granatum* también tiene un efecto de inhibición contra biofilms de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. Resaltando el potencial antibacteriano de las hojas de *P. granatum*³⁸.

III. MÉTODOLÓGÍA

3.1 Tipo y diseño de investigación

3.1.1 Tipo de investigación: Es una investigación básica porque ha generado nuevo conocimiento y nuevo campo de la investigación sobre el extracto alcohólico de granada.

3.1.2. Diseño de investigación: es una investigación experimental, porque se ha manipulado deliberadamente la variable independiente (diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico) para tener un efecto directo sobre la variable dependiente (desarrollo de *K. pneumoniae*). Las pruebas se han realizado in vitro, identificado que componentes están presentes en el extracto y evaluando el efecto sobre el crecimiento del cultivo bacteriano en estudio.

Se ha realizado en 3 partes:

Primera parte: la preparación y obtención del extracto hidroalcohólico, la preparación de las diferentes concentraciones del extracto de hojas de *P. granatum* y la identificación preliminar de los fitoconstituyentes en dicho extracto.

Segunda parte: la reactivación del cultivo puro de *K. pneumoniae*, la estandarización del cultivo puro por comparación al tubo 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland y la determinación del efecto de las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum*.

Tercera parte: la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la Concentración Mínima Bactericida (CMB) y el tipo de acción.

Finalmente se procesaron los datos estadísticamente para determinar el nivel de significancia entre tratamientos.

Todos los resultados obtenidos fueron recopilados y registrados en formato de Excel, donde las lecturas de las mediciones del halo de inhibición de

crecimiento fueron registradas en cm, los correspondientes al MIC observando la turbidez y al CMB observando el crecimiento por estría en medio sólido de las diferentes concentraciones en la bacteria en estudio

3.2. Variables y operacionalización:

- **Variable independiente:** Son las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum*
- **Definición conceptual:** Sustancias extraídas por maceración en etanol al 70% durante 7 días.
- **Definición operacional:** Preparado que se obtiene mediante un proceso de maceración, utilizado para elaborar soluciones a diferentes concentraciones.
- **Indicadores:** Concentraciones al: 0.56, 1.13, 2.13, 4.25 y 5.60% respectivamente.
- **Escala de medición:** De intervalo

- **Variable dependiente:** Crecimiento de *Klebsiella pneumoniae*
- **Definición conceptual:** Proceso mediante el cual se mide el crecimiento bacteriano.
- **Definición operacional:** Se determina midiendo el halo de inhibición del crecimiento bacteriano.
- **Indicadores:** Fue expresado en cm.
- **Escala de medición:** De intervalo.

3.3 Población, muestra y muestreo

3.3.1 Población:

BOTÁNICA

Está compuesto por el extracto hidroalcohólico de plantas de *P. granatum*.

MICROBIOLÓGICA:

Los cultivos de *K. pneumoniae*.

- **Criterios de inclusión:** Cultivo puro de *K. pneumoniae*
- **Criterios de Exclusión:** Cultivo de *K. pneumoniae* contaminado

3.3.2 Muestra:

El cultivo puro reactivado de *K. pneumoniae*. Este cultivo bacteriano fue donado por el Laboratorio de Bacteriología, Dpto. Acad. de Microbiología y Parasitología, Fac. CC. Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo (UNT), Trujillo Perú. (Anexo 4, pag 46.)

Extracto hidroalcohólico extraído mediante maceración de hojas secas y pulverizadas de *P. granatum*, filtrado por papel de filtro de poro grueso, concentrado por rotavapor y seco a estufa a 40°C.

3.3 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

El extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum* fue obtenido mediante la técnica de maceración, filtrado, concentración en rotavapor y seco a estufa. (Anexo 2, Fig. 3 y 4).

La determinación del efecto de concentraciones de 0.56, 1.13, 2.13, 4.25 y 5.60% del extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum* sobre el crecimiento de *K. pneumoniae* se realizó mediante difusión en agar Mueller-Hinton y la medición de los halos de inhibición se realizó en cm utilizando vernier. (Anexo – Fig 6).

Los datos se recolectaron elaborando una matriz Excel, en la cual se registraron los datos previos al ensayo y los resultados que se obtuvieron en cada uno de las pruebas y sus respectivas repeticiones (anexo 3)

Procedimientos

Las plantas fueron colectadas y seleccionadas y fueron en bolsa de papel y llevadas al Laboratorio de Tecnología enzimática y Productos Naturales del Dpto Acad. Química Biológica y Fisiología Animal, Fac. CC. Biológicas – UNT.

Las muestras de plantas se secaron a temperatura ambiental ($25\pm^{\circ}\text{C}$), molidas en molino de disco artesanal y tamizada, obteniendo así el polvo de *P. granatum*. (Anexo 3, Fig. 2).

Luego, se pesaron una cantidad de dicho polvo y se colocó alcohol al 70°, en una proporción aproximada de 1:5 y se maceró durante 7 días, con agitación periódica; luego se filtró con papel de filtro de poro grande, por tres veces a fin de eliminar restos orgánicos no deseables para los procesos siguientes³⁶. El filtrado se concentró en rotavapor (Heidolph) y secado completamente en estufa a 45°C.

Se pesó una pequeña cantidad de dicho extracto, se disolvió en 2,0 mL de agua destilada estéril (ADE), se homogeneizó y se centrifugó utilizando tubos estériles a 4000 rpm por 10 minutos; el sobrenadante fue transferido a un frasquito de penicilina estéril. A partir de esta concentración se realizaron y prepararon las otras concentraciones de ensayo.

Determinación del efecto del extracto hidroalcohólico de *P. granatum* sobre el crecimiento de *K. pneumoniae*.

El método utilizado fue de difusión en hoyos^{39,40}; para ello, se trabajó con una suspensión estándar *K. pneumoniae*, donde las colonias de la bacteria en estudio fueron suspendidas en suero salino fisiológico estéril (SSFE) y comparar una turbidez al tubo 0,5 del nefrómetro de McFarland equivalente a $1,5 \times 10^8$ ufc/mL; luego se sembró uniformemente en placas con agar Mueller-Hinton usando hisopos de algodón estériles sumergidos en suspensión, se secaron las placas Petri en estufa a 36°C por 20 min; se realizaron con un sacabocado estéril cinco pocillos con un diámetro de 6 mm y en ellos se colocaron diferentes volúmenes del extracto hidroalcohólico de *P. granatum* y se completó a 50 µL con SSFE, se dejó reposar para la difusión del extracto en el medio de cultivo y luego se incubaron las placas a 36°C por 24 horas⁴¹.

Este procedimiento se realizó por cinco veces para cada concentración del extracto, las que fueron de 0.560, 1.130, 2.125, 4.250 y 5.600 % respectivamente.

La medición del halo de inhibición se realizó con un vernier colocando sobre la placa Petri invertida y el diámetro medido a simple vista, en cm.

Determinación de la CMI sobre *K. pneumoniae*

Esto se realizó utilizando la técnica de macrodilución en caldo³⁷. Para ello, se preparó la concentración inicial del extracto hidroalcohólico, correspondiente a 50 mg/mL y a partir de ésta se realizaron 7 diluciones y se añadieron al medio en caldo Muller-Hinton, se sembró una alícuota de la suspensión estándar de *K. pneumoniae* descrita en el paso anterior y se incubaron durante 24 horas a 36°C. Esto se realizó por triplicado y también haciendo uso de un tubo sin sembrar el cual sirve para el control de esterilidad. (anexo 4)

Determinación de la CMB sobre *K. pneumoniae*.

Se colocaron 20 µL de cada tubo del sistema CMI incluidos aquellos libre de crecimiento de *K. pneumoniae* en agar MH. Para ello, la placa fue dividida en ocho zonas y en cada una se sembró una alícuota de cada tubo de CMI, se incubó a 36°C por 24 horas⁴¹. (anexo 5)

Determinación del tipo de acción (bactericida o bacteriostático) del extracto hidroalcohólico de *P. granatum*

La relación CMB/MIC fue calculado, de tal forma que, si el resultado obtenido se encuentra entre 1 y 2, se considera el extracto bactericida y entre 4 y 16 la acción bacteriostática⁴².

Identificación cualitativa de los principales componentes fitoquímicos presentes en el extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum*:

Se realizó de acuerdo a la marcha fitoquímica preliminar Look, O. 1996, en la cual se determinó la presencia o ausencia de manera cualitativa compuestos fenólicos, flavonoides, cardenólidos, esteroides y alcaloides, por reacciones de coloración y precipitación⁴³. (anexo 6).

3.4 Método de análisis de datos

Los datos recolectados fueron registrados en una matriz Excel y procesados en un software estadístico INFOSTAT (www.infostat.com.ar). Se realizó el un análisis de varianza (ANAVA) para determinar si existe o no diferencias significativas entre las concentraciones ensayadas o tratamiento y el test de Tukey para determinar cuáles son las concentraciones de ensayo que tienen diferencias.

3.5 Aspectos éticos

Tener en cuenta que los resultados obtenidos fueron tratados de forma confidencial y transferidos al informe de investigación. Asimismo, los datos obtenidos no han sido manipulados ni alterados para ser considerados plagio de otro trabajo de tal manera que pueden ser usados sabiamente para futuras investigaciones.

- **Confidencialidad:** De esta manera, se protegen las instituciones e investigadores que participan en la presente tesis.
- **Objetividad:** La situación presentada se analiza en base a criterios técnicos y objetivos.
- **Originalidad:** Se considera que los datos y la información bibliográfica de la presente tesis no acreditan plagio intelectual.
- **Honestidad:** La información mostrada en la presente tesis es veraz.

IV. RESULTADOS

Tabla 6. Efecto de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de hojas de *Punica granatum* sobre el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae*, expresado en diámetros de halos de inhibición de crecimiento (cm), obtenidos por el método de difusión en pocillos.

Concentración del extracto hidroalcohólico <i>P. granatum</i> (%)	Halo de inhibición del crecimiento de <i>K. pneumoniae</i> , expresado en cm. Con cinco repeticiones					PROMEDIO (cm)
	1	2	3	4	5	
0.560	1.90	1.80	1.90	1.90	1.80	1.860
1.130	2.00	2.20	2.20	2.20	2.10	2.140
2.125	2.30	2.30	2.40	2.30	2.40	2.340
4.250	2.60	2.60	2.60	2.60	2.70	2.620
5.600	2.60	2.60	2.70	2.60	2.70	2.640

Fuente de elaboración propia.

En la Tabla 1, se muestran los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento de *K. pneumoniae* obtenidos frente a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *P. granatum*. Dichas medidas fueron de 1.86, 2.14, 2.34, 2.62 y 2.64 cm respectivamente. El análisis estadístico mediante el ANAVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, muestran que existe diferencia significativa ($p < 0.01$) entre todas las concentraciones excepto las de 4.25 y de 5.6 (Fig 1).

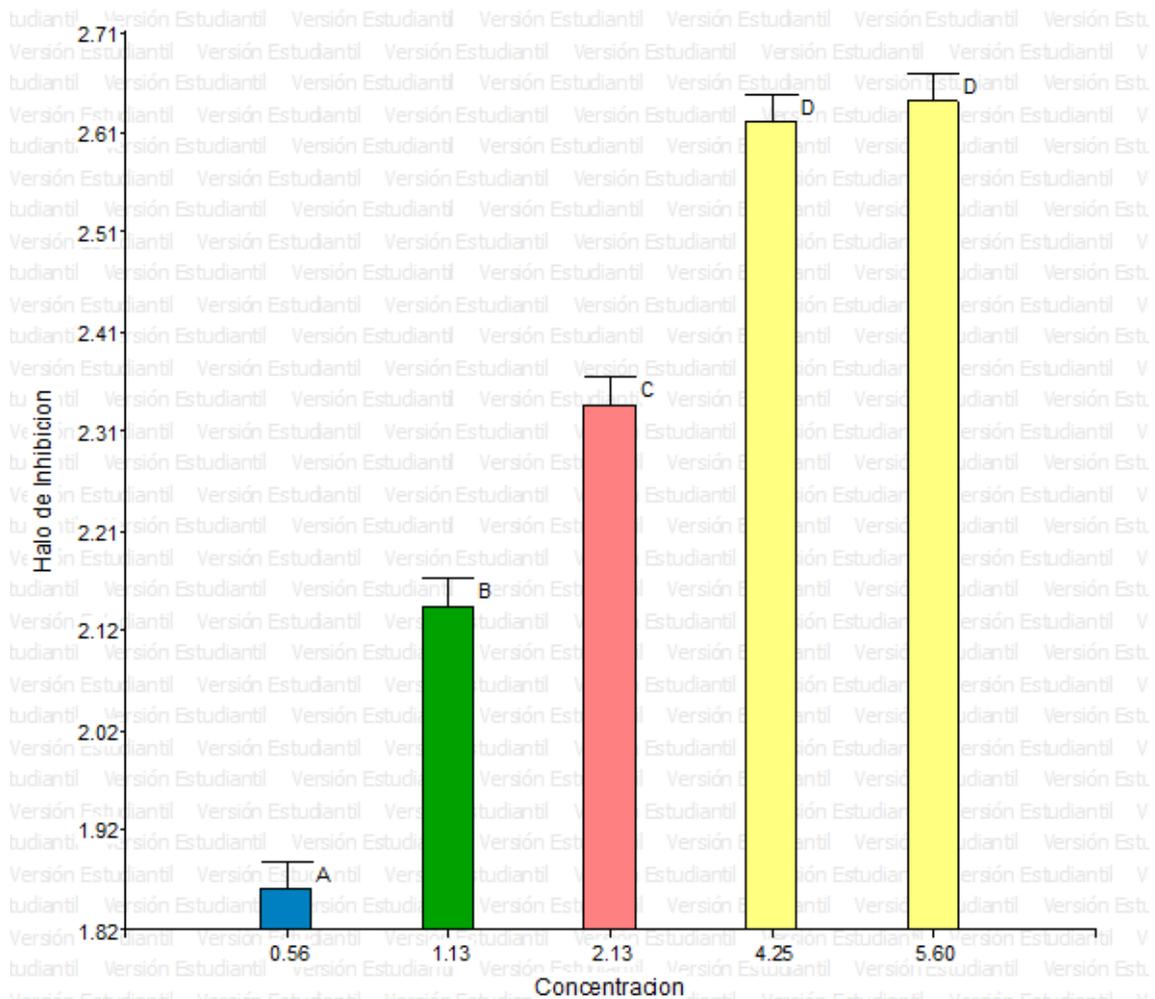


Fig. 1. Efecto de la concentración del extracto hidroalcohólico de *Punica granatum* sobre el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae*, in vitro.

Fuente de elaboración propia.

Tabla 2. Determinación de la CMI y CMB del extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum* sobre el crecimiento de *K. pneumoniae*, in vitro.

Extracto hidroalcohólico de <i>P. granatum</i> . (mg/mL)	Crecimiento de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	(CMI)	(CMB)
	X	X
50	-	-
25	-	+
12.5	+	+
6.25	+	+
3.12	+	+
1.56	+	+
0.78	+	+

“+” significa crecimiento; “-”, ausencia de crecimiento.

Fuente. Elaboración propia.

La concentración de 25 mg/mL de extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum* es la mínima concentración de dicho extracto que inhibió el crecimiento visible de *K. pneumoniae*. La concentración de 50 mg/mL fue la que se produjo una reducción superior al 99.9% de bacterias viables respecto al inóculo inicial.

En este trabajo la CMB fue de 50 mg/mL mientras que la CMI fue de 25 mg/mL lo cual al ser dividido entre 2 se halló como resultado que el efecto del extracto es tipo bactericida.

Tabla 3. Determinación del efecto in vitro del extracto hidroalcohólico de *Punica granatum* sobre el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae*.

	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMB/CMI	Efecto antibacteriano*
Extracto hidroalcohólico de <i>P. granatum</i>	25.0	50.0	2	Bactericida

Nota. *Si la relación CMB/CMI es 1 o 2 se considera como efecto bactericida, si es de 4 a 16, bacteriostático.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4. Identificación fitoquímica cualitativa de los principales componentes presentes en el extracto hidroalcohólico de hojas de *Punica granatum* según Loock, O. 1996.

Fitoconstituyentes en el extracto hidroalcohólico de hojas de <i>P. granatum</i>					
	Compuestos fenólicos (taninos)	Flavonoides	Esteroides	Cardenólidos	Alcaloides
Extracto hidroalcohólico de <i>P. granatum</i>.	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

“+” presente en el extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum*.

Fuente. Elaboración propia.

V. DISCUSIÓN

Este estudio planteó como objetivo el uso de los extractos de hojas de una planta para el control del crecimiento bacteriano. Esto va acorde con la literatura puesto que en estudios recientes se busca encontrar el efecto biocida de extractos de plantas y evidenciar la actividad antibacteriana sobre patógenos. Un caso específico es el del uso de extracto de *Costus pulverulentus* que y enterobacterias aisladas de muestras clínicas⁴⁴. Esto permite a los extractos vegetales representar un gran potencial a fin de implementar nuevas alternativas terapéuticas de infecciones y reinfecciones generadas por estos agentes patógenos.

Se determinó que las cuatro concentraciones experimentales de extracto hidroalcohólico de *P. granatum* presentan efecto significativo sobre efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *K. pneumoniae*. (figura 1) donde por cada aumento de concentración el efecto inhibitorio va de manera creciente llegando al punto de que las dos últimas concentraciones evidencian un efecto inhibitorio similar. Esta relación directamente proporcional entre la concentración y el efecto inhibitorio es el mismo patrón observado en investigaciones en las cuales se subraya la importancia de llegar a concentración óptimas inhibitorias tanto con otros agentes patológicos como con diferentes compuestos activos. En el contexto de la formación de biopelículas en enterococos, se ha demostrado que los antibióticos, incluso a concentraciones subinhibitorias, pueden promover este fenómeno, potencialmente conduciendo a una disminución en la susceptibilidad a los antibióticos⁴⁴. En investigaciones sobre poblaciones de *Escherichia coli* seleccionadas a concentraciones más bajas revelaron un desarrollo rápido de resistencia, aunque con una aptitud global inferior en presencia de antibióticos⁴⁵.

Como se puede observar en la Fig.1, todas las concentraciones del extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum* inhiben el crecimiento de *K. pneumoniae*, además las concentraciones de 0.56, 1.13, 2.13 y 4.25% generan presentan efecto diferente y creciente, en tanto las concentraciones de 4.25 y 5.60% muestran efecto

inhibitorio pero los efectos inhibitorios del crecimiento son estadísticamente iguales, lo que podría indicar que se generaría un efecto de saturación del extracto hidroalcohólico respecto a las estructuras bacterianas que estaría alterando lo que conllevaría a una pérdida de su funcionabilidad y por lo tanto la muerte bacteriana. En un artículo el cual evalúa la acción biocida del extracto hidroalcohólico de *C. pulverulentus* también sobre *K. pneumoniae* muestra que dicho extracto inhibe el 63% de la viabilidad de dicha bacteria a una concentración de 100 µg/mL (0,01%-p/v), un 42% en 10 µg/mL (0,001%-p/v), y 36% en 1 µg/mL (0,001%-p/v), no observándose efecto biocida en concentraciones de 0.1, 0.01 y 0.001 µg/mL⁴⁴.

En la investigación presentada no se podría explicar el porcentaje de inhibición dado ya que no se ha realizado como comparación con algún antibiótico estándar de uso en el tratamiento. Esto fue similar a lo encontrado en el estudio de León-Buitimea A, sobre *C. pulverulentus*, en el que se evaluó su efecto antioxidante y antibacteriano en modelos in vitro. Los extractos extraídos del tallo demostraron fuerte actividad antioxidante, el hidroalcohólico, en especial que inhibió significativamente el crecimiento micribiano en cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Proteus mirabilis*. Aunque sugiere el potencial de *C. pulverulentus* como fuente de agentes antioxidantes y antibacterianos, se necesita más investigación para identificar los fitoquímicos responsables de dicha actividad.⁴⁴

En el estudio de Cuervo Salcedo, donde los extractos fueron obtenidos por maceración (en frío) y por fracciones con diferentes solventes orgánicos de polaridad creciente, desde apolar, muy apolar, polar y muy polar, por lo tanto obtuvieron 4 extractos de hojas de *Drimys granadensis* (hexánico, clorofórmico, acetónico y metanólico); determinaron la CMI sobre bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *S. epidermis*) y bacterias Gram negativas (*K. pneumoniae* y *E. coli*). Encontrándose que la fracción metanólica mostró mejor efecto biocida sobre crecimiento de los cultivos estudiados a partir de 15 mg/mL⁴⁷; Estos resultados muestran alguna similitud con en este trabajo donde se demuestra que la concentración de 4.25% presenta la misma capacidad de inhibición que la

concentración de 5.60%, donde la primera concentración mencionada demostró ser la más efectiva, inhibiendo el crecimiento de *K. pneumoniae* de manera eficaz.

En tanto, otros investigadores evaluaron la actividad biocida in vitro de diferentes extractos de los cálices, tanto como de *Physalis peruviana* como de *Caesalpinia pulcherrima* también utilizando como cultivo de ensayo a *K. pneumoniae* y otras bacterias, encontrando que la CMI para las bacterias en estudio es aproximadamente 0.256 mg/mL respecto a diferentes extractos (clorofórmico, etanólico y de éter) obtenidos de los cálices de *P. peruviana* y las flores de *C. pulcherrima*⁴⁸.

En la presente investigación se encontró una CMI 25 mg/mL y una CMB de 50 mg/mL (Tabla 2) y el efecto que produce el extracto hidroalcohólico de *P. granatum* fue bactericida sobre el crecimiento de *K. pneumoniae* (Tabla 3). Lo cual significa que mediante estos resultados se determinó que el extracto de las hojas de *P. granatum* presenta un efecto bactericida sobre *K. pneumoniae* por otro lado el estudio de Pinheiro et al en el cual se demostró que el tratamiento con extracto de hojas de *P. granatum* mostró una reducción significativa en la inflamación pulmonar en ratones, marcada por una disminución de colonias y citoquinas. Estos resultados resaltan el potencial antiinflamatorio y antibacteriano de dicho extracto⁴⁸. Esta revisión mencionada puede ser tomada como segunda parte de este estudio experimental el cual sería poner en estudio el efecto que tendría este extracto en paciente susceptibles e inmunodeprimidos, no sin antes realizar un estudio toxicológico por nosotros mismos y demostrar estos resultados obtenidos. Verificando por nosotros mismos el efecto que pudiere generar como alternativa en la medicina complementaria, y si esto podría ser utilizado como complemento al tratamiento indicado en enfermedades infecciosas resistentes a los antibióticos, sobre todo en neumonía por *K. pneumoniae*, donde esta enfermedad solo puede ser tratada con cefalosporinas o quinolonas, ya que esta bacteria es resistente a las penicilinas y carbapenems, por ende sería una buena opción incluir como alternativa este extracto que podría darnos múltiples beneficios en este aspecto.

Cabe resaltar, que otro varios trabajos muestran a extractos distintos al hidroalcohólico o etanólico, como el extracto salino ⁴⁷, lo que conlleva a una reflexión importante ya que los solventes utilizados para la extracción de los compuestos fitoquímicos son generalmente de grado técnico, comercial o químicamente puro y en dichos trabajos no se muestra el grado de los solventes utilizados; lo que podría explicar en parte la capacidad que tienen éstos para inhibir el crecimiento bacteriano, ya que se conoce en la obtención de los solventes se utiliza materia prima muy contaminada con metales pesados u otras moléculas que influyen directamente en la actividad ya que quedan formando parte del extracto cuando se le enfrenta a los organismos indicadores o marcadores.

Una de las moléculas identificadas preliminarmente en el extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum* son los taninos o compuestos fenólicos. Éstos en su estructura presentan el anillo fenólico, con una alta reactividad y se ha demostrado que juegan un rol importante en los vegetales en la defensa contra insectos, atracción de polinizadores, absorción de luz ultravioleta, entre otros. Al estar formados por uno o más anillos aromáticos y grupos hidroxilo, forman diferentes estructuras químicas, dividiéndose en distintos grupos: ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, estilbenos y lignanos⁴⁹.

Por otro lado, los flavonoides han demostrado mayores actividades antibacterianas, son moléculas complejas, mezcla de polifenoles altamente condensados. Suelen ser tóxicos para hongos y bacterias debido a su mecanismo de acción en la inhibición de enzimas de los organismos afectados, enlazándose fuertemente a dichas enzimas; por otro lado, alteran la membrana celular, alterando su estructura y función en el metabolismo celular, también presentan alta capacidad de unirse a los iones metálicos, disminuyendo así la disponibilidad de estos iones para el desarrollo celular y finalmente presenta la propiedad de precipitar proteínas, inhibiendo así toda capacidad de desarrollo celular.

Por todo lo descrito anteriormente y en otros trabajos de investigación se puede afirmar que el extracto hidroalcohólico de *P. granatum* es una buena alternativa para el tratamiento tópico y que probablemente con estudios más especializados de la cinética de las biomoléculas presentes en dicho extracto pueda ser utilizado para infecciones sistémicas, y que probablemente los fitoconstituyentes que se encuentren las hojas, también estén presentes en el fruto el cual es comestible, por lo tanto no genere problemas de intoxicación y alergia, manteniendo los criterios éticos respecto a la concentración y el tiempo de tratamiento.

VI. CONCLUSIONES

De acuerdo a las condiciones de trabajo en la ejecución de la presente tesis se puede concluir lo siguiente:

1. El extracto hidroalcohólico de hojas de *Punica granatum* inhibe el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae*, in vitro.
2. El extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum* presenta una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 25 mg/mL y una concentración mínima bactericida (CMB) de 50 mg/mL.
3. El efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum* sobre el crecimiento de *K. pneumoniae* es de tipo bactericida.
4. Los fitoconstituyentes del extracto hidroalcohólico de hojas de *Punica granatum* identificados cualitativamente fueron compuestos fenólicos (taninos), flavonoides, esteroides, cardenólidos y alcaloides.

VII. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos y a la información bibliográfica revisada, se recomienda:

- Realizar un estudio comparativo de los componentes bioactivos presentes en las hojas, cascara del fruto y en el endocarpio del fruto mismo.
- Evaluar el aspecto toxicológico del extracto hidroalcohólico de *P. granatum* en organismos marcadores animales (*Artemia salina* o pez cebra).
- Evaluar la dinámica de eliminación de los biocomponentes que tienen el efecto bactericida en animales de laboratorio (ratas o ratones).

REFERENCIAS

1. Kim KJ, Liu X, Komabayashi T, Jeong SI, Selli S. Natural Products for Infectious Diseases. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM. 2016;2016:9459047.
2. Najmi A, Javed SA, Al Bratty M, Alhazmi HA. Modern Approaches in the Discovery and Development of Plant-Based Natural Products and Their Analogues as Potential Therapeutic Agents. Molecules. 2022;27(2):349.
3. Haq SM, Calixto ES, Yaqoob U, Ahmed R, Mahmoud AH, Busmann RW, et al. Traditional Usage of Wild Fauna among the Local Inhabitants of Ladakh, Trans-Himalayan Region. Animals (Basel). 2020;10(12):2317.
4. Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, International Natural Product Sciences T, Supuran CT. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. Nat Rev Drug Discov. 2021;20(3):200-16.
5. Mohd Zaid NA, Sekar M, Bonam SR, Gan SH, Lum PT, Begum MY, et al. Promising Natural Products in New Drug Design, Development, and Therapy for Skin Disorders: An Overview of Scientific Evidence and Understanding Their Mechanism of Action. Drug design, development and therapy. 2022;16:23-66.
6. Shaygannia E, Bahmani M, Zamanzad B, Rafieian-Kopaei M. A Review Study on Punica granatum L. Journal of evidence-based complementary & alternative medicine. 2016;21(3):221-7.
7. El-Aguel A, Pennisi R, Smeriglio A, Kallel I, Tamburello MP, D'Arrigo M, et al. Punica granatum Peel and Leaf Extracts as Promising Strategies for HSV-1 Treatment. Viruses. 2022;14(12).
8. Trabelsi A, El Kaibi MA, Abbassi A, Horchani A, Chekir-Ghedira L, Ghedira K. Phytochemical Study and Antibacterial and Antibiotic Modulation Activity of Punica granatum (Pomegranate) Leaves. Scientifica. 2020;2020:8271203.

9. Valero-Mendoza A, Meléndez-Rentería N, Chávez-González M, Flores-Gallegos A, Wong-Paz J, Govea-Salas M, et al. The whole pomegranate (*Punica granatum*. L), biological properties and important findings: A review. *Food Chemistry Advances*. 2023;2:100153.
10. Momenpour A, Dehestani Ardakani M, Shirmardi M, Gholamnezhad J, Ahmadi F, Jamaati Z. Salinity tolerance evaluation of twelve selected pomegranate (*Punica granatum*) genotypes to achieve tolerant cultivars and rootstocks. *Journal of Horticulture and Postharvest Research*. 2022;5(4):363-78.
11. Yari S, Mirjalili SA, Mousavi SA, Poorazizi E. Nutritional evaluation of 24 Iranian *Punica granatum* genotypes. 2022.
12. Harkov S. Morphological, anatomical and phytochemical study of *punica granatum* linn. *Knowledge-International Journal*. 2020;40(5):863-6.
13. Ge S, Duo L, Wang J, Yang J, Li Z, Tu Y. A unique understanding of traditional medicine of pomegranate, *Punica granatum* L. and its current research status. *Journal of ethnopharmacology*. 2021;271:113877.
14. Castaño Osorio JC, Giraldo García AM. Antiparasitic phytotherapy perspectives, scope and current development. *Infectio*. 2019;23(2):189-204.
15. Qahir A, Khan N, Hakeem A, Kamal R. The antioxidant, antimicrobial, and clinical effects with elemental contents of pomegranate (*Punica granatum*) peel extracts: A review. *Baghdad Journal of Biochemistry and Applied Biological Sciences*. 2021;2(01):21-8.
16. Jalali A, Kiafar M, Seddigh M, Zarshenas MM. *Punica granatum* as a source of natural antioxidant and antimicrobial agent: A comprehensive review on related investigations. *Current drug discovery technologies*. 2021;18(2):207-24.
17. Fourati M, Smaoui S, Hlima HB, Elhadek K, Braïek OB, Ennouri K, et al. Bioactive compounds and pharmacological potential of pomegranate (*Punica granatum*) seeds-a review. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2020;75:477-86.
18. Elshafie HS, Caputo L, De Martino L, Sakr SH, De Feo V, Camele I. Study of bio-pharmaceutical and antimicrobial properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) leathery exocarp extract. *Plants*. 2021;10(1):153.

19. da Silva PM, da Silva BR, de Oliveira Silva JN, de Moura MC, Soares T, Feitosa APS, et al. Punica granatum sarcotesta lectin (PgTeL) has antibacterial activity and synergistic effects with antibiotics against β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;135:931-9.
20. Alamshani H, Al-Sarraj W, Algamdi F. The inhibitory effect of *Punica granatum* on *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* extended spectrum β -lactamase strains. *Novel Res Microbiol J*. 2023;7(1):1836-56.
21. Ashurst JV, Dawson A. *Klebsiella Neumonía*. [Actualizado el 20 de julio de 2023]. En: StatPearls [Internet]. Isla del Tesoro (FL): StatPearls Publishing; 2023 enero-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519004/>.
22. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*. 2017;41(3):252-75.
23. Jondle CN, Gupta K, Mishra BB, Sharma J. *Klebsiella pneumoniae* infection of murine neutrophils impairs their efferocytic clearance by modulating cell death machinery. *PLoS pathogens*. 2018;14(10):e1007338.
24. Choby JE, Howard-Anderson J, Weiss DS. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* - clinical and molecular perspectives. *Journal of internal medicine*. 2020;287(3):283-300.
25. Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical microbiology reviews*. 2019;32(3).
26. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(17):6278.
27. Kaur CP, Vadivelu J, Chandramathi S. Impact of *Klebsiella pneumoniae* in lower gastrointestinal tract diseases. *Journal of digestive diseases*. 2018;19(5):262-71.

28. Doorduyn DJ, Rooijackers SH, van Schaik W, Bardeel BW. Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. *Immunobiology*. 2016;221(10):1102-9.
29. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2016;80(3):629-61.
30. Tufa TB, Fuchs A, Tufa TB, Stötter L, Kaasch AJ, Feldt T, et al. High rate of extended-spectrum beta-lactamase-producing gram-negative infections and associated mortality in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrobial resistance and infection control*. 2020;9(1):128.
31. Shyaula M, Khadka C, Dawadi P, Banjara MR. Systematic Review and Meta-analysis on Extended-Spectrum β -lactamases Producing *Klebsiella pneumoniae* in Nepal. *Microbiology insights*. 2023;16:11786361221145179.
32. Logan LK, Weinstein RA. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. *The Journal of infectious diseases*. 2017;215(suppl_1):S28-s36.
33. Mathers AJ, Stoesser N, Sheppard AE, Pankhurst L, Giess A, Yeh AJ, et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* at a single institution: insights into endemicity from whole-genome sequencing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(3):1656-63.
34. Taneja N, Kaur H. Insights into Newer Antimicrobial Agents Against Gram-negative Bacteria. *Microbiology insights*. 2016;9:9-19.
35. Shokouhi S, Sahraei Z. A review on colistin nephrotoxicity. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2015;71(7):801-10.
36. Lateef RH. Determination the antibacterial activity of *Punicagranatum* Extract towards *Streptococcus Pneumonia* and *Klebsella Pneumonia*. *Tik J of Pure Sci*. 2019;24(2):14-8.
37. Pinheiro A, Gonçalves JS, Dourado Á WA, de Sousa EM, Brito NM, Silva LK, et al. *Punica granatum* L. Leaf Extract Attenuates Lung Inflammation in Mice with Acute Lung Injury. *Journal of immunology research*. 2018;2018:6879183.

38. Sousa MN, Macedo AT, Ferreira GF, Furtado HLA, Pinheiro A, Lima-Neto LG, et al. Hydroalcoholic Leaf Extract of *Punica granatum*, alone and in Combination with Calcium Hydroxide, Is Effective against Mono- and Polymicrobial Biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Antibiotics* (Basel, Switzerland). 2022;11(5).
39. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically [Internet]. Clsi.org. [citado el 21 de diciembre de 2023]. Disponible en: https://clsi.org/media/1928/m07ed11_sample.pdf.
40. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* [Internet]. 2016;6(2):71–9. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177915300150>.
41. Merck, *Microbiology Manual*, 12th edition. Merck, Darmstadt, Germany. 2005.
42. Konaté K, Hilou A, Mavoungou JF, Lepengué AN, Souza A, Barro N, Datté JY, M'batchi B, Nacoulma OG. Antimicrobial activity of polyphenol-rich fractions from *Sida alba* L. (Malvaceae) against co-trimoxazol-resistant bacteria strains. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2012 Feb 24; 11: 5. doi: 10.1186/1476-0711-11-5.
43. Lock Sing de Ugaz O. *Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales* [Internet]. Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994 [citado el 21 de diciembre de 2023]. Disponible en: <https://repositorio.pucp.edu.pe/index/handle/123456789/181719>.
44. León-Buitimea A y. Evaluación del efecto antioxidante y antibacteriano de extractos de *Costus pulverulentus* en modelos in vitro [Internet]. Ecorfan.org. [citado el 21 de diciembre de 2023]. Disponible en: https://www.ecorfan.org/bolivia/researchjournals/Ciencias_de_la_Salud/vol3num6/Revista_Ciencias_de_la_Salud_V3_N6_5.pdf.
45. Bernardi S, Anderson A, Macchiarelli G, Hellwig E, Cieplik F, Vach K, et al. Subinhibitory Antibiotic Concentrations Enhance Biofilm Formation of Clinical *Enterococcus faecalis* Isolates. *Antibiotics* (Basel, Switzerland). 2021;10(7).
46. Lagator M, Uecker H, Neve P. Adaptation at different points along antibiotic concentration gradients. *Biology letters*. 2021;17(5):20200913.

47. Cuervo Salcedo D, Vanegas Campos J, Corzo Barragán D, Correa Mahecha F. Evaluación de la capacidad bactericida de extractos vegetales de distinta polaridad de *Drimys granadensis*. *Revista Peruana de Biología*. 2019;26:135-42.
48. Franco-Ospina LA, Matiz-Melo GE, Pajaro-Bolivar IB, Gomez-Estrada HA. Actividad antibacteriana in vitro de extractos y fracciones de *Physalis peruviana* L. y *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*. 2013;12(3):230-7.
49. Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI. Extraction of phenolic compounds: A review. *Current research in food science*. 2021;4:200-14.

ANEXOS

Anexo 1. Tabla de operacionalización de variables

Matriz de operacionalización de la variables e indicadores.

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Tipo de Variable		ESCALA
				Según su naturaleza	Según su función	
V.I: Las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>P. granatum</i>	Sustancia que se elabora a partir de macerados en alcohol etílico de diferentes graduaciones según el activo a extraer. Mediante el proceso de maceración en etanol al 70% durante días.	Preparado obtenido por un proceso de maceración, el que se utilizará para elaborar soluciones a diferentes concentraciones.	Concentraciones al: 0,56% 1,13% 2,13% 4,25% 5,60%	Cuantitativa	Independiente	De intervalo
V. D.: Crecimiento de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Proceso que mide la eficacia y el poder antibacteriano frente a la bacteria de estudio.	Se define como la mínima concentración del extracto vegetal causante de la inhibición bacteriana.	Diámetro de halos de inhibición expresada en (cm). -Turbidez del tubo	Cuantitativo	Dependiente	De intervalo

ANEXO 02: MATRIZ DE CONSISTENCIA

ANEXO 2: MATRIZ DE CONSISTENCIA				
TÍTULO: Efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de Punica granatum sobre el crecimiento de Klebsiella pneumoniae, in vitro				
PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES/ INDICADORES	METODOLOGÍA
<p>GENERAL:</p> <p>-¿Cuál es el efecto de la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>P. granatum</i> sobre el crecimiento de <i>K. pneumoniae</i> in vitro</p>	<p>GENERAL:</p> <p>- Evaluar el efecto de la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>P. granatum</i> sobre el crecimiento de <i>K. pneumoniae</i></p> <p>ESPECÍFICOS:</p> <p>-Identificar cualitativamente los fitoconstituyentes contenidos en el extracto hidroalcohólico de <i>P. granatum</i></p> <p>-Determinar el efecto de cada concentración de extracto hidroalcohólico de <i>P. granatum</i> sobre el crecimiento de <i>K. pneumoniae</i> mediante el método de difusión en agar.</p> <p>- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto hidroalcohólico de las hojas <i>P. granatum</i>, sobre <i>K. pneumoniae</i></p>	<p>HIPÓTESIS</p> <p>- A medida que se incrementa la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>P. granatum</i>, disminuye el crecimiento de <i>K. pneumoniae</i>, in vitro</p>	<p>a) <u>V1: Independiente</u></p> <p>- concentraciones del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>P. granatum</i></p> <p>c) <u>V2: Dependiente</u></p> <p>- Crecimiento de <i>K. pneumoniae</i></p>	<p><u>1. Tipo:</u> básica</p> <p><u>2. Diseño:</u> experimental</p> <p><u>3.- Población</u></p> <p>- extracto hidroalcohólico de plantas de <i>P. granatum</i>.</p> <p>- Los cultivos de <i>K. pneumoniae</i>.</p> <p>-Criterios de inclusión: Cultivo puro de <i>K. pneumoniae</i> puro.</p> <p>-Criterios de Exclusión: Cultivo de <i>K. pneumoniae contaminado</i></p> <p><u>4.- Muestra:</u> El cultivo puro reactivado de <i>K. pneumoniae</i>, este cultivo bacteriano fue donado por el Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Fac. dCC. Biológicas, UNT, Trujillo Perú.</p> <p><u>5- Técnicas e instrumentos de recolección de datos:</u> Método por difusión en agar y la medición en cm de los halos de inhibición de crecimiento se realizó utilizando un vernier</p> <p><u>6.- Análisis de datos o estadístico:</u> Se determinó el efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>P. granatum</i> sobre el crecimiento de <i>K. pneumoniae</i> , llevando cabo un análisis en la medición del crecimiento l expresado en cm del crecimiento de <i>P. granatum</i> a diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico y se procesaron los datos en base a la prueba de Varianza Unidireccional (ANOVA), según el software Infostat.</p>

ANEXO 03: Tabla de recolección de datos del efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum* sobre el crecimiento de *K. pneumoniae*, trabajadas en condiciones aeróbicas a la temperatura de incubación 36°c por 24 horas.

Concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum*

0.254g disueltos en 2mL **Stock 1.... 25.4%**

Dilución al medio **Stock 2... 12.7%**

Se ha trabajado con una solución

7.0%.... Stock de trabajo

Medidas del halo de inhibición de crecimiento de K. pneumoniae expresado en cm.

REPETICIONES

PROMEDIO (cm)

$C_1V_1=C_2V_2$	μL extracto en 50 μL sol.	%	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	
$7\% \cdot 4\mu\text{L} = X\% \cdot 50\mu\text{L}$	4	0.560	1.90	1.80	1.90	1.90	1.80	1.860
$7\% \cdot 8\mu\text{L} = X\% \cdot 50\mu\text{L}$	8	1.130	2.00	2.20	2.20	2.20	2.10	2.140
$7\% \cdot 15\mu\text{L} = X\% \cdot 50\mu\text{L}$	15	2.125	2.30	2.30	2.40	2.30	2.40	2.340
$7\% \cdot 30\mu\text{L} = X\% \cdot 50\mu\text{L}$	30	4.250	2.60	2.60	2.60	2.60	2.70	2.620
$7\% \cdot 40\mu\text{L} = X\% \cdot 50\mu\text{L}$	40	5.600	2.60	2.60	2.70	2.60	2.70	2.640

Fuente de elaboración propia.

ANEXO 4: Tabla de recolección de datos para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum* sobre el crecimiento de *K. pneumoniae*.

Solución stock del extracto hidroalcohólico	Volumen (uL)	Concentración final del extracto hidroalcohólico de <i>P. granatum</i> Para determinar CMI (mg/mL)	Crecimiento (turbidez del tubo) de <i>K. pneumoniae</i>		
			Repeticiones		
$C_{1mg}V_{1mL}=C_{2mg}V_{2mL}$			1	2	3
127* X=50.0*3	1200	50	-	-	-
127* X=25.0* 3	600	25	-	-	-
127* X=12.5* 3	300	12.5	+	+	+
Stock 1 12,7% 127* X=6.25* 3	150	6.25	+	+	+
127* X=3.12* 3	75	3.12	+	+	+
127* X=1.56* 3	37	1.56	+	+	+
127* X=0.78* 3	18	0.78	+	+	+
Control de esterilidad (medio sin extracto ni inóculo)	0	0	-	-	-

(+): turbidez, crecimiento de *K. pneumoniae*

(-): transparente, no crecimiento de *K. pneumoniae*

Fuente de elaboración propia.

ANEXO 5: Tabla de recolección de datos para la determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum* sobre el crecimiento de *KK pneumoniae* en medio agar Mueller_Hinton.

Tubo N°	Extracto hidroalcohólico de <i>P. granatum</i> . (mg/mL)	Concentración Mínima Bactericida (CMB) del Extracto hidroalcohólico de <i>P. granatum</i> sobre el crecimiento de <i>K. pneumoniae</i>		
		repeticiones		
		1	2	3
1	50	-	-	-
2	25	+	+	+
3	12.5	+	+	+
4	6.25	+	+	+
5	3.12	+	+	+
6	1.56	+	+	+
7	0.78	+	+	+

(+): crecimiento bacteriano sobre las estrías de siembra en el medio agar Mueller-Hinton

(-): ausencia de crecimiento bacteriano sobre las estrías de siembra en el medio agar Mueller-Hinton.

Fuente de elaboración propia.

ANEXO 6: Tabla de recolección de datos de la identificación cualitativa de los componentes presentes en el extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum*, según marcha de identificación preliminar de Loock, O. 1996.

Componentes presentes en el extracto hidroalcohólico de hojas de <i>P. granatum</i>	Reactivo	Preparación	Respuesta
Compuestos fenólicos (taninos)	FeCl₃	Sol FeCl ₃ 1%	+
Flavonoides	Shinoda	Limaduras Mg/ HCl _{cc}	+
Esteroides	Liebermann-Burchard	Alícuotas ácido acético/sol. anhídrido acético en ácido sulfúrico (50:1)	+
Cardenólidos	Baljet	Sol. ac. Pícrico en etanol 1% + sol. NaOH 10%	+
Alcaloides	Mayer/Wagner	Sol. HgCl ₂ 1.36% + sol. KI 5% Sol. I ₂ + sol. KI 2%	+

(+): respuesta positiva al reactivo, indica presencia cualitativa del fitoconstituyente de prueba.

La identificación se realizó una sola vez.

Fuente de elaboración propia

Anexo 8. Evidencia fotográfica de ejecución de investigación



Figura. Obtención y tratamiento de las hojas de *P. granatum*.

Fuente de elaboración propia

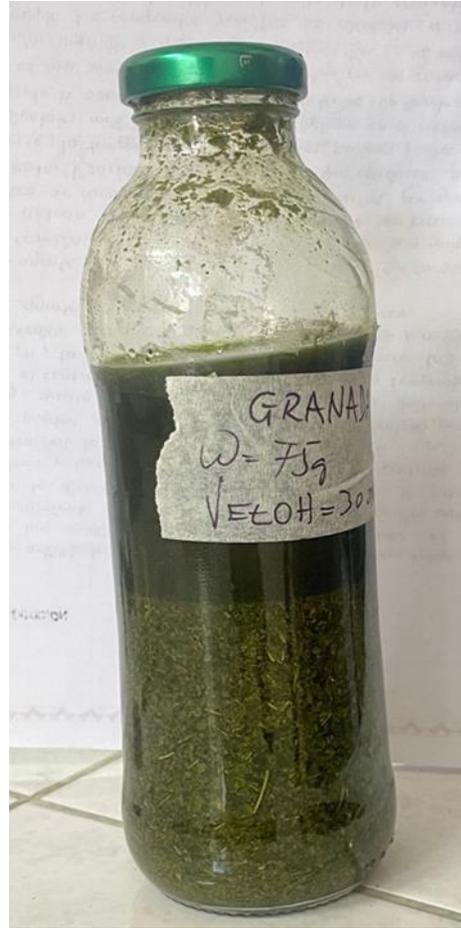
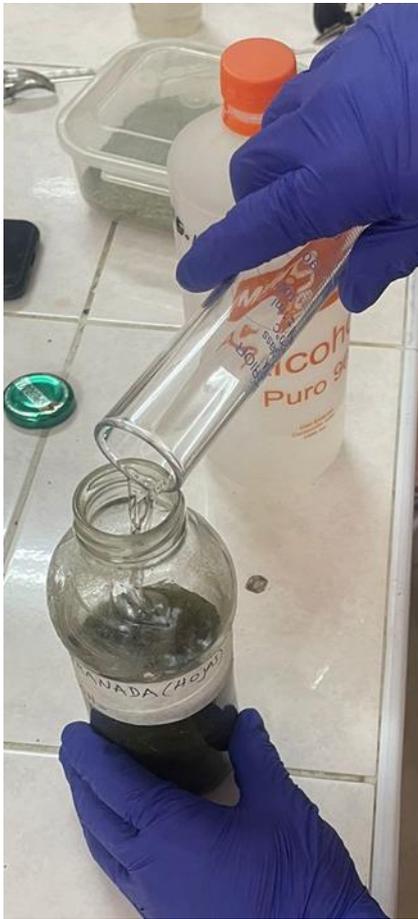


Figura 3 Preparación del extracto hidroalcohólico por el método de maceración.

Fuente de elaboración propia.

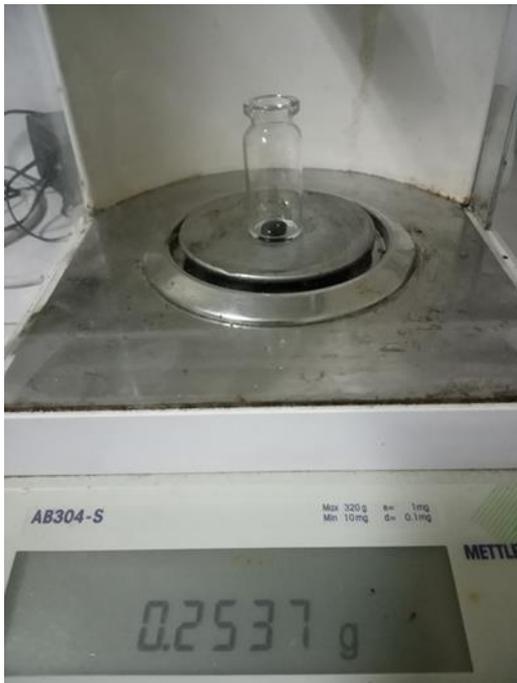


Figura 4. Obtención de la solución stock para determinar el efecto del extracto hidroalcohólico sobre el crecimiento de *K. pneumoniae*

Fuente de elaboración propia

Anexo 4. Carta de donación de la bacteria de estudio.

CARTA DE DONACIÓN

De: El laboratorio de Bacteriología del Dpto Acad. de Microbiología y Parasitología, la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo Perú.

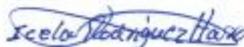
Para: Dr. Marco Leoncio Salazar Castillo, profesor Principal T.C. de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo.

Asunto: Donación de un organismo del cepario del laboratorio de Bacteriología.

Por medio de la presente, el laboratorio del Bacteriología del Dpto. Acad. de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Trujillo, y en su nombre la Dra. Icela Marissa Rodríguez Haro, otorga en calidad de donación a favor del Profesor Marco Leoncio Salazar Castillo (asesor) y Brasilia Estefanía Carbonell Olivares (tesista) la bacteria *Klebsiella pneumoniae* para realizar investigación en la tesis titulada "Efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *Punica granatum* sobre el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae*, in vitro".

Se hace constar que dicha donación se realiza en forma **GRATIUTA Y DESINTERESADA** para los fines antes indicados.

Sin otro particular, quedo de ustedes.



Dra. Icela Marissa Rodríguez Haro
Cód. UNT 4008
Laboratorio de Bacteriología
Dpto. Acad. Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNT Trujillo

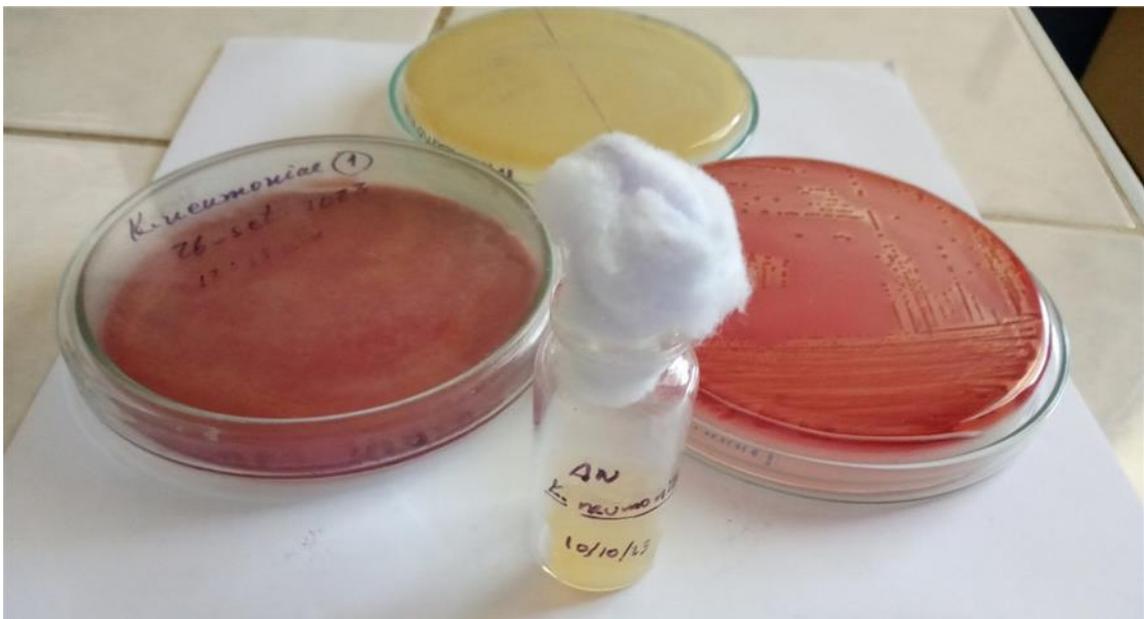


Figura 5. Reactivación de *K. pneumoniae* en cultivo puro

Fuente de elaboración propia

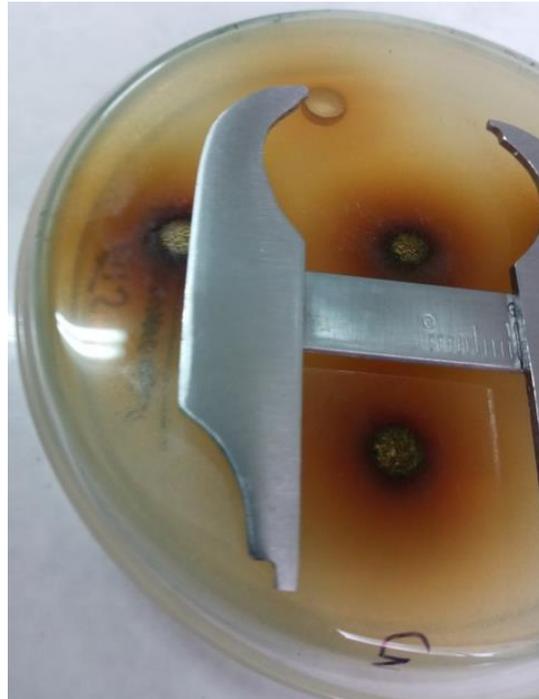
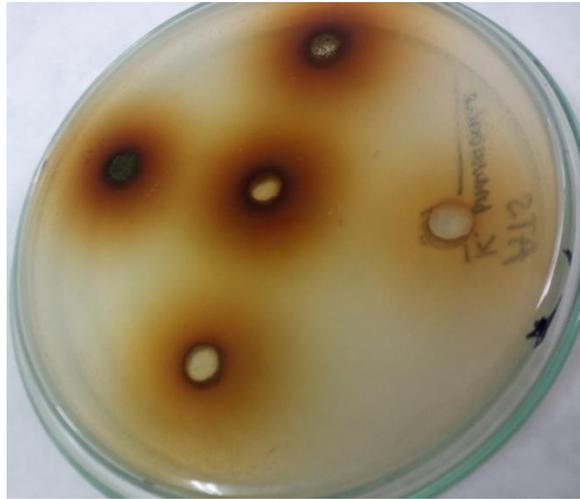


Figura 6. Efecto de las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de hojas de *P. granatum* sobre el crecimiento de *K. pneumoniae*

Fuente de elaboración propia



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA**

Declaratoria de Autenticidad del Asesor

Yo, SALAZAR CASTILLO MARCO LEONCIO, docente de la FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD de la escuela profesional de MEDICINA de la UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO SAC - PIURA, asesor de Tesis titulada: "Efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de Punica granatum sobre el crecimiento de Klebsiella pneumoniae, in vitro", cuyo autor es CARBONELL OLIVARES BRASILIA ESTEFANIA, constato que la investigación tiene un índice de similitud de 13.00%, verificable en el reporte de originalidad del programa Turnitin, el cual ha sido realizado sin filtros, ni exclusiones.

He revisado dicho reporte y concluyo que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber y entender la Tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad César Vallejo.

En tal sentido, asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada, por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas vigentes de la Universidad César Vallejo.

PIURA, 23 de Diciembre del 2023

Apellidos y Nombres del Asesor:	Firma
SALAZAR CASTILLO MARCO LEONCIO DNI: 17903338 ORCID: 0000-0001-6234-0092	Firmado electrónicamente por: SALAZARCAS el 19- 01-2024 15:17:55

Código documento Trilce: TRI - 0707696