



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE MEDICINA

TÍTULO

EFICACIA ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Cymbopogon citratus* “HIERBA LUISA” SOBRE *Escherichia coli* ATCC25922 COMPARADA CON CIPROFLOXACINO

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE

MÉDICO CIRUJANO

AUTOR

STEPHANIE ELIZABETH FERNÁNDEZ ROBLES

ASESORES

DRA. MARÍA ROCÍO DEL PILAR LLAQUE SÁNCHEZ

MG. JAIME POLO GAMBOA

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TRANSMISIBLES

Trujillo – Perú

2018

DEDICATORIA

A mis padres Heber y Elizabeth

Con todo el amor por ser parte vital en mi formación personal y académica, por brindarme su apoyo incondicional y darme las fuerzas para seguir adelante y conseguir mis metas.

A mi amada hija, Zoe

Por ser mi motor y motivo para cada día ser mejor, quien es mi fortaleza para no desvanecer, por brindarme todo ese amor tan puro e inocente y darme la valentía para afrontar los caminos duros.

A mí querido Elber

Con todo el cariño por ser mi compañero fiel, por brindarme una palabra de aliento y su leal apoyo en las buenas y las malas.

Stephanie Fernández Robles

AGRADECIMIENTO

A Dios

Por guiar e iluminar cada uno de mis pasos, por permitirme llegar hasta aquí y poder lograr uno de mis tantos objetivos, por brindarme la fuerza necesaria para no caer frente a las adversidades.

A mis asesores

Por ser parte fundamental en el desarrollo de este proyecto, por brindarme la paciencia, orientación y conocimiento necesario. Por confiar en mi persona y siempre creer que lograría este anhelado sueño de obtener mi título profesional.

A mi universidad

Mi segundo hogar, que me acogió para poder iniciar mi carrera profesional.

Stephanie Fernández Robles

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo, STEPHANIE ELIZABETH FERNÁNDEZ ROBLES con DNI 76323357, estudiante de la Escuela Profesional de Medicina Humana de la Facultad de Ciencias Médicas, a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, declaro bajo juramento que todos los datos e información que acompañan a la Tesis titulada: **Eficacia antibacteriana del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* “hierba luisa” sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 comparada con ciprofloxacino**, son:

1. De mi autoría.
2. He respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas; por tanto, la tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente.
3. La tesis no ha sido autoplagiada; es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados ni copiados y por tanto los resultados que se presenten en la tesis se constituirán en aportes a la realidad investigada.

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.

Trujillo, 23 de noviembre del 2018.

STEPHANIE FERNÁNDEZ ROBLES

DNI 76323357

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada: Eficacia antibacteriana del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* “hierba luisa” sobre *Escherichia coli* ATCC25922 comparada con ciprofloxacino, la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de Médico Cirujano.

(AUTOR)

ÍNDICE

PÁGINAS PREELIMINARES	
PÁGINA DEL JURADO	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD	iv
PRESENTACIÓN	v
ÍNDICE	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA.....	1
1.2. TRABAJOS PREVIOS.....	2
1.3. TEORÍA RELACIONADA AL TEMA	4
1.4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA:.....	8
1.5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO:.....	8
1.6. HIPÓTESIS:	8
1.7. OBJETIVOS.....	9
1.7.1. OBJETIVO GENERAL:.....	9
1.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	9
II. MÉTODO	10
2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y TIPO DE INVESTIGACIÓN:.....	10
2.2. VARIABLES Y OPERALIZACIÓN.....	11
Operacionalización de variables:.....	11
2.3. POBLACIÓN Y MUESTRA	12
2.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD	13
2.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS.....	14
2.6. ASPECTOS ÉTICOS:.....	14
III. RESULTADOS	15
IV. DISCUSIÓN.....	19
V. CONCLUSIONES.....	22
VI. RECOMENDACIONES	22
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
VIII. ANEXOS.....	28

RESUMEN

El objetivo principal de la presente investigación fue evaluar si el aceite esencial de la hoja de *Cymbopogon citratus* “hierba luisa” tiene efecto antimicrobiano frente a cepas de *Escherichia coli* comparado con ciprofloxacino a dosis de 30 μg , en un estudio in vitro. Al llevar a cabo el estudio microbiológico, se usó el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* a cuatro diluciones (100%, 75%, 50%, 25%), y control negativo con agua destilada. Se realizaron 12 repeticiones por cada grupo estudiado. Encontrándose efecto inhibitorio a la dilución del 100% (13.58mm, DS: 1.084 ± 0.313 ; IC 95%; 12.89-14.27) valores considerados como eficacia baja según la denominación CLSI ($>21\text{mm}$), sin embargo no supera el halo de inhibición del medicamento ciprofloxacino con (28.58 mm, DS: 1.676 ± 0.484 ; IC 95%; 27.52-29.65). Al 75% el efecto inhibitorio fue (10.50mm, DS: 0.674 ± 0.195 ; IC 95%; 10.07-10.93), al 50% fue (7.42mm, DS: 0.996 ± 0.288 ; IC 95%; 6.78-8.05mm), mientras que al 25% no se observó efecto antibacteriano. El análisis ANOVA fue altamente significativo (0.000) al igual que la prueba de Tukey demostró que los grupos evaluados eran homogéneos. Se concluye que el aceite esencial de la hoja de *Cymbopogon citratus* presentó cierto grado de inhibición, no superando el halo de inhibición del ciprofloxacino.

Palabras claves: *Cymbopogon citratus*, eficacia, halo, sensible, resistente, aceite esencial, medicina tradicional, hierba luisa.

ABSTRACT

The main objective of this study was to assess whether the essential oil of *Cymbopogon citratus* "lemon grass" leaves have an antimicrobial effect against *Escherichia coli* strains compared to ciprofloxacin at doses of 30 μ g, in an *in vitro* study. In order to perform the study, the essential oil of *Cymbopogon citratus* was used in four dilutions (100%, 75%, 50%, 25%), and distilled water as a negative control. 12 repetitions were performed for each group studied. Inhibitory effect was found in the dilution at 100% (13.58mm, DS: 1.084 ± 0.313 ; IC 95%; 12.89-14.27), values considered as low-efficiency according to the CLSI (> 21 mm), however it does not exceed the zone of inhibition of ciprofloxacin (28.58 mm, DS: 1.676 ± 0.484 ; IC 95%; 27.52-29.65). At 75% the inhibitory effect was (10.50mm, DS: 0.674 ± 0.195 ; IC 95%; 10.07-10.93), at 50% (7.42mm, DS: 0.996 ± 0.288 ; IC 95%; 6.78-8.05mm) and at 25% no antibacterial effect was observed. The ANOVA analysis was highly significant (0.000) and the Tukey-test showed that the tested groups were homogeneous. It is concluded that the essential oil of *Cymbopogon citratus* leaves has some degree of inhibition, but not exceeding the zone of inhibition of ciprofloxacin.

Keywords: *Cymbopogon citratus*, efficacy, inhibition zone, susceptible, resistant, essential oil, traditional medicine, lemon grass.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA

La enfermedad diarreica hasta la actualidad sigue ocupando los primeros puestos de morbi-mortalidad en el grupo etáreo más predominante que son los niños. Con el paso del tiempo se ha ido implementando nuevos manejos y estrategias, a pesar de ello esta enfermedad sigue preocupando al ámbito de la salud pública por ser la tercera causa de muerte en infantes menores de cinco años. Según estadísticas se estimó que en el año 2011 hubo 7,6 millones de niños que fallecen por año, siendo el 10.41% que fueron por diarrea. ¹

La enfermedad diarreica se define como un proceso de inflamación en el aparato gastrointestinal de origen infeccioso o no infeccioso que se caracteriza por el aumento del número de deposiciones al día (>3) y de consistencia semilíquida o líquida con la presencia o no de moco o sangre. La clínica que acompaña es de dolor difuso en el abdomen, fiebre como sintomatología relevante, sin embargo, también puede presentar deshidratación que incluso puede llegar a comprometer hemodinámicamente al paciente. ²

Escherichia coli es una enterobacteria causante muy común de enfermedades gastrointestinales, si bien es cierto dentro de la diversidad de las cepas existen algunas que son inocuas, que resuelven de forma espontánea. Empero, hay cepas productoras de una toxina llamada Shiga que comprometen gravemente la salud, este es el caso del síndrome hemolítico urémico, en especial cuando se trata de un niño o un adulto mayor. Este mecanismo de patogenicidad es secundario a su consumo mediante los alimentos generalmente contaminados. ³

Desde tiempos pasados la curiosidad del ser humano por investigar lo ha llevado a la búsqueda de plantas con propiedades en la medicina y estos conocimientos se fueron transmitiendo de generación en generación, en la actualidad se valida la utilización del empleo de la medicina alternativa con la intervención de la botánica, ya que muchas especies vegetales han sido empleadas en el laboratorio para la búsqueda exhaustiva de su poder farmacológico como por ejemplo: efecto antipirético, analgésicas, antibióticas, antimicóticas. ⁴

De todas las especies estudiadas se encuentra la hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), que tiene la propiedad de antimicrobiana gracias al aceite esencial obtenidos de sus hojas, esta tiene un efecto potente específico sobre la estructura de la bacteria *Escherichia coli*, que altera sus componentes y por consiguiente ocasiona su muerte. ⁴

1.2. TRABAJOS PREVIOS

Azuero A. et al (Ecuador, 2016) analizaron el efecto antimicrobiano de doce plantas de uso ancestral en el Ecuador, dentro de ellas las hojas de la hierba luisa, sobre diferentes agentes microbianos como *Escherichia coli*; obtuvieron 10uL (40mg/ml) de aceite esencial de *Cymbopogon citratus*. Observaron que la actividad del aceite frente a *E. coli* arrojó un halo de inhibición de 6-8 mm.⁵

Valverde P. (Ecuador, 2015) Analizo el potencial antimicrobiano de las hojas de *Cymbopogon citratus* y otras sobre las cepas *E. coli*, *S.*, *P. aureginosa*, *Cándida albicans*. En cuanto a las cepas de *E. coli* les aplico aceite 40mg/dL. Como resultado obtuvo que el mayor diámetro de halos de inhibición se obtuvo con el aceite esencial de *C. citratus*, para *S. aureus* 37.5mm ± 2.11, *E. coli* fue de 14 mm ± 1.01, *P.*

aureginosa fue de 17.5mm \pm 1.34. Esto comprobó que el empleo de esta como bactericida es ideal. ⁶

Yáñez G. et al (Ecuador, 2014) con el propósito de investigar realizaron un estudio acerca del efecto antimicrobiano y fotoquímico de extractos de plantas medicinales frente a *Escherichia coli* y *Cándida albicans*. Dentro de las plantas ellos emplearon *Cymbopogon citratus* y observaron que el extracto etanólico de esta planta a una concentración de 5 000mg/l es capaz de inhibir las cepas de *E. coli* ya que presento un halo de inhibición de 12,5 mm \pm 0.932 representando al 100% de la dilución.⁷

Goytia, M (México, 2008) Realizo un estudio donde mostro la resistencia de 9 bacterias con *Cymbopogon citratus* y *Allium sativum* L. Dentro de las bacterias que utilizo en su trabajo estuvo *E. coli*. Como resultado observo que la inhibición microbiana de *C. citratus* frente a *E. coli* con un halo de inhibición de 11 .14 \pm 2. 79 mm.⁸

Del pozo J. (Ecuador, 2006) En su trabajo realizado sobre la aplicación de aceite esencial del *Cymbopogon citratus* para corroborar los efectos antibacterianos y antimicóticos. Demostró que, el aceite esencial inhibió el crecimiento bacteriano luego de 10 minutos desde su aplicación, obteniendo como resultado un halo de inhibición de 21 \pm 1.23mm. ⁹

Guerra, M. et al (cuba, 2004) Evaluaron la actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial y de la crema de *Cymbopogon citratus* (DC). Emplearon hongo y bacterias controles como *E. coli*. En los controles que observaron inhibición, en este caso *E. coli*, tomaron 5uL, en donde observaron mejor que hubo la capacidad del aceite de producir daño letal a la bacteria siendo catalogado después como concentración mínima inhibitoria (CMI). Los resultados que obtuvieron del aceite de

C. citratus fue un halo de inhibición de 15 ± 1.203 mm a una dilución del 100%. De la crema fue una CMI de 1.25 mg/mL, mientras que la CMB no arrojó resultados ya que es bacteriostático. Concluyendo que la actividad antibacteriana frente a *E. coli* es más efectiva con la utilización de aceite esencial.¹⁰

Quintana A. (Perú, 2014) En su tesis acerca del efecto del aceite esencial del *Cymbopogon citratus* en la sobrevivencia de *E. coli*, in vitro, observo que tras inocular aceite esencial a concentración de 25% a la bacteria aislada, se produjo la ampliación del halo de inhibición frente a *E. coli* fue de 10.94 mm +/- 1.93. Concluyendo al final que este aceite si tenía un efecto de inhibición frente a las cepas sobrevivientes de *E. coli*.¹¹

1.3. TEORÍA RELACIONADA AL TEMA

En la actualidad la Organización mundial de la Salud ha cedido un amplio campo a la fitoterapia, que es considerada como una herramienta del futuro con cimientos en el método científico, que este avalado por los sucesos que han sido acumulados con el paso del tiempo desde nuestros ancestros; y que en el presente sean corroborado científicamente para su aplicación idónea en el ámbito de la salud.¹²

La medicina naturista tiene como propósito incluir sus creencias y manejos para la corroboración de la seguridad y satisfacción de la misma. Un aspecto importante que se tendrá que añadir la opinión del paciente, como el punto clínico del médico tratante. Si se cumple correctamente estas premisas, la fitoterapia podrá ser la iniciativa para el desarrollo de la ciencia de la farmacología, llegando a ser el primer cimiento de una larga cadena con fines terapéuticos.^{12, 13}

También debemos tener en cuenta que, si la medicina natural sigue siendo considerada como un arte perenne, basada solo en las costumbres adquiridas por herencia, con el tiempo puedes llegar a perder su esencia y estancar su desarrollo, por consiguiente, el objetivo a alcanzar con la fitoterapia con propiedades medicinales es correlacionar los compuestos químicos y biológicos y fines terapéuticos.¹³

El nombre científico hierba luisa es *Cymbopogon citratus* considerada una planta cuya familia es el de las POACEAE que se caracteriza por su crecimiento casi amontonado en la base que alcanza una altura aproximadamente de 2 metros, posee sus hojas simples, con algunos bordes duros con un exquisito aroma muy distintivo similar al cítrico del limón, con una longitud de 100 centímetros por 1 de ancho que se distribuyen en grupos de tres. Sus ramas tienen un aspecto alargado y caído. Lo peculiar de esta especie es que rara vez florece. Su hábitat es una tierra arenosa, húmeda y tropical, ideal para su idóneo crecimiento.^{10,14}

Su metabolismo es de carácter secundario y da como resultado principal el aceite esencial, producto de desecho de esta, el cual debido a su componente orgánico da origen a su aroma característico de limón fuerte, por otro lado, tiene la propiedad de ser volátil y oleoso por la presencia de los monoterpenos. Dentro de su composición química encontramos aldehídos (furfural, citral, citronelal); cetonas (metilheptenona); alcoholes (nerol, citronelol, geraniol); titerpenos (Cymbopogona, Cymbopogonol); flavonoides (Luteolin, orientin); ácidos fenólicos (cafeico, ácido cumarínico).^{9, 10, 14}

De todos esto el predominante es el citral, que está presente en forma de dos isómeros citral A y citral B; es un aceite con la propiedad de ser un líquido fluido, en estado inactivo, color amarillo débil, su aroma intenso a limones y su poder antimicrobiano. Es susceptible a los

ácidos por consiguiente tiene a la formación de compuestos tipo cíclicos. Para obtener el grado de oxidación se expone al aire y lo consigue en un tiempo acelerado, de ahí la importancia de mantenerlo almacenado correctamente. Para la utilización de este aceite se puede realizar mediante vía oral o tópica. ^{8,9}

El citral proveniente de las partes verdes de esta especie debido a su elevada volatilidad y afinidad a los medios grasos pueden atravesarlas de modo fácil y realizar su efecto en la membrana celular provocando su inestabilidad por consiguiente muerte celular ya que inhibe de manera competitiva la respiración celular y la síntesis de membrana celular, por ello se considera un excelente bactericida y antimicótico. Además de ello también se ha reconocido de forma científica efectos que influyen en el aparato cardiovascular (hipotensor), en el aparato respiratorio (antiasma) espasmolítico, antisepsia, antirretroviral, antibacteriano (sobre Gram positivas, Gram negativos (*E. coli*)) y potentes acciones antiinflamatorias. También se postuló los posibles efectos como antipirético, antitusígeno, evita la diaforesis y favorece la eliminación de secreciones. ^{11,15}

La fase de destilación simple, para conseguir la obtención de aceite esencial de hierba luisa, se consigue con un bajo nivel de ebullición, se somete la mezcla a una corriente de arrastre de vapor para que luego los compuestos con propiedades solubles sean separados de inmediato. Su producto final tiene los efectos antibacterianos. ¹¹

Uno de los patógenos más frecuentes en enfermedades es *E. coli* que es una enterobacteria perteneciente a las bacterias Gram negativas con una sola cadena de ADN, en su estructura se diferencia fácilmente sus flagelos, fimbrias y pilis que le dan la capacidad de movilización.

Tiene la propiedad de ser aerobio facultativo es por ello por lo que adquiere determinadas resistencias.¹⁶

Su medio de residencia de predilección es el tracto intestinal exactamente en el intestino delgado y grueso; por ello es considerada como parte de la flora normal dentro de estas estructuras con las características de no causar noxas mientras se encuentren en este medio se almacena en la materia fecal del hombre. Cuando las cepas de esta bacteria ocasionan daño las patologías más comunes que desarrollan son la gastroenteritis, infecciones urinarias, septicemia e inflamación de las meninges.¹⁷

Por otro lado, contamos con una serie de antimicrobianos, producto de las empresas farmacéuticas, cuya composición es sintética que debido a los diversos procesos bioquímicos que sufre en su procesamiento puede llegar a tener alguna interacción sobre el organismo, sin contar que debido a la abundante presencia de microorganismos que día a día aumentan más y por otro lado la automedicación, han hecho que ciertos patógenos productores de patologías adquieran resistencias a los fármacos. Pese a ello dentro de los antibacterianos posemos con ciprofloxacino.¹⁸

Ciprofloxacino es una fluoroquinolona de 2G la cual actúa directamente en la producción del ADN ya que suprime la acción del superenrollamiento que depende de la energía ATP, para su funcionamiento, además catalizada por una enzima llamada girasa que tiene por función desarrollar diversas acciones para preservar la estructura innata del ADN. Otro punto importante es que este fármaco a elevadas concentraciones inhibe la enzima llamada topoisomerasa II e inclusive la IV de la bacteria *Escherichia coli*.¹⁹

1.4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA:

¿El aceite esencial de hojas de *Cymbopogon citratus* “hierba luisa” tiene eficacia antibacteriana sobre las cepas de *Escherichia coli* ATCC25 922 comparado con el uso de ciprofloxacino a dosis de 30 ug, estudio in vitro?

1.5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO:

El fin de este trabajo principalmente se basa en el aporte de información para mi persona en mi preparación académica dentro del rubro de la medicina, y además servirá de base científica para posteriores trabajos, con el propósito de introducir la importancia de las propiedades de esta planta medicinal como es la hierba luisa, *Cymbopogon citratus*.

Es importante conocer el efecto antimicrobiano que posee el aceite esencial proveniente de las hojas de la hierba luisa, *Cymbopogon citratus*, como una futura incorporación para que llegue a ser una medida terapéutica en el campo de la medicina.

También el objetivo es promover el uso de esta planta medicinal como una alternativa de antimicrobiano natural en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales producidas por *E. coli*; ya que esta sería una buena opción debido a que actualmente los patógenos adquieren elevada resistencia además de mostrar efectos adversos contra la salud del enfermo.

1.6. HIPÓTESIS:

H₁: El aceite esencial de hojas de *Cymbopogon citratus* “hierba luisa” tiene eficacia antibacteriana sobre las cepas de *Escherichia coli* ATCC25922 comparado con el uso de ciprofloxacino a dosis de 30 ug, estudio in vitro

H₂: No existe eficacia antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Cymbopogon citratus* “hierba luisa” sobre las cepas de *Escherichia coli* ATCC25922 comparado con el uso de ciprofloxacino a dosis de 30 ug, estudio in vitro

1.7. OBJETIVOS

1.7.1. OBJETIVO GENERAL:

Determinar si el aceite esencial de hojas de *Cymbopogon citratus* “hierba luisa” tiene eficacia antibacteriana sobre las cepas de *Escherichia coli* ATCC25922 comparado con el uso de ciprofloxacino a dosis de 30 ug, estudio in vitro.

1.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar la eficacia antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Cymbopogon citratus* a la dilución del 25%
- Identificar la eficacia antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Cymbopogon citratus* a la dilución del 50%
- Identificar la eficacia antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Cymbopogon citratus* a la dilución del 75%
- Identificar la eficacia antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Cymbopogon citratus* a la dilución del 100%
- Determinar efecto antimicrobiano del ciprofloxacino a dosis de 30 ug.

II. MÉTODO

2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y TIPO DE INVESTIGACIÓN:

TIPO DE INVESTIGACIÓN: Básico

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN: Experimental con repeticiones múltiples, post prueba.

RG1	X1	O1
RG2	X2	O2
RG3	X3	O3
RG4	X4	O4
RG5	X5	O5
RG6	X6	O6

Donde:

G1: Dilución del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* “hierba luisa” al 100%.

G2: Dilución del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* “hierba luisa” al 75%.

G3: Dilución del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* “hierba luisa” al 50%.

G4: Dilución del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* “hierba luisa” al 25%.

G5: Control positivo: ciprofloxacino.

G6: Control negativo: alcohol.

O: Las observaciones

2.2. VARIABLES Y OPERALIZACIÓN

Experimento:

Variable Independiente: Agente antibacteriano.

a) No farmacológico: Aceite esencial de *Cymbopogon citratus* “hierba luisa”.

b) Farmacológico: Ciprofloxacino

Variable Dependiente: Eficacia antibacteriana.

Operacionalización de variables:

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
V.I: Agente antibacteriano	<p>Para el tratamiento frente a cepas de E. coli se utilizó:</p> <p>Tratamiento no farmacológico con el aceite esencial de las hojas de <i>Cymbopogon citratus</i>²⁵</p> <p>Tratamiento farmacológico con ciprofloxacino.²⁶</p>	<p>El aceite esencial de las hojas de <i>Cymbopogon citratus</i> fue dividido en las siguientes diluciones:</p> <p>a) 100% b) 75% c) 50% d) 25% e) Ciprofloxacino f) Alcohol</p>	<p>RG1 RG2 RG3 RG4 RG5 RG6</p>	Cualitativa nominal
V. D: Eficacia antibacteriana	Es la disminución de la producción de bacterias. ²⁷	<p>Se consideró eficaz si:²²</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Sensible para un diámetro mayor a 21mm. ▪ Intermedio para un diámetro entre 16 y 20 mm. ▪ Bajo para un diámetro menor o igual a 15mm 	<p>Eficaz ≥21mm</p> <p>No eficaz ≤21mm</p>	Cualitativa nominal

2.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

POBLACIÓN: Estuvo constituido por cada grupo de colonias de *Escherichia coli* que crecieron en las placas Petri.

MUESTRA:

Tamaño de muestra: En el estudio, se aplicó la fórmula para diferencia de dos proporciones. Se obtuvo 11 repeticiones por cada grupo de experimentación.²² (Ver anexo 01)

Unidad de análisis: Cada conjunto de bacterias

Unidad de muestra: Estuvo conformado por cada placa petri.

Muestreo: Se analizó el crecimiento de todas las colonias.

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

Criterios de inclusión:

- Todos las placas petri viables.
- Replicaciones de cepas puras y que no tuvieron contacto con ningún tipo de reactivo o medicamento

Criterios de exclusión:

- Se excluyeron las cepas contaminadas de *Escherichia coli* que no crecieron en los medios de cultivo.
- Se excluyeron las placas Petri con medio de cultivo que presentó algún tipo de daño o rajadura en su estructura durante el proceso de incubación.
- Se excluyeron las placas Petri con el medio de cultivo cuyo resultado pudo ser dudoso.

2.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD

LA TÉCNICA: Consistió en la observación del crecimiento de las cepas en las placas petri.

PROCEDIMIENTO:

- a) La planta fue identificada taxonómicamente por el Herbario Antenor Orrego - HAO. (Anexo 02)
- b) Se obtuvo el aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, mediante el método de hidrodestilación. .⁷
- c) Se utilizó el medio de cultivo agar Muller-Hinton, para el cultivo de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, en la prueba de susceptibilidad, de acuerdo a las recomendaciones del CLSI a través del estándar M02-A12.²²
- d) Se evaluó la susceptibilidad antibacteriana siguiendo las normas y procedimientos establecidos en los estándares M02-A12²² y M100-S28²³ del CLSI.

INSTRUMENTO: Se empleó una tabla donde se tomó en cuenta las medidas en milímetros de los halos de inhibiciones según las diferentes concentraciones. (Ver anexo 06).

VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

El instrumento fue validado por 03 profesionales en el área de Salud, quienes fueron los encargados de evaluar las variables del estudio y determinaron si tienen la objetividad, coherencia, eficacia, alcance para su realización exitosa.

2.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS

La información transcrita en la ficha de recolección de datos fue procesada mediante el programa estadístico de SPSS 25 del sistema operativo Microsoft Windows XP, para la comparación entre los promedios de los halos de inhibición del crecimiento, obtenidos en cada concentración del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*. Se utilizó para el análisis multivariado (ANOVA) y post ANOVA de Tukey.

2.6. ASPECTOS ÉTICOS:

El siguiente estudio conto con la aprobación de la Facultad de Medicina de la Universidad Cesar Vallejo de Trujillo, en concordancia con las recomendaciones establecidas en las declaraciones de Helsinki, adoptada por la 18° Asamblea Medica Mundial en Helsinki, Finlandia, junio 1964 y modificada por la Asamblea Medica Mundial en Tokio, enero 2004. ²⁸

III. RESULTADOS

Tabla 1: Eficacia antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Cymbopogon citratus* “hierba luisa” sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 comparada con ciprofloxacino, estudio in vitro

DATOS DESCRIPTIVOS								
					95% del intervalo de confianza para la media			
	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	Límite inferior	Límite superior	Mínimo	Máximo
100%	12	13.58	1.084	0.313	12.89	14.27	12	15
75%	12	10.50	0.674	0.195	10.07	10.93	9	11
50%	12	7.42	0.996	0.288	6.78	8.05	6	9
25%	12	0.00	0.000	0.000	0.00	0.00	0	0
Ciprofloxacino	12	28.58	1.676	0.484	27.52	29.65	26	31
Total	60	12.02	9.564	1.235	9.55	14.49	0	31
Total	60	9.93	9.803	1.266	7.40	12.47	0	31

Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver. 25

Tabla 2: Eficacia antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Cymbopogon citratus* “hierba luisa” sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 comparada con ciprofloxacino, estudio in vitro

TABLA RESUMEN DE ANOVA

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	5337.233	4	1334.308	1228.234	0.000
Dentro de grupos	59.750	55	1.086		
Total	5396.983	59			

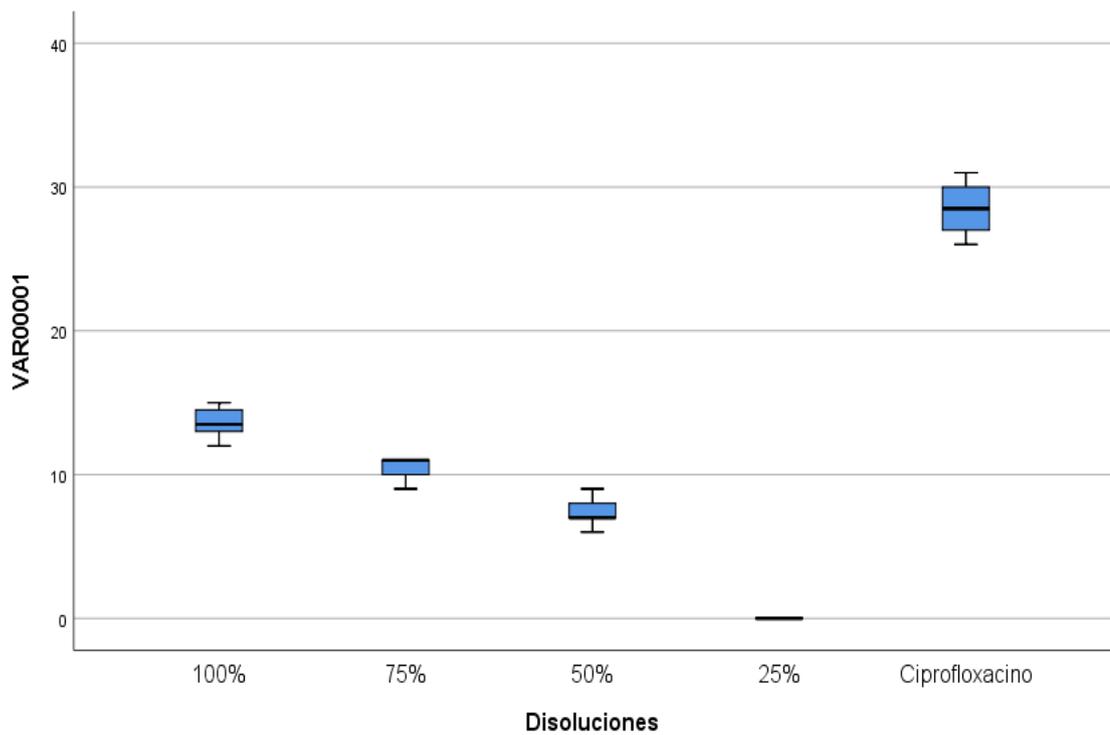
Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver. 25

Tabla 3: Eficacia antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Cymbopogon citratus* “hierba luisa” sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 comparada con ciprofloxacino, estudio invitro

ANÁLISIS DE HOMOGENICIDAD DE LOS DATOS: TUKEY

		HSD Tukey				
		Subconjunto para alfa = 0.05				
Disoluciones	N	1	2	3	4	5
25%	12	0.00				
50%	12		7.42			
75%	12			10.50		
100%	12				13.58	
Ciprofloxacino	12					28.58
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.						
a. Utiliza el tamaño de muestra de la media armónica = 12,000.						

Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver. 25



Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver. 25

GRAFICO 01: Eficacia antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Cymbopogon citratus* "hierba luisa" sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 comparada con ciprofloxacino, estudio in vitro

IV. DISCUSIÓN

El trabajo de investigación tuvo como fin comprobar la eficacia antibacteriana del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* a diferentes concentraciones frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC25922 comparado con la eficacia de ciprofloxacino a dosis de 30ug. Se realizaron 12 repeticiones por cada grupo de estudio, se consideraron diferentes concentraciones del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (100%, 75%, 50%, 25%) y el control negativo con suero fisiológico (DMSO).

Los resultados en la tabla N° 01 01 correspondiente a los datos descriptivos, muestran actividad antibacteriana a la concentración del aceite esencial al 100% con un promedio de halo de inhibición de 13.58mm (DS: ± 1.084 ; IC 95%; 12.89-14.27), siendo el halo mínimo de 12mm y el máximo 15mm, por lo tanto no fue eficaz sin embargo se encuentra en el rango bajo según los estándares (CSLI <15mm). A la dilución del 75% el promedio del halo de inhibición fue de 10.50mm (DS: ± 0.674 ; IC 95%; 10.07-10.93), halo mínimo de 09mm y el máximo 11mm. Conforme la dilución del aceite esencial de las hojas de hierba luisa iba disminuyendo, el halo de inhibición también mostraba esa conducta, por ello a la dilución del 50% se obtuvo como promedio un halo de 7.42mm (DS: ± 0.096 ; IC 95%; 6.78-8.05), siendo el halo mínimo de 08mm y el máximo 09mm.

Con la dilución al 25% el resultado fue nulo ya que no se observó halo de inhibición en las placas petri. Por otro lado con el grupo de control positivo con ciprofloxacino a dosis de 30ug se obtuvo como promedio un halo de inhibición de 28.58mm (DS: ± 1.676 ; IC 95%; 27.52-29.65), siendo el halo mínimo de 26mm y el máximo 31mm.

En la tabla N° 02 relacionada con el análisis estadístico de ANOVA se obtuvo como resultado 0.000, concluyendo así que el estudio fue altamente significativo. A su vez la tabla N°03 correspondiente a la prueba de Tukey nos muestra que los subgrupos experimentales fueron homogéneos y que el grupo que evidenció mayor eficacia inhibitoria fue con ciprofloxacino.

En el grafico N°01 nos muestra las diferentes medidas de los halos inhibición a las diversas concentraciones del aceite esencial de las hojas de *Cymbopogon citratus* y de ciprofloxacino, se observó que este último tiene mayor efecto antibacteriano comparado con el aceite esencial.

Los resultados de esta investigación son similares a los encontrados por Valverde P. ⁶ (Ecuador, 2015) quien obtuvo un halo de inhibición de $14 \pm 1.01\text{mm}$ con el uso de aceite esencial de hojas de *Cymbopogon citratus* frente a diversas bacterias, entre ellas *Escherichia coli*. Yáñez G. et al ⁷ (Ecuador, 2014) encontró efecto antibacteriano con el uso de extracto etanólico de las hojas de *Cymbopogon citratus* obteniendo un halo de inhibición de $12.5 \pm 0.932\text{mm}$ frente a *E. coli*.

Por otro lado los resultados encontrados por Azuero A. et al ⁵ (Ecuador, 2016) son diferentes a los resultados obtenidos en este estudio, ya que ellos utilizaron el aceite esencial de hojas de *Cymbopogon citratus* frente a *E. coli* y obtuvieron un halo de inhibición de 6 a 8mm, considerándose dentro de los valores resistentes según CSLI. A si mismo ocurre con los resultados del estudio que ejecuto Quintana A.¹¹ (Perú, 2014) que obtuvo un halo de inhibición de $10.94 \pm 1.93\text{mm}$ con el uso de aceite esencial de hojas de *Cymbopogon citratus* frente a cepas de *E. coli*

Finalmente se puede evidenciar que existen diferencias entre los resultados obtenidos en nuestra investigación comparados con los resultados de los antecedentes citados debido a que en algunos utilizaron otra preparación como es el extracto etanólico de hojas de hierba luisa. Además cabe resaltar que existen factores que influyen en los resultados, ya sea, el clima del hábitat donde se recolectó la planta, los componentes de suelo donde se desarrolló esta. Pese a ello esta investigación logró demostrar que es de gran utilidad ya que se puede utilizar el aceite esencial de hojas de *Cymbopogon citratus* como coadyuvante junto a un antibiótico para infecciones originadas por *E. coli*.

V. CONCLUSIONES

1. El aceite esencial de las hojas de *Cymbopogon citratus* muestra bajo efecto antibacteriano sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC25922, según CLSI (≥ 21 mm) y ciprofloxacino presentó mayor efecto antibacteriano.
2. A la dilución de 25% no se evidenció efecto antibacteriano frente cepas de *Escherichia coli* ATCC25922.
3. A concentraciones del 75% y 50% mostraron un halo de inhibición de 10.5mm y 7.42mm respectivamente, considerado por el CLSI, como resistente a la bacteria.
4. El aceite esencial de *Cymbopogon citratus* posee efecto a concentración del 100% con halo de inhibición de 13.58mm, considerado indiferente según el CLSI.
5. El ciprofloxacino a 30ug tuvo mayor efecto antibacteriano sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC25922 con un halo de inhibición 28.58mm.

VI. RECOMENDACIONES

1. Evaluar la eficacia antibacteriana de las hojas de *Cymbopogon citratus* frente a otras bacterias Gram positivas y negativas, así como también en diferentes extractos, acuoso, etanólico.
2. Se podría realizar bioensayos en animales para determinar si es citotóxico y a su vez hallar una concentración mínima inhibitoria ideal para su aplicación clínica.
3. Utilizar el aceite esencial de las hojas de *Cymbopogon citratus* como tratamiento coadyuvante a un antibiótico.
4. Se podría ampliar el estudio analizando los principios activos de la planta que puedan ser concentrados y evaluar su efecto antimicrobiano.
5. Realizar el estudio con la misma planta pero obtenida de otro terreno para comprobar si los componentes del suelo o altitud y clima de la zona son influyentes.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Riveros M, Ochoa T. Enteropatógenos de importancia en salud pública. Revista Perú medicina 2015; 32 (1): 157-164. (Citado 18/08/2017) Disponible en <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v32n1/a22v32n1.pdf>
2. Organización Mundial de la Salud. (Citado: 18/Agosto/2017). Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>
3. Gómez O. Enfermedad diarreica aguda por Escherichia coli patógenas. Rev Chilena Infectol. 2014; 31(5): 577–586. (Citado 18/08/2017) Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4469391/>
4. Obregón, L. Primer simposio Internacional de plantas medicinales y Fitoterapia. Lima: Instituto de Fitoterapia Americano, 2011
5. Azuero A, Jaramillo C, San Martin D, D'Armas H. Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. Revista Ciencia UNEMI 2016; 9 (20): 11-18. (Citado 19/08/2017) Disponible en <http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/342/295>
6. Valverde P. Composición química, potencial antimicrobiano y letal de los aceites esenciales de las hojas de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), mastrante (*Ageratum conyzoides*), guabiduca (*Piper carpunya*), ajenjo (*Artemisia absinthium*) y cedrón (*Lippia citriodora*), cultivados en la república del ecuador. [Tesis]. Ecuador. 2015
7. Yáñez G, Velasteguí R. Investigación de la actividad antimicrobiana y fitoquímica de extractos de plantas medicinales frente a los microorganismos patógenos Escherichia coli y Candida albicans. [Tesis]. Ecuador. 2014.
8. Goyta M. Estudio in vitro de la resistencia e inhibición de 9 especies de microorganismos con Cymbopogon citratus y Allium sativum L. [Tesis]. Guadalajara, México 2008.

9. Del pozo X. Aceite esencial a partir de las hojas de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf), para su aplicación como antibacteriano y antimicótico. [Tesis]. Ecuador. 2006.
10. Guerra M, Rodríguez M, García G, Llerena C. Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC). Rev cubana Plant Med 2004; 9(2): 2-6. (Citado 19/08/2017) Disponible en http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol9_2_04/pla05204.htm
11. Quintana A. Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y de *Citrus limón* en la sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* [Tesis]. Trujillo, Perú 2014.
12. Hernando B. El libro blanco de los herbolarios y las plantas medicinales. Madrid: 2007 (Citado: 18/Agosto/2017) Disponible en <http://www.fitoterapia.net/archivos/200701/260307libro-2.pdf?1>
13. Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. (Citado: 18/Agosto/2017) Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>
14. Tereschuk M, Quarenghi M, Gonzales M, Baigori M. Actividad antimicrobiana de flavonoides aislados de *Tagetes del Noa*. Farmacología y actividad biológica 2007; 6: 364-366. (Citado: 18/Agosto/2017) Disponible en <http://www.redalyc.org/pdf/856/85617472026.pdf>
15. Kumar S, Pandey A. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. The Scientific Word Journal 2013; 1-16. (Citado: 18/Agosto/2017) Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3891543/pdf/TSWJ2013-162750.pdf>
16. Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J, editores. Harrison principios de medicina interna. 18a ed. México: McGraw-Hill; 2012
17. Prats G. Microbiología y parasitología médica. 1ª ed. Madrid: Panamericana; 2013
18. Katzung B, Trevor A, Masters S. Farmacología básica y clínica. 11ª ed. México: McGraw-Hill; 2010.

19. P. Lorenzo, A. Moreno, A. Portoles, JC Leza. Velásquez Farmacología básica y clínica. 18ª ed. Madrid: Editorial médica panamericana, S.A; 2009
20. Borja F. Actividad antibacteriana y concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Cymbopogon citratus* frente al *Streptococcus mutans in vitro*. [Tesis]. Trujillo, Perú 2014.
21. MINSA. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. serie de norma técnica N° 30 [Internet] 2002 [18 de noviembre de 2014]. Disponible en:
http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/1/manua_l%20sensibilidad.pdf
22. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015. Disponible en: <http://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2015-M02-A12-original.pdf>
23. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. Disponible en: <http://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2018-M100-S28-unlocked.pdf>
24. Puerta A, Mateos F. Enterobacterias. Actualización Medicina 2010; 10(51): 3426-3431. (Citado: 10/Marzo/2017) Disponible en http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf
25. Cabello R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ª ed. Panamericana;
26. Prats G. Microbiología y parasitología médica. 1ª ed. Madrid: Panamericana; 2013
27. Tereschuk M, Quarenghi M, Gonzales M, Baigori M. Actividad antimicrobiana de flavonoides aislados de *Tagetes* del Noa. Farmacología y actividad biológica 2007; 6: 364-366. (Citado:

10/Mayo/2017) Disponible en <http://www.redalyc.org/pdf/856/85617472026.pdf>

28. Colegio Médico del Perú. Código de Ética y Deontología. Lima [Perú]: CMP; 2007. (Citado: 13/Junio/2017) Disponible en http://cmp.org.pe/wpcontent/uploads/2016/05/ley_creacion_cmp.pdf
29. José Luis Berdondes. Gran Enciclopedia de las Plantas Medicinales Océano. Barcelona: España; 2004. 691 p.
30. Aguilar M. Comparación del efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico con el aceite esencial de Hierba Luisa sobre una cepa de Candida Albicans. [Tesis]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2013.
31. De la Torre, L.; Alarcón, D. Kvist, L.P. Salazar, J. 2008. Usos medicinales de las plantas. Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Herbario QCA & Herbario AAU. Ecuador. Pp.: 105–114.
32. SUAREZ, T., VERA. V., Farmacología clínica. Uso y abuso de ciprofloxacino. Medisan 2011.15(3):384

VIII. ANEXOS

ANEXO 1 TAMAÑO DE MUESTRA

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 p_1q_1 + p_2q_2}{(p_1-p_2)^2}$$

Donde:

$$Z_{\alpha/2}: 1,96^{22}$$

$$Z_{\beta}: 0.84^{22}$$

$$X_1: 41$$

$$X_2: 0.9$$

$$n = \frac{(1.96 + 0.84)^2 (0.41 \times 0.59) + (0.009 \times 0.991)}{(0.41 - 0.009)^2}$$

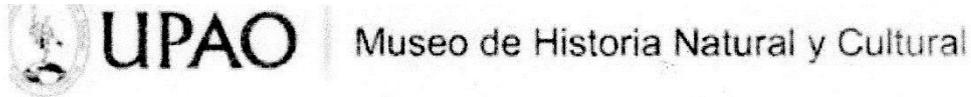
$$n = \frac{(7.84) (0.24) + 0.009}{0.16}$$

$$n = 11.82$$

$$\mathbf{n=12}$$

ANEXO 2

CERTIFICACIÓN PLANTA



HERBARIO ANTENOR ORREGO (HAO) CONSTANCIA N° 56-2018-HAO-UPAO

El que suscribe, Director del Museo de Historia Natural y Cultural de la Universidad Privada Antenor Orrego, deja:

CONSTANCIA

Que **Stephanie Elizabeth Fernández Robles**, estudiante de la carrera profesional de Medicina Humana de la Universidad César Vallejo, ha solicitado la determinación de material vegetal, el cual corresponde a la siguiente especie:

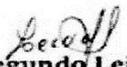
***Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Poaceae)**

El mismo que será utilizado para la tesis titulada: “Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* “hierba luisa” frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC25922 comparado con ciprofloxacino”.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que correspondan.

Trujillo, 9 de noviembre del 2018.




Mg. Segundo Leiva González
Director
Museo de Historia Natural y Cultural

ANEXO 03

EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE LA PLANTA

1. Tratamiento de la muestra

Las plantas frescas de *Cymbopogon citratus* “hierba luisa”, se obtuvieron en el mercado La Hermelinda de Trujillo, en una cantidad de 6 Kg aproximadamente y se llevaron al laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo de Trujillo, donde se seleccionaron las hojas con buenas condiciones; de este modo, se obtuvo la “muestra fresca” (MF). La MF se lavó con agua destilada clorada y se llevó a un horno a 40-45°C por 3-4 días donde se deshidrató. Después, se estrujaron manualmente las hojas secas hasta que se obtuvo partículas muy pequeñas y se reservó almacenándolas herméticamente en bolsas negras. A esto se le consideró como “muestra seca” (MS).

2. Obtención del Aceite Esencial

El aceite esencial de *Cymbopogon citratus* “hierba luisa” se obtuvo por el método de arrastre de vapor de agua; para ello, en un balón de 2 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 B2 estuvo conectado a un condensador recto (refrigerante), el cual desembocó en un embudo decantador tipo pera. De tal modo que, 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 (incluido los lípidos). 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 Aceite Esencial (AE) considerado al 100%; el cual se colocó en un frasco de vidrio ámbar y se reservó a 4°C hasta su utilización.



ANEXO N° 04

TÉCNICA DE CULTIVO

1. Preparación del medio de cultivo

Se utilizó agar Mueller-Hinton como medio de cultivo. Se preparó suficiente medio para 12 placas Petri. Este medio de cultivo 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.

2. Prueba de susceptibilidad (Prueba de Disco difusión en agar)

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 de América. Se tomó en cuenta los estándares M02-A12 y M100-S28.

a. Preparación del inóculo

El inóculo se preparó colocando 3-4 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo estéril, al cual se le adicionó una alícuota del microorganismo *Escherichia coli*, cultivado hace 18-20 horas, de tal modo que se observó una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/ml).

b. Siembra del microorganismo

Se sembró el microorganismo *Escherichia coli*, 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.



c. Preparación de las concentraciones del AE



A partir del AE, se prepararon 4 concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) utilizando como solvente Dimetil Sulfóxido (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%.

d. Preparación de los discos de sensibilidad con AE

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. Se tomó 10 μL de AE al 25% y se colocó en un disco, 10 μL de AE al 50% en otro disco, 10 μL de AE al 75% en otro disco y 10 μL de AE al 100% en otro disco. Esto se repitió por 12 veces.



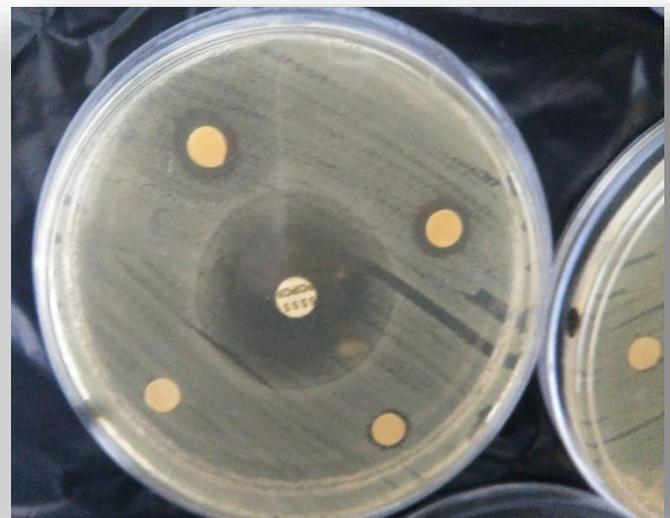
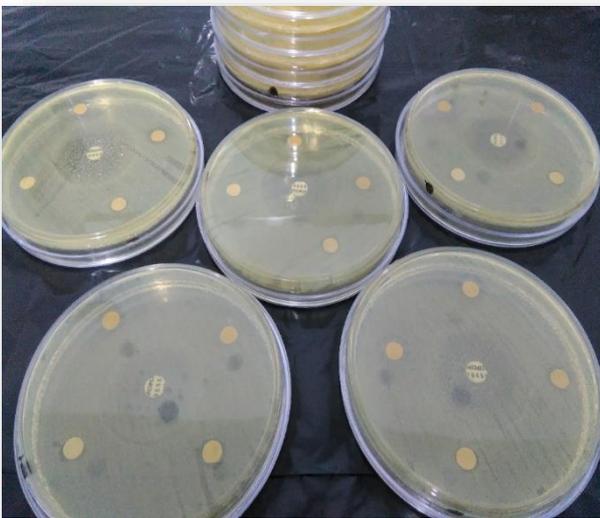
e. Confrontación del microorganismo con el agente antimicrobiano

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

Escherichia coli, de tal modo que quedaron los discos (uno de cada concentración) a un cm del borde de la Placa Petri y de forma equidistante. Adicionalmente, se colocó el disco con ciprofloxacino (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.

f. Lectura e interpretación

La lectura se realizó observando y midiendo con una regla Vernier, el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento microbiano. Esta medición se realizó para cada una de las concentraciones de AE de *Cymbopogon citratus* “hierba luisa” y para el ciprofloxacino. Se interpretó como sensible o resistente, según lo establecido en el Estándar M100-S28 del CLSI.



ANEXO 05

VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

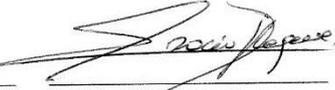
ÍTEM	CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA VALIDEZ				CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS ESPECÍFICOS							
	CONTENIDO <i>(Se refiere al grado en que el instrumento refleja el contenido de la variable que se pretende medir)</i>		CONSTRUCTO <i>(Hasta donde el instrumento mide realmente la variable, y con cuanta eficacia lo hace)</i>		RELEVANCIA <i>(El ítem es esencial o importante, es decir, debe ser incluido)</i>		COHERENCIA INTERNA <i>(El ítem tiene relación lógica con la dimensión o el indicador que está midiendo)</i>		CLARIDAD <i>(El ítem se comprende fácilmente, es decir, sus sintácticas y semánticas son adecuadas)</i>		SUFICIENCIA <i>(Los ítems que pertenecen a una misma dimensión bastan para obtener la dimensión de esta)</i>	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
1	X		X		X		X		X		X	
2	X		X		X		X		X		X	
3	X		X		X		X		X		X	

CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS GENERALES			SI	NO	OBSERVACIÓN
El instrumento contiene instrucciones claras y precisas para responder la ficha de cotejos			X		
Los ítems permiten el logro del objetivo de la investigación			X		
Los ítems están distribuidos en forma lógica y secuencial			X		
El número de ítems es suficiente para recoger la información. En caso de ser negativa la respuesta sugiera los ítems a añadir			X		
VALIDEZ					
APLICABLE	X	NO APLICABLE		APLICABLE TENIENDO EN CUENTA OBSERVACIÓN	

Instrumento validado por:


 Firma y sello
 Jaime A. Polo Granados
 MICROBIÓLOGO
 CSP 6301


 Firma y sello
 Dr. Steve T. Escamilla
 MICROBIOLOGO CLINICO
 Especialista en Asesoría Clínica y Diagnóstica
 GEP: 2298 RNBE:0032
 RED ASISTENCIAL LA LIBERTAD


 Firma y sello

ANEXO 6

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Nº	ZONA DE INHIBICIÓN (mm)				Ciprofloxacino	suero fisiológico
	Aceite esencial de Hierba Luisa					
	100%	75%	50%	25%		
Placa Petri N°01	14	11	8	0	31	0
Placa Petri N°02	13	10	6	0	27	0
Placa Petri N°03	13	11	8	0	27	0
Placa Petri N°04	13	10	7	0	29	0
Placa Petri N°05	12	10	6	0	26	0
Placa Petri N°06	15	11	7	0	27	0
Placa Petri N°07	12	9	7	0	28	0
Placa Petri N°08	15	11	7	0	30	0
Placa Petri N°09	14	11	9	0	31	0
Placa Petri N°10	13	11	7	0	29	0
Placa Petri N°11	14	10	8	0	28	0
Placa Petri N°12	15	11	9	0	30	0

ANEXOS 7

NORMAS DE BIOSEGURIDAD

1. Ingreso restringido al laboratorio.
2. Se empleara siempre guardapolvo de laboratorio y permanecerá en la zona de trabajo. Además recogerse el cabello y cubrirlo
3. En la zona del trabajo está prohibido comer, beber, fumar, y aplicarse cosméticos.
4. Se Utilizara una apropiada protección como el uso de protectores oculares y guantes para los procedimientos que puedan entrar en contacto directo con los ojos y manos como aerosoles, gotas o líquidos corporales. Utilizar siempre guantes estériles y mascarillas.
5. El personal se lavara las manos después de sacarse los guantes y previamente al salir del laboratorio.
6. Las lesiones que pueden haberse generado como; rasguños, cortaduras en los brazos y manos deben protegerse bien.
7. El personal debe usar calzados protectores que tapen por completo los pies.
8. El proceso de las muestras se debe realizar encima de una superficie de trabajo forrada con papel filtro y/o absorbente plastificado.
9. No debe mezclarse el material infeccioso aspirando y soplando alternativamente a través de una pipeta.
10. Los reactivos deben estar etiquetados y almacenados en viales adecuados con tapa rosca.
11. Las superficies de trabajo en el laboratorio serán descontaminadas antes y después de haber derramado material potencialmente peligroso también al terminar cada etapa de trabajo.
12. El personal debe identificar el material infeccioso y deberá ser esterilizado lo antes posible.
13. El laboratorio se mantendrá ordenado, limpio y libre de materiales no relacionados con el trabajo.

- 14.El laboratorio debe tener un equipo de primeros auxilios implementado.
- 15.Se Informara de inmediato cualquier accidente de trabajo al jefe de laboratorio.
- 16.Todos los residuos del laboratorio deben descontaminarse adecuadamente, antes de ser eliminados en una solución desinfectante, incinerarse o ser sometidos a la autoclave a 121°C durante 20 minutos.
- 17.Se limpiara todos los días el suelo usando un trapeador enjabonado y enjuagado además de una solución desinfectante

ANEXO N°08

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO DE TESIS



CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO

El Laboratorio "San José" deja constancia que ha prestado sus instalaciones, en donde la Srta. FERNÁNDEZ ROBLES STEPHANIE ELIZABETH, estudiante de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, ejecutó la parte experimental de su proyecto de tesis titulado "Eficacia antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Cymbopogon citratus* "hierba luisa" sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 comparada con ciprofloxacino, estudio invitro", durante los días 30 de julio al 3 de agosto de 2018, bajo la orientación y asesoramiento del Microbiólogo Jaime Abelardo Polo Gamboa.

Se expide la presente a solicitud de la estudiante, sólo para fines académicos, a los 5 días del mes de agosto de 2018.


José Luis Calla Quevedo
880,000 - MICROBIÓLOGO
C.B.P. 6301

ANEXO N° 09
BASE DE DATOS

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente:						
HSD Tukey						
(I) Disoluciones		Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
100%	75%	3,083*	0.426	0.000	1.88	4.28
	50%	6,167*	0.426	0.000	4.97	7.37
	25%	13,583*	0.426	0.000	12.38	14.78
	Ciprofloxacino	-15,000*	0.426	0.000	-16.20	-13.80
75%	100%	-3,083*	0.426	0.000	-4.28	-1.88
	50%	3,083*	0.426	0.000	1.88	4.28
	25%	10,500*	0.426	0.000	9.30	11.70
	Ciprofloxacino	-18,083*	0.426	0.000	-19.28	-16.88
50%	100%	-6,167*	0.426	0.000	-7.37	-4.97
	75%	-3,083*	0.426	0.000	-4.28	-1.88
	25%	7,417*	0.426	0.000	6.22	8.62
	Ciprofloxacino	-21,167*	0.426	0.000	-22.37	-19.97
25%	100%	-13,583*	0.426	0.000	-14.78	-12.38
	75%	-10,500*	0.426	0.000	-11.70	-9.30
	50%	-7,417*	0.426	0.000	-8.62	-6.22
	Ciprofloxacino	-28,583*	0.426	0.000	-29.78	-27.38
Ciprofloxacino	100%	15,000*	0.426	0.000	13.80	16.20
	75%	18,083*	0.426	0.000	16.88	19.28
	50%	21,167*	0.426	0.000	19.97	22.37
	25%	28,583*	0.426	0.000	27.38	29.78

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