



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA

Sinergia antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Aloysia citriodora*
con meropenem sobre *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705
resistente a carbapenem

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

Médico Cirujano

AUTOR:

Velasquez Paredes, Juan Carlos. (ORCID: 0000-0002-1930-7630)

ASESORES:

Dra. Llaque Sánchez, María Rocío del Pilar. (ORCID: 0000-0002-6764-4068)

Dra. Yupari Azabache, Irma Luz. (ORCID: 0000-0002-0030-0172)

Mg. Polo Gamboa, Jaime Abelardo. (ORCID: 0000-0002-3768-8051)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Enfermedades Transmisibles

Trujillo - Perú

2020

DEDICATORIA

La presente tesis está dedicada:

A mis padres Edil y Elena, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy.

A mi compañera de vida Grabiela por el amor, comprensión y por el apoyo moral ilimitado que me brinda a lo largo de esta etapa de mi vida.

A mi querido hijo Juan, por ser mi gran motivación.

A todas las personas que me han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por cada célula viva en mí y por permitirme terminar mi tan anhelada carrera.

A mi alma mater por haberme permitido formarme en sus aulas, compartiendo ilusiones y anhelos. Con constancia, dedicación y esfuerzo alcanzar mi sueño.

A mis asesores de Tesis, en especial a la Dra. Llaque Sánchez, María quien se ha tomado el arduo trabajo de transmitirme sus diversos conocimientos del campo que corresponden a mi profesión. Pero además de eso, ha sido quien ha sabido encaminarme por el camino correcto lleno de sabios conocimientos para lograr mis metas. ¡Gracias!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
CARÁTULA.....	I
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTO.....	III
ÍNDICE DE CONTENIDOS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT.....	VII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
III. METODOLOGÍA.....	9
3.1 TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN:.....	9
3.2 VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN.	9
3.3 POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO	10
3.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS:.....	11
3.5 PROCEDIMIENTO: (ANEXO 06).....	11
3.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS:.....	11
3.7 ASPECTOS ÉTICOS:	12
IV. RESULTADOS.....	13
V. DISCUSIÓN.....	15
VI. CONCLUSIONES	17
VII. RECOMENDACIONES	17
REFERENCIAS.....	18
ANEXOS	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos descriptivos de las medias de los halos de inhibición del crecimiento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem, tratados con aceite esencial de <i>Aloysia citriodora</i> y meropenem, en laboratorio.	13
Tabla 2. Estudio de varianza de las medias de los halos de inhibición del crecimiento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem, tratados con aceite esencial de <i>Aloysia citriodora</i> y meropenem, en laboratorio.	13
Tabla 3. Comparación de las medias de los halos inhibición con la prueba de Tukey entre el aceite esencial de <i>Aloysia citriodora</i> , el Meropenem y la combinación de ambos, sobre <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem.	14

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de cajas de los halos de inhibición por grupos de estudio.	14
---	-----------

RESUMEN

En este estudio se evaluó la sinergia antibacteriana del aceite esencial de *Aloysia citriodora* al 100% con meropenem a 10 µg/ml sobre *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem *in vitro*. Se distribuyó en 04 grupos de estudio (G1: meropenem más el aceite esencial de *Aloysia citriodora*, G2: aceite esencial de *Aloysia citriodora*, G3: meropenem y G4: dimetilsulfóxido) mediante el método de disco difusión de Kirby-Bauer, aplicándose 10 repeticiones por cada grupo. Se observó que el meropenem alcanzó una zona inhibitoria (media: 23.4mm con DS: ±1.265, IC 95%: 22.50 a 24.30) siendo sensible (CLSI ≥23mm). Sin embargo, la asociación del aceite esencial de *Aloysia citriodora* con meropenem mostró una zona de inhibición mayor que el fármaco (media: 26.3mm, DS: ±0.949, IC 95%: 25.62 a 26.98). El análisis ANOVA indicó que existen diferencias significativas entre los promedios de los halos de inhibición en los grupos estudiados ($p= 0.000$). El post Anova de Tukey demostró que el mejor grupo que tuvo efecto antibacteriano fue la asociación del aceite esencial *Aloysia citriodora* más el meropenem. Se concluyó que la asociación de ambos productos presenta mayor efecto antibacteriano.

Palabras clave: Sinergia antibacteriana, *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenem, *Aloysia citriodora*, Meropenem.

ABSTRACT

This study evaluated the antibacterial synergy of the essential oil of *Aloysia citriodora* 100% with meropenem at 10 µg/ml on an *in vitro* carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705. It was distributed in 04 study groups (G1: meropenem plus the essential oil of *Aloysia citriodora*, G2: the essential oil of *Aloysia citriodora*, G3: meropenem, and G4: dimethyl sulfoxide) by means of the Kirby-Bauer disk diffusion method, applying 10 repetitions for each group. It was observed that meropenem reached an inhibition zone (mean: 23.4mm, SD: ±1.265, 95% CI: 22.50 to 24.30) being sensitive (CLSI ≥23mm). However, the association of the essential oil of *Aloysia citriodora* with meropenem showed a greater inhibition zone than the drug (mean: 26.3mm, SD: ±0.949, 95% CI: 25.62 to 26.98). The ANOVA analysis indicated that there are significant differences between the averages of the inhibition zones in the groups studied (p= 0.000). Tukey post ANOVA-test showed that the best group with an antibacterial effect was the combination of the essential oil *Aloysia citriodora* plus meropenem. It was concluded that the combination of both products shows a greater antibacterial effect.

Keywords: Antibacterial synergy, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Aloysia citriodora*, Meropenem.

I. INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana farmacológica, data desde hace muchas décadas, sin embargo, a nivel mundial en Carolina del Norte en el año 1996, se reportó por primera vez a *Klebsiella pneumoniae carbapenemasa* (KPC), en un aislado de *Klebsiella pneumoniae* (Kp), que subsiguientemente se extendió a Asia, Europa, Medio Oriente, América del Sur y Central, Oceanía y África.^{1, 2}

En el año 2011, en Colombia se informó el primer reporte de un brote de cepas ya clasificadas KPC-3 y hasta la actualidad es un problema endémico en este país. También se ha reportado la presencia de KPC en Uruguay, Brasil, Chile, Argentina y Ecuador. En marzo del 2012 se publicó en Italia el primer hallazgo de una cepa de KPC, aislada desde un paciente. Actualmente, a nivel mundial las carbapenemasas generan resistencia terapéutica gracias a sus diferentes grados de bombas de expulsión y expresión de porinas asociados con producción de betalactamasas con espectro extendido, así como la producción de la enzima carbapenemasa.^{1, 3}

En el año 2013 en Perú, el Hospital Nacional Arzobispo Loayza publicó el primer reporte de KPC. En el 2017 se describieron nueve casos de KPC resistente con presencia de una nueva enzima llamada Nueva Delhi Metalo beta-lactamasas; como agentes infecciosos o colonizantes, en pacientes gravemente enfermos, en su mayoría en el área de neurocirugía del Hospital Nacional Dos de Mayo. Siendo estos los primeros reportes de Kp resistente en el Perú.^{4, 5}

Varios microorganismos son resistentes a diversos tipos de antibióticos, debido al gran porcentaje de uso irracional. Es por ello que despierta gran interés el descubrir sustancias alternativas y/o complementarias a partir de orígenes naturales, incluyendo los extractos metanólicos de las plantas. El uso de los extractos metanólicos ha desarrollado un gran espectro de aplicaciones en los últimos años. Sin embargo, las plantas nativas al ser poco estudiadas son desconocidas. El *Aloysia citriodora* es encontrado en el Perú, por lo que es relevante conocer la envergadura de los usos que pueda tener su aceite esencial (AE).⁶

Aloysia triphylla Palau también llamado *Aloysia citriodora*, popular con el nombre vulgar de "Cedrón", es una planta oriunda de América del Sur. Es una planta leñosa, arbustiva, que alcanza 1 m. o más de altura, las hojas son simples con un característico olor a limón. Pertenece al reino, subreino, clase, subclase, orden, familia, género y especie, *Plantae*, *Tracheobionta*, *Magnoliopsida*, *Asteridae*, *Lamiales*, *Verbenaceae*, *Aloysia*, *Aloysia triphylla* respectivamente.⁷

Los beneficios que aporta el cedrón es su acción antibacteriana del AE de las partes de las hojas, flores y tallo. Todos los AE *Aloysia citriodora*, revelaron acción bactericida elevada contra *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus*, excepto el AE de las flores que presentó actividad antimicrobiana moderada contra cepas de *Staphylococcus aureus*.⁸

Problema: ¿Tiene efecto sinérgico antibacteriano, la asociación del aceite esencial *Aloysia citriodora* al 100% con meropenem a 10 µg/ml sobre *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem, en estudio *in vitro*?

Se justificó realizar la investigación, porque contribuye al conocimiento de nuevos agentes naturales para un manejo terapéutico alternativo o coadyuvante frente a bacterias resistentes a los antibióticos. Además, debido a la casi inexistente información, sobre el aceite esencial de *Aloysia citriodora* "cedrón" como agente antibacteriano contra *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos, es útil actualizar estudios al respecto; que serán de gran utilidad y aplicabilidad debido a la fácil accesibilidad y no toxicidad que tiene el cedrón, y el costo está al alcance de toda la población. Además, se puede utilizar el aceite esencial de *A. citriodora* sin que pueda ocasionar daño ni efectos adversos secundarios.

Los resultados de esta investigación han aportado valiosa información y conocimientos para que sean considerados en futuras investigaciones complementarias, en la búsqueda de nuevas alternativas naturales para el tratamiento contra bacterias resistentes.

Objetivo general: Evaluar la sinergia antibacteriana del aceite esencial de *Aloysia citriodora* al 100% con meropenem a 10 µg/ml sobre *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem, en estudio *in vitro*.

Objetivos específicos: Establecer la actividad antimicrobiana del aceite esencial *Aloysia citriodora* al 100%. Identificar la actividad antimicrobiana combinada del aceite esencial *Aloysia citriodora* con meropenem. Determinar la actividad antimicrobiana del meropenem a 10 µg/ml.

Hipótesis: H1: La asociación del aceite esencial *Aloysia citriodora* con meropenem a 10 µg/ml tiene efecto antibacteriano sobre *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem *in vitro*. H0: La asociación del aceite esencial *Aloysia citriodora* con meropenem a 10 µg/ml no tiene efecto antibacteriano sobre *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem *in vitro*.

II. MARCO TEÓRICO

Estudios en diferentes países muestran la eficacia que tiene *Aloysia citriodora* sobre las *Enterobacteriaceae*; por ejemplo, **Ebani, et al.**⁹ (India, 2018), realizaron un estudio cuya finalidad fue investigar su contenido químico y su acción antimicrobiana in vitro de dieciséis aceites esenciales, entre ellos *Aloysia triphylla* y cinco mezclas contra cepas de *E. coli* y *A. fumigatus*. Utilizaron el procedimiento de disco difusión en agar. Observaron al AE de *A. triphylla* que no fue efectivo contra *E. coli*, pero mostró la mejor actividad antimicótica (con 0,855 mg/ml). Este estudio muestra resultados prometedores para utilizar AE en el medio ambiente con fines de desinfección.

Asimismo, **Küçük, et al.**¹⁰ (Turquía 2017), evaluaron los extractos de acetona, alcohol y hexano de *Aloysia triphylla*, para determinar la actividad antibacteriana a través del método de disco difusión. Estos extractos se probaron en bacterias grampositivas y gramnegativas, entre ellas Kp, así como en 7 hongos. Los extractos de *Aloysia triphylla* inhibieron el crecimiento de microorganismos utilizados en estas pruebas en diferentes proporciones y extractos (alcohol, acetona y hexano) con un halo de inhibición con extractos de: alcohol de 10 mm, acetona de 15 mm y hexano de 7 mm. Se concluyó que el extracto de acetona de esta planta, evidenció actividad antimicrobiana contra las bacterias; pero sin actividad antifúngica contra los hongos utilizados en este estudio.

Oukerrou, et al.¹¹ (Marruecos, 2017), investigaron los efectos citotóxicos y antibacterianos in vitro del AE de *Aloysia citriodora*, cosechados en diferentes zonas de Marruecos. Se cultivaron cepas de varios microorganismos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) en medios Müller Hinton. Luego, se comprobó la acción antibacteriana por disco difusión en agar, la concentración bactericida mínima (CBM) y la concentración inhibitoria mínima (CIM) usando el método de microdilución. El AE reveló una actividad antimicrobiana significativa frente a cepas Gram positivas y Gram negativas (8 a 10 mm). Las CIM oscilaron entre 2,84 y 8,37 mg/ml.

Azuero, et al.¹² (Ecuador, 2016), comprobaron la acción antibacteriana de los extractos metanólicos de *Lippia citriodora* (cedrón) y 11 especies vegetales más. Usaron la técnica de difusión en agar, probaron cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. albicans*. Todos los extractos analizados, a excepción de *L. citriodora* y *A. conyzoides*, presentaron una acción bactericida contra todas las cepas bacterianas ensayadas. Sin embargo, *L. citriodora* mostró un efecto antibacteriano mediano contra *E. coli* y *P. aeruginosa* (8 a 10 mm) y un efecto antibacteriano bajo contra *S. aureus* (<6 mm).

Crestani, et al.¹³ (Brasil, 2012) establecieron la acción antimicrobiana y la composición química del AE de *Aloysia triphylla*. El AE se obtuvo por hidrodestilación y se estudió por espectrometría de masas y cromatografía de gases. Se evaluó la acción antimicrobiana por el procedimiento de difusión de disco contra 13 bacterias grampositivas y gramnegativas, entre ellas Kp. El AE mostró actividad antimicrobiana contra todas las bacterias probadas. Observaron que contra Kp formó zonas de inhibición de $21 \pm 0,01$ mm de diámetro. Concluyeron que existe efecto positivo al aumentar la dosis de AE en relación con el tamaño del halo y una mayor actividad sobre bacterias Gram-positivas frente a Gram-negativas.

Por su parte **Zare, et al.**¹⁴ (Irán, 2011) estudiaron las actividades antimicrobianas del extracto metanólico de las hojas y flores de *Lippia citriodora* H.B.K. (verbenaceae), haciendo uso del método de difusión en disco. Los extractos metanólicos de esta planta mostraron un impacto antimicrobiano en 8 bacterias, incluida Kp y 2 hongos. Observaron que, al aumentar la concentración del extracto, aumentó la actividad antimicrobiana en todos los microorganismos. Los hongos fueron más sensibles que las bacterias y de éstas más, las grampositivas. El extracto de hojas de *L. citriodora* a partir del 25% tuvo efecto sobre Kp ($22,00 \pm 1,52$ mm, al 50% ($30,00 \pm 2,08$ mm)).

Además, **Calderón.**¹⁵ (Colombia, 2011), estudió la actividad antibacteriana del *Aloysia triphylla*, frente a *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Cándida albicans*, Kp, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, empleando el procedimiento de difusión con pozos en agar. Obtuvo de la planta extractos de diclorometano, n-

hexano y metanol. Observó que el extracto de *Aloysia triphylla* no presentó actividad antimicrobiana significativa a concentraciones de 250 - 4000 mg/L sobre los microorganismos estudiados.

Rudas.¹⁶ (Perú, 2017) estudió la composición química del AE de *Aloysia citriodora palau* de la región de Huarochirí, Lima y realizó un fraccionamiento biodirigido con el fin de conocer la acción in vitro del AE y sus fracciones contra *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. El AE mostró actividad antibacteriana in vitro. La fracción con mejor actividad antibacteriana fue la AE2, la cual presentó un MIC de 1.6% contra las bacterias *E. coli* y *S. typhimurium*. El compuesto mayoritario en la fracción AE2 fue el citral siendo el responsable de la actividad antibacteriana.

Las especies de *Klebsiella* causan una amplia gama de enfermedades que incluyen neumonía, infección del tracto urinario y sepsis. Estas infecciones son particularmente un problema entre los neonatos, ancianos e inmunocomprometidos. *Klebsiella* se halla en todas partes de la naturaleza, incluido el agua, suelo y animales; pueden colonizar dispositivos médicos y el entorno sanitario. Se consideran patógenos oportunistas que colonizan las superficies mucosas del tracto gastrointestinal sin causar patología; sin embargo, desde las mucosas, *Klebsiella* puede diseminarse a otros tejidos causando infecciones potencialmente mortales^{17, 18}

Klebsiella pneumoniae, miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo en forma de bastón, gram negativo, fermentador de lactosa, con una cápsula prominente. Es un típico patógeno oportunista que se encuentra ampliamente en la boca, la piel y los intestinos. Afecta a población con sistemas inmunes comprometidos o que están debilitados por otras infecciones. Sus biopelículas formadas in vivo protegen al patógeno de los ataques de las respuestas inmunitarias y antibióticos del huésped y los aislamientos nosocomiales de Kp a menudo muestran fenotipos de resistencia a múltiples fármacos que comúnmente son causados por las β -lactamasas de espectro extendido.¹⁹

El amplio resistoma de este patógeno, abarca abundantes genes resistentes a antibióticos (GRA) regulados por cromosomas y plásmidos. Bajo presión selectiva de antibióticos, *K. pneumoniae* acumula continuamente GRA, mediante mutaciones de novo y mediante la adquisición de plásmidos y elementos genéticos transferibles, lo que conduce a cepas extremadamente resistentes a los medicamentos (XDR) que albergan un “super resistoma”.²⁰

En la década de 1990 surgió una nueva familia ESBL, el grupo cefotaximasa-M (CTX-M), que actualmente son las BLEE dominantes en Kp. Estas enzimas confieren resistencia a las penicilinas y al espectro expandido de cefalosporinas, pero son ineficaces contra carbapenémicos. Entre los patógenos resistentes a múltiples fármacos, Kp es una de las superbacterias más peligrosas del mundo; y tiende a volverse resistente a prácticamente todos los antibióticos disponibles en la actualidad.^{21, 22}

Se informan sobre las cepas de KPC cada vez más en todo el mundo. Las bacterias que producen estas enzimas generalmente son susceptibles solo a unos pocos antibióticos y están asociadas con una alta mortalidad, especialmente en pacientes con infecciones del torrente sanguíneo. Además de ser resistentes a todas las β lactamasas disponibles, las carbapenemasas de KPC tienen una alta capacidad de propagación. Aunque se ha informado una alarmante dispersión de Kp resistente a carbapenem, no se ha descrito el impacto clínico de este patógeno.^{23, 24}

Gran parte de cepas productoras de carbapenemasas (gramnegativas) corresponden a Kp y *Escherichia coli*, siendo las enzimas de carbapenemasas más frecuentes identificadas el del tipo KPC, IMP, NDM-1, VIM, OXA-181 y OXA-48 (de oxacilinasas). Las variantes más comunes son KPC-2 y KPC-3 responsables de brotes epidémicos, la enzima KPC-2 predomina en el mundo, con brotes informados en Estados Unidos, China y Europa, mientras que la enzima KPC-3 fue detectado principalmente Estados Unidos, América Latina y Israel.^{25, 26, 27}

Recientemente, se ha propuesto la asociación de dos carbapenémicos sinérgicos (ertapenem, meropenem, doripenem o imipenem), solos o combinados con otros

antibióticos, como tratamiento de rescate para las infecciones por Kp resistente a carbapenem. Dicha terapia combinada fue evidenciada ya que ertapenem mostró menor actividad in vitro contra este patógeno, debido a una mayor afinidad por las carbapenemasas. Su papel, como antibiótico, permitiría que los carbapenémicos más activos expresen su actividad más fuerte en el sitio de la infección. Sin embargo, aunque los datos son alentadores, se limitan a estudios in vitro, informes de casos y series cortas de casos.^{28, 29}

Existe una necesidad urgente de asistencia médica para tratar estas bacterias resistentes. El uso empírico de antibióticos es uno de los factores que favorecen el incremento de la resistencia a los medicamentos. Hoy en día, los investigadores están buscando algunas moléculas antimicrobianas novedosas que tengan un espectro amplio de acción frente a bacterias Gram positivas y negativas sin tener muchos o ningún efecto secundario. Están explorando una gran diversidad de plantas con propiedades medicinales. Las acciones antimicrobianas de las plantas se atribuyen a la presencia de compuestos activos, por ejemplo, quinonas, fenoles, alcaloides, flavonoides, terpenoides, aceites esenciales, taninos, lignanos, glucosinolatos y algunos metabolitos secundarios.^{30, 31}

Las plantas aromáticas y medicinales han adquirido especial atención en el campo de la investigación intensiva sobre los compuestos antimicrobianos naturales. Constituyen una fuente constante de principios activos contra gérmenes patógenos. Entre estos productos, los aceites esenciales producidos por plantas aromáticas como metabolitos secundarios, han ganado un interés neto por muchos investigadores.^{32, 33}

Se han desarrollado muchas listas en la composición del aceite esencial de cedrón (*Aloysia citriodora*) que difieren de cada una debido a los diferentes entornos geográficos, climáticos y al tiempo de cosecha. Los ingredientes principales en estas listas son citral (neral y geranial), limoneno y 1,8 cineol. También se estudiaron las propiedades antioxidantes y antibacterianas, especialmente cuando se aplican a los siguientes patógenos: *Escherichia coli*, Kp, *Mycobacterium*

tuberculosis, Staphylococcus aureus, Helicobacter pylori, Pseudomonas aeruginosa y *Candida albicans*.^{34, 35}

Las hojas de *Aloysia citriodora* son ricas en aceites esenciales. Estos aceites se utilizan en la medicina tradicional como manejo terapéutico de algunos trastornos gastrointestinales, como agentes antimicrobianos, antimicóticos y como antioxidantes. También se informó que es una excelente fuente de sustancias farmacéuticamente activas utilizadas como carminativo, antiespasmódico y sedante, así como para las náuseas y los mareos.³⁶

En el análisis del AE de *Aloysia citriodora*, se han identificado en total más de cuarenta compuestos. Entre los principales componentes del aceite esencial se encuentran citronelal (27,30%), geranial (17,72%), neral (15,91%) y limoneno (12,41%), seguidos de óxido de cariofileno (9,30%) y α -curcumeno (7,90%), así como 1, 8-cineol (5,49%), trans-Caryophyllene (5,39%), trans-cariofileno (6,20%), entre otros.^{37, 38}

III. METODOLOGÍA

3.1 TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN:

TIPO DE ESTUDIO: Básico.³⁹

Diseño de Investigación: Experimental, con repeticiones múltiples, post pruebas. Se trabajó con cuatro grupos de estudio. Al primer grupo se aplicó meropenem a 10 μ g/ml más el aceite esencial de *Aloysia citriodora*, en el segundo grupo se usó el aceite esencial de *Aloysia citriodora*, el tercer grupo se usó para el control positivo a meropenem a 10 μ g/ml y el último para el control negativo se utilizó el dimetilsulfóxido, aplicándose 10 repeticiones por cada grupo de estudio. Finalmente se evaluó el efecto antibacteriano mediante el diámetro del halo de inhibición, que indica su efectividad frente a este microorganismo.³⁹ (ANEXO 01)

3.2 VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN.

VARIABLE INDEPENDIENTE: Agente antibacteriano.

No farmacológico: Aceite esencial de *Aloysia citriodora*.

Farmacológico: Meropenem a 10 µg/ml.

VARIABLE DEPENDIENTE: Efecto antibacteriano, según M100 del CLSI.⁴⁰

Si efecto: zona de inhibición ≥ 23 .

No efecto: zona de inhibición < 23 .

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES (ANEXO 02)

3.3 POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO

POBLACIÓN: La población estuvo constituida por los cultivos de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistentes a carbapenem.

Criterios de inclusión: Cultivos jóvenes de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem.

Criterios de exclusión: Cultivos que tuvieron signos de contaminación, o que no evidencian crecimiento bacteriano.

MUESTRA:

Tamaño de la muestra, estimada por la fórmula estadística para comparación de dos medias.⁴¹ (ANEXO 03)

Muestreo: Se realizó un muestreo probabilístico, aleatorio simple.⁴²

Unidad de análisis: Lo conformó cada colonia de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem.

Unidad de muestra: Cada placa Petri con colonias de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem.

3.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS:

TÉCNICA: Observación directa de la inhibición del crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem.³⁹

INSTRUMENTO: Se aplicó como instrumento una ficha de recolección de datos elaborada por el autor. (ANEXO 04)

VALIDEZ Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

El instrumento fue revisado por especialistas ³⁹ del área de la salud (un médico general, médico reumatólogo y microbiólogo), que garantizaron que la ficha de campo es adecuada para el registro de los datos acorde con los objetivos de estudio. (ANEXO 05)

3.5 PROCEDIMIENTO: (ANEXO 06)

- a. Identificación taxonómica de *Aloysia citriodora* por parte del Herbario de la Universidad Nacional de Trujillo.
- b. El aceite esencial de *Aloysia citriodora* se obtuvo mediante el método por arrastre con vapor de agua.⁴³
- c. La cepa de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas se sembró mediante la técnica por agotamiento en superficie, en agar Mueller-Hinton.⁴⁰
- d. El efecto sinérgico antibacteriano se evaluó mediante el método de difusión con pozos en agar.⁴⁵

3.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS:

La obtención de resultados de los diferentes halos de inhibición fue registrado en la ficha de campo, luego transcritas a la hoja de cálculo del Software Microsoft Excel 2019, para su posterior análisis en el programa SPSS versión 26. Se realizaron pruebas de normalidad de los datos, pruebas paramétricas, análisis de varianza ANOVA, para evaluar la diferencia de los

promedios de diámetros de los halos de inhibición. Asumiendo medias diferenciadas, se efectuó la prueba post hoc Tukey y Duncan para identificar el mejor tratamiento, finalmente con el gráfico del diagrama de cajas, se determinó el comportamiento de los datos obtenidos.⁴²

3.7 ASPECTOS ÉTICOS:

Durante todo el progreso del proyecto de investigación, se consideró los aspectos éticos referidos al tratamiento de residuos peligrosos, resguardo de la indemnidad de las personas y del medio ambiente, de acuerdo a lo estipulado según la OMS en el “Manual de Bioseguridad en el Laboratorio”⁴⁶ y la conservación de la diversidad biológica y la utilización sostenible de sus competentes según la Ley N°26839 “Ley sobre la conservación y aprovechamiento sostenible de la diversidad biológica”⁴⁷ (ANEXO 08)

IV. RESULTADOS

Tabla 01. Datos descriptivos de las medias de los halos de inhibición del crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem, tratados con aceite esencial de *Aloysia citriodora* y meropenem, en laboratorio.

Agente antibacteriano	N	Media	Desv. Desviación	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
AEAC	10	14.80	1.476	13.74	15.86	12	17
AEAC+MRP	10	26.30	0.949	25.62	26.98	25	28
MRP	10	23.40	1.265	22.50	24.30	21	25

Fuente: Salida De SPSS 26.0

AEAC: Aceite esencial de *Aloysia citriodora*.

MRP: Meropenem.

Tabla 02. Estudio de varianza de las medias de los halos de inhibición del crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem, tratados con aceite esencial de *Aloysia citriodora* y meropenem, en laboratorio.

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	715.400	2	357.700	229.404	0.000
Dentro de grupos	42.100	27	1.559		
Total	757.500	29			

Fuente: Salida De SPSS 26.0

Tabla 03. Comparación de las medias de los halos inhibición con la prueba de Tukey entre el aceite esencial de *Aloysia citriodora*, el meropenem y la combinación de ambos, sobre *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem.

HSD Tukey _a				
Agente antibacteriano	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
AEAC	10	14.80		
MRP	10		23.40	
AEAC+MRP	10			26.30
Sig.		1.000	1.000	1.000

Fuente: Reporte SPSS 26.0

AEAC: Aceite esencial de *Aloysia citriodora*.

MRP: Meropenem.

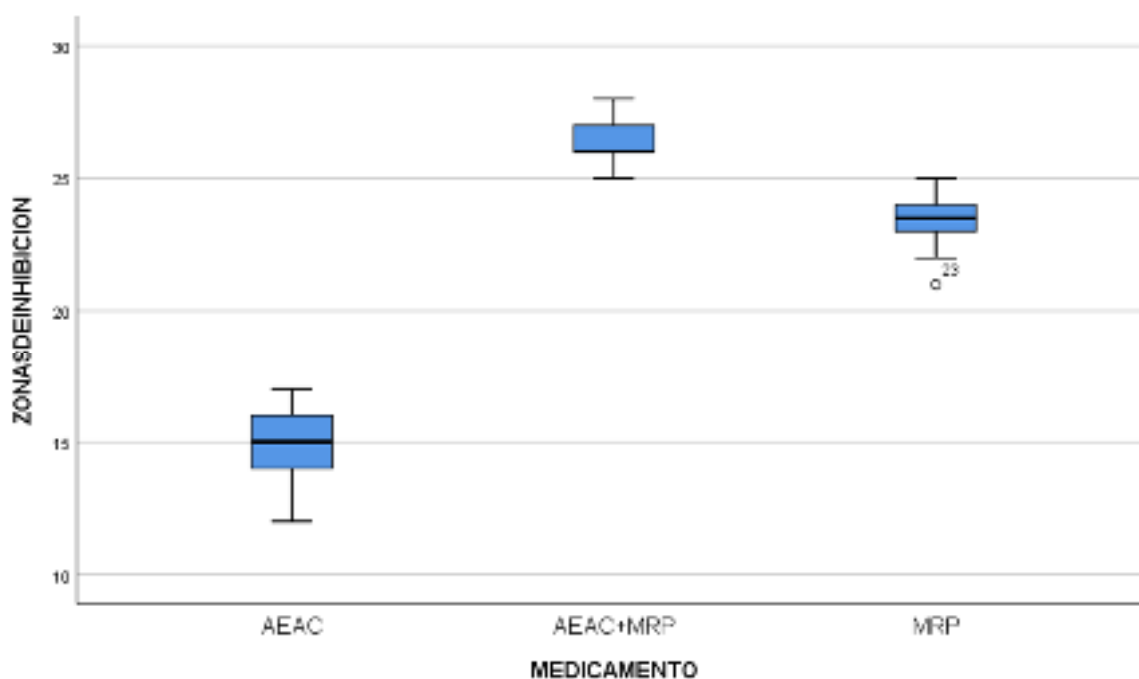


Figura 01. Diagrama de cajas de los halos de inhibición por grupos de estudio.

V. DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la sinergia antibacteriana del aceite esencial de *Aloysia citriodora* al 100% más meropenem a 10 µg/ml, sobre *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem, observando los siguientes resultados.

En la tabla 01, se observa que los tres tipos de sustancias utilizadas, presentaron actividad antibacteriana. El meropenem alcanzó una zona de inhibición (23.4mm, DS: ±1.265, IC 95%: 22.50 a 24.30) siendo sensible (CLSI ≥ 23 mm). Sin embargo, la combinación del aceite esencial de *Aloysia citriodora* con meropenem mostró mayor actividad antibacteriana que el fármaco (26.3 mm, DS: ±0.949, IC 95%: 25.62 a 26.98).

La Tabla 02, analiza la varianza de las medias (anexo 07), en la que se observa diferencias significativas entre los promedios de halos de inhibición en los grupos estudiados ($p= 0.000$). En la tabla 03 (Post ANOVA) y figura 01 se confirman la diferencia de los promedios de los halos de inhibición, y se observa que el grupo que presentó mayor inhibición fue la combinación entre el aceite esencial de *Aloysia citriodora* más meropenem.

En la revisión bibliográfica realizada, no se reportan estudios que traten sobre la sinergia entre *Aloysia citriodora* con meropenem u otro antibiótico, solo evaluaron el efecto de la planta en diferentes extractos, sin considerar la “*Klebsiella* resistente”; así tenemos Zare, et al.¹⁴ que reporta zonas de inhibición mayores (extracto de hojas de *L. citriodora* a partir del 25% tuvo efecto sobre Kp 22,00±1,52 mm, al 50% 30,00±2,08 mm), al igual que Crestani, et al.¹³ (21±0,01 mm). Menores zonas de inhibición demuestran, Küçük, et al.¹⁰ (alcohol de 10 mm, acetona de 15 mm y hexano de 7 mm).

Otros investigadores experimentaron con otros microorganismos como Ebani, et al.⁹ (India, 2018), actividad antimicótica (con 0,855 mg/ml), Oukerrou, et al.¹¹ (actividad antimicrobiana Gram positivas y Gram negativas de 8 a 10 mm), Azuero,

et al.¹² (*E. coli* y *P. aeruginosa* de 8 a 10 mm y *S. aureus* <6 mm), Rudas.¹⁶ (MIC de 1.6% contra *E. coli* y *S. typhimurium*).

La razón de este resultado se remite a las bases moleculares de los mecanismos de acción de ambos componentes antibacterianos, en el caso del meropenem inhibe la formación de la pared bacteriana al unirse a proteínas ligandos específicos de las penicilinas tipo 1, 2 y 3, interfiriendo con las proteínas de soporte de la pared bacteriana. Activándose las autolisinas y en consecuencia provocar la permeabilidad de la membrana celular⁴⁴ y en el caso del aceite esencial *Aloysia citriodora*, la fracción AE2 del citral tiene actividad anti bacteriana inhibiendo el anillo de biofilm, al inhibir la producción de EPS que es un componente de la matriz de la biopelícula, además inhibe la transcripción de genes responsables en la producción de la proteasa extracelular,⁴⁸

El efecto antibacteriano se debe a sus compuestos fitoquímicos; el aceite esencial de cedrón (*Aloysia citriodora*) en sus componentes tiene citral (neral y geranial), limoneno y 1,8 cineol, que le confieren las propiedades insecticidas, antioxidantes y antibacterianas^{34, 35} El compuesto mayoritario en la fracción AE2 fue el citral siendo el responsable de la actividad antibacteriana.¹⁶ En el análisis del AE de *Aloysia citriodora*, se han identificado más de cuarenta compuestos: citronellal (27,30%), geranial (17,72%), neral (15,91%) y limoneno (12,41%), seguidos de óxido de cariofileno (9,30%) y α -curcumeno (7,90%), así como 1, 8-cineol (5,49%), trans-Caryophyllene (5.39%), trans-cariofileno (6,20%) limoneno (6,07%), entre otros.^{37, 38} Concentración que difieren en relación a los diferentes entornos geográficos, climáticos y al tiempo de cosecha del vegetal.^{34, 35}

VI. CONCLUSIONES

- La asociación del aceite esencial de *Aloysia citriodora* con meropenem evidenció mayor actividad antibacteriana sobre *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem que el fármaco o el aceite esencial tratados individualmente.
- El tratamiento con aceite esencial *Aloysia citriodora* al 100% evidenció menor inhibición del crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem.
- El meropenem tuvo actividad antibacteriana dentro del rango considerado en el CLSI como sensible.

VII. RECOMENDACIONES

- La sinergia del aceite esencial de *Aloysia citriodora* con meropenem, debería ser considerada como una opción de medicina alternativa complementaria, debido a que potencia la sensibilidad frente a esta bacteria resistente.
- Se recomienda completar este estudio, evaluando la actividad individual de cada uno de los constituyentes fitoquímicos presentes en el aceite esencial de *Aloysia citriodora* con la finalidad de profundizar el mecanismo de acción que ejerce, puesto que existen escasas investigaciones.
- Investigar sobre la sensibilidad del aceite esencial *Aloysia citriodora* frente a otros microorganismos resistentes, realizando la comparación con el medicamento Gold estándar.
- Realizar investigaciones en animales de experimentación de la sinergia del aceite esencial *Aloysia citriodora* aunado a meropenem.

REFERENCIAS

1. Vera-Leiva A, Barría-Loaiza C, Carrasco-Anabalón S, Lima C, Aguayo-Reyes A, Domínguez M, et al. KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. Revista chilena de infectología [serie en Internet]. 2017 Oct [citado 25 de Julio del 2019]; 34(5): 476-484. Disponible en:
https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182017000500476
2. Khan MMA, Faiz A. Frequency of Carbapenemase Producing *Klebsiella pneumoniae* in Makkah, Saudi Arabia. JMID [serie en Internet]. 2016 Sept [citado 25 de Julio del 2019]; 6(3): 121-7. Disponible en:
<https://dergipark.org.tr/download/article-file/325645>
3. Mendes AC, Novais Â, Campos J, Rodrigues C, Santos C, Antunes P, et al. mcr-1 in Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* with Hospitalized Patients, Portugal, 2016-2017. Emerg Infect Dis [serie en Internet]. 2018 Abr [citado 25 de Julio del 2019]; 24(4): 762-6. Citado en PubMed; PMID 29553327. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5875258/pdf/17-1787.pdf>
4. Resurrección C, Montenegro JJ, Chiappe A, Vargas R, Cucho C, Mamani DH, et al. *Klebsiella pneumoniae* nueva Delhi metalo-betalactamasa en el Hospital Nacional Dos de Mayo. Lima, Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública [serie en Internet]. 2017 Abr [citado 25 de Julio del 2019];34(2): 261-7. Disponible en:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342017000200015
5. Quispe JF, Ingaruca JO, Castro AM, Casto ML, Ccoicca FJ, Montalvo R, et al. *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas en Perú: reporte de caso y discusión de la resistencia a los antimicrobianos. Medwave [serie en Internet]. 2018 Mar-Abr [citado 25 de Julio del 2019]; 18(2): e7191. Disponible en:
<https://www.medwave.cl/medios/medwave/Marzo-abril2018/PDF/medwave-2018-02-7191.pdf>

6. Bandoni AL, Retta D, Di Leo PM, Van CM. ¿Son realmente útiles los aceites esenciales?. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas [serie en Internet]. 2009 Sept [citado 25 de Julio del 2019]; 8(5): 317-322. Disponible en:
<https://www.redalyc.org/pdf/856/85611977001.pdf>
7. Severin C, Bruzzese D, Di Sapio O, Giubileo Mg, Gattuso S. REGENERACIÓN in vitro DE PLANTAS DE *Aloysia citriodora* Palau (verbenaceae). Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias [serie en Internet]. 2005 Nov [citado 29 de Julio del 2019]; 109(8): 3-18. Disponible en:
<http://www.herbogeminis.com/IMG/pdf/alloysia-citriodora.pdf>
8. Vélez E, D' Armas H, Jaramillo C, Echavarría AP, Isitua CC. Fitoquímica De *Lippia Citriodora* K cultivada en Ecuador y su actividad biológica. Revista Ciencia UNEMI [serie en Internet]. 2019 Enero-Abril [citado 25 de Julio del 2019]; 12(29): 9-19. Disponible en:
https://r.search.yahoo.com/_ylt=AwrE18pi33RfYR8AWR_D8Qt.;_ylu=Y29sbwNiZjEEcG9zAzEEdnRpZAMEc2VjA3Ny/RV=2/RE=1601523682/RO=10/RU=https%3a%2f%2fdialnet.unirioja.es%2fdescarga%2farticulo%2f6896072.pdf/RK=2/RS=P1VVUIRkSMkl5f4NygwmHZgyDs8-
9. Ebani VV, Najjar B, Bertelloni F, Pistelli L, Mancianti F, Nardoni S. Chemical Composition and In Vitro Antimicrobial Efficacy of Sixteen Essential Oils against *Escherichia coli* and *Aspergillus fumigatus* Isolated from Poultry. Veterinary Sciences [serie en Internet]. 2018 Jun [citado 25 de Julio del 2019]; 5(3): 62. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6164321/pdf/vetsci-05-00062.pdf>
10. Küçük Ç, Cevheri C. Preliminary Study on the Antifungal and Antimicrobial Activities of Some Medicinal Plants of Turkey. Journal of Biotechnology Research [serie en Internet], 2017 [citado 26 de Julio del 2019]; 3(11): 110-3. Disponible en:
[https://www.arpqweb.com/pdf-files/jbr3\(11\)110-113.pdf](https://www.arpqweb.com/pdf-files/jbr3(11)110-113.pdf)
11. Oukerrou MA, Tilaoui M, Mouse HA, Leouifoudi I, Jaafari A, Ziyad A. Chemical Composition and Cytotoxic and Antibacterial Activities of the

- Essential Oil of *Aloysia citriodora* Palau Grown in Morocco. *Advances in Pharmacological Sciences* [serie en Internet]. 2017 Jun [citado 26 de Julio del 2019]; 2017(4): 1-10. Disponible en:
<http://downloads.hindawi.com/journals/aps/2017/7801924.pdf>
12. Azuero A, Jaramillo C, San Martín D, D'Armas H. Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. *Revista Ciencia UNEMI* [serie en Internet]. 2016 sep [citado 26 de Julio del 2019]; 9(20): 11-8. Disponible en:
<http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/342/295>
13. Crestani L, Manica V, Chiaradia V, Puton BMS, Paroul N, Cansian RL. Caracterização química e atividade antibacteriana do óleo ontento de erva-lúisa (*Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britton). *PERSPECTIVA*, Erechim [serie en Internet]. 2012 sep [citado 27 de Julio del 2019]; 36(135): 53-63. Disponible en: http://www.uricer.edu.br/site/pdfs/perspectiva/135_289.pdf
14. Zare Z, Majd A, Sattari TN, Iranbakhsh A, Mehrabian S. The comparative study of antimicrobial activity of leaves and flowers methanolic extracts of *Lippia citriodora* H.B.K (Verbenacea). *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci* [serie en Internet]. 2011 [citado 27 de Julio del 2019]; 10(5): 901-5. Disponible en: [https://www.idosi.org/aejaes/jaes10\(5\)/26.pdf](https://www.idosi.org/aejaes/jaes10(5)/26.pdf)
15. Calderón JA. Caracterización fitoquímica, actividad antibacteriana y antioxidante de extractos de plantas medicinales utilizadas en Pereira y Santa Rosa de Cabal (Risaralda) [Tesis de Grado]. Pereira, Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira; 2011. Disponible en: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/2265/54764C146.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
16. Rudas DD. Composición química, fraccionamiento y actividad in vitro del aceite esencial de *Aloysia citriodora* Palau ("Cedrón") sobre las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* [Tesis de Título]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2017. Disponible en: http://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/3869/Composicion_RudasGonzales_Donny.pdf?sequence=2&isAllowed=y
17. Bengoechea JA, Sa PJ. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiol Rev* [serie en Internet]. 2019

- [citado 27 de Julio del 2019]; 43(2): 123-144. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6435446/pdf/fuy043.pdf>
18. Vading M, Naucle P, Kalin M, Giske CG. Invasive infection caused by *Klebsiella pneumoniae* is a disease affecting patients with high comorbidity and associated with high long-term mortality. PloS ONE [serie en Internet]. 2018 [citado 27 de Julio del 2019]; 13(4): e0195258. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5889183/pdf/pone.0195258.pdf>
 19. Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. Future Microbiol [serie en Internet]. 2014 [citado 28 de Julio del 2019]; 9(9): 1071–1081. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/267731558_Molecular_pathogenesis_of_Klebsiella_pneumoniae
 20. Navon S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev [serie en Internet]. 2017 May [citado 28 de Julio del 2019]; 41(3): 252-275. Disponible en: <https://academic.oup.com/femsre/article/41/3/252/3830265>
 21. Piperaki ET, Syrogiannopoulos GA, Tzouvelekis LS, Daikos GL. *Klebsiella pneumoniae*: Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance. Pediatr Infect Dis J [serie en Internet]. 2017 Oct [citado 28 de Julio del 2019]; 36(10): 1002-1005. Disponible en: https://journals.lww.com/pidj/Documents/Oct%202017%20ESPID%20Klebsiella_pneumoniae_Virulence,_Biofilm.pdf
 22. Woldu MA. *Klebsiella pneumoniae* and Its Growing Concern in Healthcare Settings. Clin Exp Pharmacol [serie en Internet]. 2016 [citado 28 de Julio del 2019]; 6(1): 199. Disponible en: <https://www.longdom.org/open-access/klebsiella-pneumoniae-and-its-growing-concern-in-healthcare-settings-2161-1459-1000199.pdf>
 23. Falco AD, Velásquez MA, Takiff H. Molecular characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients in a Public Hospital in Caracas, Venezuela. Enferm Infecc Microbiol Clin [serie en Internet]. 2017 [citado 28 de Julio del 2019]; 35(7): 411–416. Disponible en:

- <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X17300629>
24. Wang Z, Qin RR, Huang L, Sun LY. Risk Factors for Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection and Mortality of *Klebsiella pneumoniae* Infection. Chin Med J (Engl) [serie en Internet]. 2018 Jan [citado 28 de Julio del 2019]; 131(1): 56–62. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5754959/pdf/CMJ-131-56.pdf>
 25. Vera A, Barría C, Carrasco S, Lima C, Aguayo A, Domínguez M, Bello H, González G. KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. Rev Chilena Infectol [serie en Internet]. 2017 [citado 28 de Julio del 2019]; 34(5): 476-484. Disponible en:
<https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v34n5/0716-1018-rci-34-05-0476.pdf>
 26. Campos AC, Albiero J, Ecker AB, Kuroda CM, Meirelles LE, Polato A et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase–producing *K pneumoniae*: A systematic review. Am J Infect Control [serie en Internet]. 2016 Nov [citado 2 de Septiembre del 2019]; 44(11): 1374-1380. Disponible en: [https://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553\(16\)00280-7/pdf](https://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553(16)00280-7/pdf)
 27. Pitout JD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. Antimicrob Agents Chemother [serie en Internet]. 2015 Oct [citado 2 de Septiembre del 2019]; 59(10): 5873-84. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4576115/pdf/zac5873.pdf>
 28. De Pascale G, Martucci G, Montini L, Panarello G, Lucio S, Di Carlo D et al. Double carbapenem as a rescue strategy for the ontento of severe carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a two-center, matched case-control study. Crit Care [serie en Internet]. 2017 Jul [citado 2 de Septiembre del 2019]; 21(1): 173. Disponible en:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5498909/pdf/13054_2017_Article_1769.pdf
 29. Bassetti M, Giacobbe DR, Giamarellou H, Viscoli C, Daikos GL, Dimopoulos G et al. Management of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections.

- Clin Microbiol Infect [serie en Internet]. 2018 Feb [citado 2 de Septiembre del 2019]; 24(2): 133-144. Disponible en:
[https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(17\)30499-8/pdf](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(17)30499-8/pdf)
30. Chandra H, Bishnoi P, Yadav A, Patni B, Mishra AP, Nautiyal AR. Antimicrobial Resistance and the Alternative Resources with Special Emphasis on Plant-Based Antimicrobials-A Review. Plants (Basel) [serie en Internet]. 2017 Apr [citado 2 de Septiembre del 2019]; 6(2) pii: E16. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5489788/pdf/plants-06-00016.pdf>
31. Jadhav AV, Agnihori SN, Sawant H, Bansode S, Bankar A, Panicker SG. Antimicrobial Efficacy of Traditional Medicinal Plant Extracts Against the Antibiotic Resistant Isolates from Drinking Water Sources. IJPCR [serie en Internet]. 2018 [citado 2 de Septiembre del 2019]; 10(10): 243-248. Disponible en:
<http://impactfactor.org/PDF/IJPCR/10/IJPCR,Vol10,Issue10,Article2.pdf>
32. Bensabah F, Sbayou H, Amghar S, Lamiri A, Naja J. Chemical Composition And Antibacterial Activity of Essential Oils of Two Aromatic Plants: *Mentha Spicata* and *Lippia Citriodora* Irrigated by Urban Wastewater. IJERT [serie en Internet]. 2013 [citado 5 de Septiembre del 2019]; 2(12): 1560-1569. Disponible en:
<https://www.ijert.org/research/chemical-composition-and-antibacterial-activity-of-essential-oils-of-two-aromatic-plants-mentha-spicata-and-lippia-citriodora-irrigated-by-urban-wastewater-IJERTV2IS120611.pdf>
33. Joshi RK. Role of Natural Products against Microorganisms. American Journal of Clinical Microbiology and Antimicrobials [serie en Internet]. 2018 [citado 5 de Septiembre del 2019]; 1(1): e1005. Disponible en:
http://www.remedypublications.com/american-journal-of-clinical-microbiology-and-antimicrobials/articles/pdfs_folder/ajcm-v1-id1005.pdf
34. Di Leo P. Caracterización fitoquímica del cedrón (*Aloysia citriodora* Paláu, Verbenáceas) en Argentina para su normalización [Tesis Doctoral]. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires; 2016. Disponible en:

- http://repositorioubi.sisbi.uba.ar/gsd/collect/posgrauba/index/assoc/HWA_1383.dir/1383.PDF
35. Naser MG, Mansoor R, ALJoubbeh M. Fluctuations of chemical composition of essential oil and Antimicrobial of Lemon verbena (*Lippia Citriodora*) during growth stages in Syria. Int. J. ChemTech Res. [serie en Internet]. 2015 [citado 5 de Septiembre del 2019]; 8(6): 704-710. Disponible en: [http://sphinxesai.com/2015/ch_vol8_no6/3/\(704-710\)V8N6CT.pdf](http://sphinxesai.com/2015/ch_vol8_no6/3/(704-710)V8N6CT.pdf)
36. Hashemi SM, Khaneghah AM, Koubaa M, Barba FJ, Abedi E, Niakousari M, et al. Extraction of essential oil from *Aloysia citriodora* Palau leaves using continuous and pulsed ultrasound: Kinetics, antioxidant activity and antimicrobial properties. Process Biochemistry [serie en Internet]. 2018 [citado 5 de Septiembre del 2019]; 6(5): 197-204. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/320622056_Extraction_of_essential_oil_of_Aloysia_citriodora_Palau_leaves_using_continuous_and_pulsed_ultrasound_Kinetics_antioxidant_activity_and_antimicrobial_properties
37. Moein M, Zarshenas MM, Etemadfard H. Essential oil composition and total flavonoid content of *Aloysia citriodora* Palau under different cultivation systems. IJPAES [serie en Internet]. 2014 Jan-Mar [citado 5 de Septiembre del 2019]; 4(1): 353-358. Disponible en: http://www.ijpaes.com/admin/php/uploads/465_pdf.pdf
38. García JT. Extracción de aceite esencial por fluidos supercríticos y arrastre con vapor de cedrón (*Aloysia triphylla*) en la Región Arequipa [Tesis de Título]. Arequipa, Perú: Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa; 2017. Disponible en: https://pdfs.semanticscholar.org/9109/19182702c1867c82335e431d16f2c0d28fad.pdf?_ga=2.262890764.1287857598.1566591456-1737204764.1565787284
39. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. 5ª ed. México: McGraw-Hill; 2010. (citado:10/10/2019). Disponible en: https://www.esup.edu.pe/descargas/dep_investigacion/Metodologia%20de%20la%20investigacion%20n%20ta%20Edici%C3%B3n.pdf

40. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. (citado:10/10/2019). Disponible en:
https://clsi.org/media/1930/m100ed28_sample.pdf
41. García JA, Reding A, López JC. Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. Rev. Investigación en Educación Médica [serie en Internet]. 2015 May 04 [citado: 10 jun 2020]; 2:217-224. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2007505713727157>
42. Wayne Daniel. BIOESTADÍSTICA. 3era ed. México: Limusa; 1991 [citado 4 de Julio del 2020]. Disponible en:
https://www.academia.edu/17988752/Bioestadistica_Base_para_el_analisis_de_las_ciencias_de_la_salud
43. Casado I. Optimización de la extracción de aceites esenciales por destilación en corriente de vapor. [Tesis de Título]. Madrid, España: Universidad Politécnica de Madrid; 2018. Disponible en:
http://oa.upm.es/49669/1/TFG_IRENE_CASADO_VILLAVERDE.pdf
44. Woon SA, Fisher D, Antimicrobial agents – optimising the ecological balance. MC Medicine [serie en Internet]. 2016 Aug [citado 4 de Julio del 2020]; 14(1): e114. Disponible en:
<https://bmcmmedicine.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12916-016-0661-z>
45. Uddhav SB, Sivagurunathan MS. Antibiotic susceptibility testing: A review on current practices. Int J Pharm [serie en Internet]. 2016 [citado 4 de Julio del 2020]; 6(3): 11-17. Disponible en:
http://www.pharmascholars.com/articles_pdfs/issues/2124638525_060302-1657.pdf?title=Antibiotic%20susceptibility%20testing:%20a%20review%20on%20current%20practices
46. Organización Mundial de la Salud – OMS. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3ra. Edición. Ginebra: Ediciones de la OMS; 2005 [citado 4 de Julio del 2020]. Disponible en:
http://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf

47. Constitución Política del Perú, DECRETO SUPREMO N° 068-2001-PCM, Ley sobre la conservación y aprovechamiento sostenible de la diversidad biológica; 1998 [citado 25 de Octubre del 2020]. Disponible en:
<https://sinia.minam.gob.pe/normas/ley-conservacion-aprovechamiento-sostenible-diversidad-biologica>
48. Cao J, Liu H, Wang Y, He X, Jiang H, Yao J, et al. Antimicrobial and antivirulence efficacies of citral against foodborne pathogen *Vibrio parahaemolyticus* RIMD2210633. ELSEVIER [serie en Internet]. 2020 Ag [citado 25 de Octubre del 2020]; 120. Citado en X-MOL; DOI: 10.1016 / j.foodcont.2020.107507. Disponible en:
<https://sci-hub.do/10.1016/j.foodcont.2020.107507>

ANEXOS

ANEXO 01

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Se consideró el esquema siguiente:

RG ₁	X ₁	O ₁
RG ₂	X ₂	O ₂
RG ₃	X ₃	O ₃
RG ₄	X ₄	O ₄

Donde:

RG₁₋₄: Grupos de experimentación

X₁: Meropenem 10µg/ml + aceite esencial de *Aloysia citriodora*

X₂: Aceite esencial de *Aloysia citriodora*

X₃: Meropenem 10µg/ml (control positivo)

X₄: DMSO – Dimetil Sulfóxido (control negativo)

O₁₋₄: Efecto antibacteriano (halo de inhibición).

ANEXO 02

MATRIZ DE OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES:

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
V. I: Agente antibacteria no	Compuesto químico con acción letal frente a bacterias. ⁴⁴ Tratamiento con agente no farmacológico (aceite esencial de <i>Aloysia citriodora</i>). Agente farmacológico (Meropenem 10µg/ml) y combinación de ambos agentes.	La muestra será dividida en los siguientes grupos: - Meropenem 10µg/ml + aceite esencial de <i>Aloysia citriodora</i> - Aceite esencial de <i>Aloysia citriodora</i> - Meropenem 10µg/ml - DMSO	RG1 RG2 RG3 RG4	Cualitativa nominal
V. D: Efecto antibacteria no	Mecanismos de acción de un compuesto químico sobre las bacterias, es eliminado (con efecto lítico, bactericida) o inhibiendo (bacteriostático). ⁴⁴	Se medirá la zona de inhibición de crecimiento, considerando los criterios del Estándar M100 del CLSI. ⁴⁰ Sensible ≥23 mm Intermedio 20 – 22 mm Resistente ≤19 mm	Con efecto: >23 mm Sin efecto: <23 mm	Cualitativa nominal

ANEXO 03

MUESTRA

TAMAÑO DE MUESTRA

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2\sigma^2}{(\underline{X}_1 - \underline{X}_2)^2}$$

Dónde:

- $Z_{\alpha/2} = 1.96$ Para un nivel de confianza del 95%
- $Z_{\beta} = 0,84$ para una potencia de prueba del 80%
- $\underline{X}_1 = 23\text{mm.}^{40}$
- $\underline{X}_2 = 21\text{mm.}^{14}$
- $\sigma^2 = 1,52 \text{ mm}^{14}$

$n = 9,0568 = 10$ repeticiones por grupo de estudio

ANEXO 04

INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA MEDIR EL TAMAÑO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm) SOBRE CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae*

ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem

N° Repet	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm)			
	AEAC al 100%	AEAC al 100% + MER a 10 µg/ml	MER a 10 µg/ml	DMSO al 20%
1	16	27	23	0
2	15	28	25	0
3	15	25	21	0
4	13	26	22	0
5	15	25	23	0
6	14	27	23	0
7	16	26	24	0
8	12	26	24	0
9	17	26	24	0
10	15	27	25	0

AEAC: Aceite Esencial de *Aloysia citriodora*

MER: Meropenem

DMSO: Dimetil Sulfoxido

ANEXO 05

VALIDEZ Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

VALIDEZ DE TEST: JUICIO DE EXPERTOS

INSTRUCTIVO PARA LOS JUECES

Indicación: Señor especialista se le pide su colaboración para que luego de un riguroso análisis de los ítems del cuestionario/ guía de observación o ficha de recolección de datos, el mismo que le mostramos a continuación, indique de acuerdo a su criterio y su experiencia profesional el puntaje de acuerdo a si la pregunta permite capturar las variables de investigación del Proyecto.

En la evaluación de cada ítem, utilice la siguiente escala:

RANGO	SIGNIFICADO
1	Descriptor no adecuado y debe ser eliminado
2	Descriptor adecuado, pero debe ser modificado
3	Descriptor adecuado


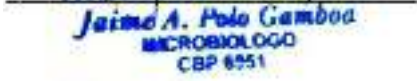
Los rangos de la escala propuesta deben ser utilizados teniendo en consideración los siguientes criterios:

- Vocabulario adecuado al nivel académico de los entrevistados.
- Claridad en la redacción.
- Consistencia Lógica y Metodológica.

Recomendaciones:

.....
.....
.....
.....

Gracias, por su generosa colaboración

Apellidos y nombres	Polo Gamboa Jaime Abelardo
Grado Académico	Magister en Microbiología
Mención	Docencia Universitaria
Firma	 

FICHA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

RANGO	SIGNIFICADO
1	Descriptor no adecuado y debe ser eliminado
2	Descriptor adecuado, pero debe ser modificado
3	Descriptor adecuado

Firma y sello:



Jaime A. Polo Gamboa
 MICROBIOLOGO
 CBP 6951

CBP: 6951

ÍTEM	CALIFICACIÓN DEL JUEZ			OBSERVACIÓN
	1	2	3	
Número de placas de Petri				
Halos de inhibición de Meropenem 10µg + aceite esencial de <i>Aloysia citriodora</i>			X	
Halo de inhibición de Aceite esencial de <i>Aloysia citriodora</i> al 100%			X	
Halo de inhibición de Meropenem 10µg			X	
Halo de inhibición de Dimetil Sulfóxido			X	

VALIDEZ DE TEST: JUICIO DE EXPERTOS

INSTRUCTIVO PARA LOS JUECES

Indicación: Señor especialista se le pide su colaboración para que luego de un riguroso análisis de los ítems del cuestionario/ guía de observación o ficha de recolección de datos, el mismo que le mostramos a continuación, indique de acuerdo a su criterio y su experiencia profesional el puntaje de acuerdo a si la pregunta permite capturar las variables de investigación del Proyecto.

En la evaluación de cada ítem, utilice la siguiente escala:

RANGO	SIGNIFICADO
1	Descriptor no adecuado y debe ser eliminado
2	Descriptor adecuado, pero debe ser modificado
3	Descriptor adecuado


Los rangos de la escala propuesta deben ser utilizados teniendo en consideración los siguientes criterios:

- Vocabulario adecuado al nivel académico de los entrevistados.
- Claridad en la redacción.
- Consistencia Lógica y Metodológica.

Recomendaciones:

.....
.....
.....
.....

Gracias, por su generosa colaboración

Apellidos y nombres	Contreras Ultima Roberth Danny
Grado Académico	Médico Reumatólogo
Mención	Investigación y docencia universitaria
Firma	 Roberth Danny Contreras Ultima C.M.P. 63816 RNE 65316 REUMATÓLOGO

FICHA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

RANGO	SIGNIFICADO
1	Descriptor no adecuado y debe ser eliminado
2	Descriptor adecuado pero debe ser modificado
3	Descriptor adecuado

Firma y sello:



Robert Danny Contreras Ulivi
C.M.P. 63816 RNE 6531F
REUMATÓLOGO

ÍTEM	CALIFICACIÓN DEL JUEZ			OBSERVACIÓN
	1	2	3	
Número de placas de Petri			<u>X</u>	
Halos de inhibición de Meropenem 10µg + aceite esencial de <i>Aloysia citriodora</i>			<u>X</u>	
Halo de inhibición de Aceite esencial de <i>Aloysia citriodora</i> al 100%			<u>X</u>	
Halo de inhibición de Meropenem 10µg			<u>X</u>	
Halo de inhibición de Dimetil Sulfóxido			<u>X</u>	

VALIDEZ DE TEST: JUICIO DE EXPERTOS

INSTRUCTIVO PARA LOS JUECES

Indicación: Señor especialista se le pide su colaboración para que luego de un riguroso análisis de los ítems del cuestionario/ guía de observación o ficha de recolección de datos, el mismo que le mostramos a continuación, indique de acuerdo a su criterio y su experiencia profesional el puntaje de acuerdo a si la pregunta permite capturar las variables de investigación del trabajo.

En la evaluación de cada ítem, utilice la siguiente escala:

RANGO	SIGNIFICADO
1	Descriptor no adecuado y debe ser eliminado
2	Descriptor adecuado pero debe ser modificado
3	Descriptor adecuado

Los rangos de la escala propuesta deben ser utilizados teniendo en consideración los siguientes criterios:

- ⊕ Vocabulario adecuado al nivel académico de los entrevistados.
- ⊕ Claridad en la redacción.
- ⊕ Consistencia Lógica y Metodológica.

Recomendaciones:

.....
.....
.....

Gracias, por su generosa colaboración

Apellidos y nombres	Fernández Sosaya José Luis
Grado Académico	Maestro en Farmacia y CC Bioquímicas
Mención	Productos Naturales
Firma	 CMI 26259

FICHA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

ITEM	CALIFICACIÓN DEL JUEZ			OBSERVACIÓN
	1	2	3	
Número de placas de Petri				
Halos de inhibición de Meropenem 10µg + aceite esencial de <i>Aloysia citrodora</i>			<u>X</u>	
Halo de inhibición de Aceite esencial de <i>Aloysia citrodora</i> al 100%			<u>X</u>	
Halo de inhibición de Meropenem 10µg			<u>X</u>	
Halo de inhibición de Dimetil Sulfoxido			<u>X</u>	

RANGO	SIGNIFICADO
1	Descriptor no adecuado y debe ser eliminado
2	Descriptor adecuado pero debe ser modificado
3	Descriptor adecuado

Firma y sello:



 CMP 26059

ANEXO 06

A. Identificación taxonómica de *Aloysia citriodora* por el Herbario de la Universidad Nacional de Trujillo.



B. Obtención del aceite esencial de *Aloysia citriodora* por el método de arrastre con vapor de agua ⁴³

Las plantas frescas de *Aloysia citriodora* “cedrón”, se obtuvo en el mercado de abastos la Hermelinda de Trujillo, procedentes de la provincia de Sánchez Carrión, La Libertad, en una cantidad de 10 Kg aproximadamente y se trasladó al laboratorio de Microbiología “San José” de Trujillo, en donde se seleccionaron las hojas sin indicios de alteraciones. Se lavaron con agua destilada, se dejó orear sobre papel absorbente estéril y se colocó sobre bandejas de cartulina que se llevó al horno a 40°C por un tiempo suficiente hasta que las hojas secaron completamente. Se almacenó herméticamente en recipientes negros.



El aceite esencial de *Aloysia citriodora* se obtuvo por el método de arrastre con vapor de agua; para ello, se calentó (en cocina eléctrica) un balón con agua destilada hasta la ebullición. El vapor pasó a otro balón con la muestra de hojas de cedrón, a través de un ducto. El balón con la muestra se conectó a la vez con un condensador (refrigerante) a través de otro ducto; esto permitió que el vapor del agua pasara a través del balón de la muestra y pasara al condensador arrastrando los componentes de las hojas del cedrón. Finalmente, el vapor se condensó y fue recibido en un embudo de decantación tipo pera. El líquido recibido formó dos fases, quedando el aceite en la superficie por diferencia de densidades. El proceso de destilación se realizó en 3 horas aproximadamente. El Aceite Esencial (AE) se

colocó en un frasco de vidrio ámbar estéril y se reservó a temperatura de refrigeración hasta su utilización.



C. Cultivo de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas y preparación del inóculo ⁴⁰

Se reactivó las cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas, sembrando en agar BHI, y se incubó en la estufa a 37°C por 24 horas. Para la prueba de susceptibilidad, se utilizó agar Mueller-Hinton como medio de cultivo. Se preparó suficiente medio para 10 placas Petri (200 ml aprox.) y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Después, se sirvió 18-20 ml por cada placa Petri estériles de plástico desechables de 90x15mm, y se dejó reposar hasta que se solidificó completamente.

El inóculo se preparó colocando 3 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo estéril, al cual se le adicionó suficientes colonias de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas (cultivo de 20-24 horas), de tal modo que se observó una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml aproximadamente).



D. Evaluación del efecto sinérgico antibacteriano por el método de difusión con pozos en agar ⁴⁵

Se evaluó mediante la prueba de susceptibilidad utilizando el método de difusión con pozos en agar, según los pasos siguientes:

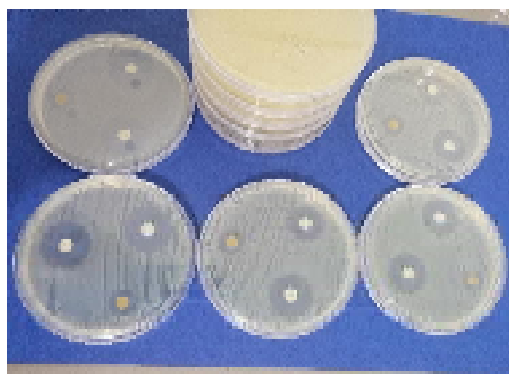
- Se sembró *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas, embebiendo un hisopo estéril en el inóculo y deslizándose sobre toda la superficie del medio de cultivo de las Placas Petri; de tal modo, que el microorganismo quedo como una capa en toda la superficie.



- Se hizo 4 pozos en el medio de cultivo de cada placa recién sembrada, mediante punzonado con un sacabocado estéril de seis milímetros de diámetro.
- Al primer pozo, se agregó 50 μ l de la combinación de Meropenem + aceite esencial de *Aloysia citriodora*.
- Al segundo pozo, se agregó 50 μ l de aceite esencial de *Aloysia citriodora*.
- Al tercer pozo, se agregó 50 μ l de Meropenem (control positivo).
- Al cuarto pozo, se agregó 50 μ l de DMSO (control negativo).



Se dejó en reposo por 15 min y después, se incubó las placas de forma invertida en la estufa a 37°C por 20-24 horas. La lectura se realizó observando y midiendo con una regla Vernier, el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento bacteriano. Se interpretó como sensible o resistente, según lo establecido en el Estándar M100 del CLSI.



E. CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO



CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO

El Laboratorio "San José" deja constancia que ha cedido *ad honorem* sus instalaciones, en donde JUAN CARLOS VELÁSQUEZ PAREDES, estudiante de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, ejecutó la parte experimental de su proyecto de tesis titulado "Sinergia antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Aloysia citrodora* con meropenem sobre *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenem ATCC BAA-1705", durante los días 01 al 05 de octubre de 2020, bajo la orientación y asesoramiento del Microbiólogo Jaime Abelardo Polo Gamboa.

Se expide la presente a solicitud del estudiante, sólo para fines académicos, a los 27 días del mes de octubre de 2020.


Jaime Abelardo Polo Gamboa
Microbiólogo - Microbiología
C.B.P. 0201

Sede Principal: Francisco Bolognesi 678 Of. 203 - Centro Histórico - Trujillo
Sucursales: Los Corales 277- Barrio Médico Urb. Santa Inés - Trujillo
☎ 769999 - 📠 948649844
✉ sanjoselabs@hotmail.com 🌐 www.sanjoselabs.amawebs.com/

ANEXO 07

Prueba de homogeneidad de varianzas					
		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
ZONAS DE INHIBICION	Se basa en la media	0.511	2	27	0.606
	Se basa en la mediana	0.435	2	27	0.651
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	0.435	2	22.717	0.652
	Se basa en la media recortada	0.481	2	27	0.623

ANEXO 08

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD PARA EL ESTUDIO EXPERIMENTAL.⁴⁶

AMBIENTE SEGURO:

Limpieza: Se lavo con agua y detergente, luego sin éste, realizando una acción mecánica o de arrastre sobre las superficies. La limpieza se realizó antes de todos los procedimientos de desinfección y esterilización de todas las áreas.

La limpieza se realizó con paños húmedos y el barrido por medio de escoba húmeda, con la intención de prevenir la resuspensión de los microorganismos que se encuentran en el piso. Se inició por las partes más altas, siguiendo la línea horizontal, descendiendo por planos.

Desinfección: Se realizó utilizando principalmente agentes químicos en estado líquido, como el alcohol a 70%, la pasteurización a 75°C y la radiación ultravioleta.

Descontaminación: Se realizó un tratamiento químico aplicado a objetos que tuvieron contacto con sangre o fluido corporales, con el fin de inactivar microorganismos en piel u otros tejidos corporales.

Esterilización: Esterilización por vapor, esterilización por calor seco, esterilización por inmersión en productos químicos.

PROTECCIÓN CORPORAL

Se uso bata, siendo esta una prioridad multifactorial para el ingreso al área de proyecto, y en la realización de todos los procedimientos por parte de los integrantes del equipo.

Recomendaciones:

- Usar bata dentro de las instalaciones del proyecto (laboratorio)
- Esta ropa protectora se retiró inmediatamente antes de abandonar el laboratorio.
- Luego se transportó de manera adecuada a un lugar específico para posterior descontaminación y lavado.

PROTECCIÓN OCULAR Y TAPABOCA

- El uso de lentes y de mascarillas tiene como fin proteger las membranas de las mucosas de boca, nariz y ojos durante los procedimientos y actividades que puedan generar aerosoles, y salpicaduras de fluidos.
- Anteojos o lentes de Seguridad:
- Permiten una correcta visión.
- Tienen protección lateral y frontal, ventilación indirecta, visor de policarbonato, sistema anti rayaduras y anti empañantes.
- Permiten el uso simultáneo de lentes correctores.
- Son de uso personal.
- Fueron usados en todo momento durante los procesamientos de las muestras y el fraccionamiento de las unidades de fluidos. Cualquier excepción a esta regla, fue descrita en el programa de bioseguridad del servicio.

TAPABOCA

- Es de material impermeable frente a aerosoles o salpicaduras.
- Es amplio de tal forma que cubre la nariz y toda la boca.
- Se utilizó por el equipo durante todo el tiempo manteniéndolo limpio y sin deformación.

PROTECCIÓN DE LOS PIES:

La protección se realizó para evitar lesiones producidas por sustancias corrosivas, descargas eléctricas, objetos pesados, así como para prevenir deslizamientos en pisos húmedos. Si cayera al suelo una sustancia corrosiva o un objeto pesado.

No se llevó ninguno de los siguientes tipos de calzados para transitar en el laboratorio:

- Zuecos
- Tacones altos
- Zapatos que dejen el pie al descubierto
- Se eligió un calzado de cuero resistente que cubrió todo el pie. Este tipo de calzado proporcionó una mejor protección.

PROTECCIÓN DE LAS MANOS

Se uso guantes para prevenir o disminuir el riesgo de contaminación con los microorganismos de la piel del operador, como de la transmisión de gérmenes manipulados hacia el operador. Se realizo el lavado de manos según la técnica clínica con solución a base de clorhexidina y secadas antes del calzado de los guantes los cuales fueron estériles.

TESIS

por Juan Carlos VELASQUEZ PAREDES

Fecha de entrega: 09-nov-2020 08:14a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 1437370185

Nombre del archivo: TESIS_-TUR.docx (61.13K)

Total de palabras: 4359

Total de caracteres: 25081



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA

Sinergia antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Aloysia citriodora*
con meropenem sobre *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705
resistente a carbapenem

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO CIRUJANO

AUTOR:

Velasquez Paredes, Juan Carlos. (ORCID: 0000-0002-1930-7630)

ASESORES:

Dra. Llaque Sánchez, María Rocío del Pilar. (ORCID: 0000-0002-6764-4068)

Dra. Yupari Azabache, Irma Luz. (ORCID: 0000-0002-0030-0172)

Mg. Polo Gamboa, Jaime Abelardo. (ORCID: 0000-0002-3768-8051)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Enfermedades Transmisibles

Trujillo - Perú

2020

I. INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana farmacológica, data desde hace muchas décadas, sin embargo, a nivel mundial en Carolina del Norte en el año 1996, se reportó por primera vez a *Klebsiella pneumoniae carbapenemasa* (KPC), en un aislado de *Klebsiella pneumoniae* (Kp), que subsiguientemente se extendió a Asia, Europa, Medio Oriente, América del Sur y Central, Oceanía y África.^{1,2}

En el año 2011, en Colombia se informó el primer reporte de un brote de cepas ya clasificadas KPC-3 y hasta la actualidad es un problema endémico en este país. También se ha reportado la presencia de KPC en Uruguay, Brasil, Chile, Argentina y Ecuador. En marzo del 2012 se publicó en Italia el primer hallazgo de una cepa de KPC, aislada desde un paciente. Actualmente, a nivel mundial las carbapenemasas generan resistencia terapéutica gracias a sus diferentes grados de bombas de expulsión y expresión de porinas asociados con producción de betalactamasas con espectro extendido, así como la producción de la enzima carbapenemasa.^{1,3}

En el año 2013 en Perú, el Hospital Nacional Arzobispo Loayza publicó el primer reporte de KPC. En el 2017 se describieron nueve casos de Kp resistente con presencia de una nueva enzima llamada Nueva Delhi Metalo beta-lactamasas; como agentes infecciosos o colonizantes, en pacientes gravemente enfermos, en su mayoría en el área de neurocirugía del Hospital Nacional Dos de Mayo. Siendo estos los primeros reportes de Kp resistente en el Perú.^{4,5}

Varios microorganismos son resistentes a diversos tipos de antibióticos, debido al gran porcentaje de uso irracional. Es por ello que despierta gran interés el descubrir sustancias alternativas y/o complementarias a partir de orígenes naturales, incluyendo los extractos metanólicos de las plantas. El uso de los extractos metanólicos ha desarrollado un gran espectro de aplicaciones en los últimos años. Sin embargo, las plantas nativas al ser poco estudiadas son desconocidas. El *Aloysia citriodora* es encontrado en el Perú, por lo que es relevante conocer la envergadura de los usos que pueda tener su aceite esencial (AE).⁶

Aloysia triphylla Palau también llamado *Aloysia citriodora*, popular con el nombre vulgar de "Cedrón", es una planta oriunda de América del Sur. Es una planta leñosa, arbustiva, que alcanza 1 m. o más de altura, las hojas son simples con un característico olor a limón. Pertenece al reino, subreino, clase, subclase, orden, familia, género y especie, *Plantae*, *Tracheobionta*, *Magnoliopsida*, *Asteridae*, *Lamiales*, *Verbenaceae*, *Aloysia*, *Aloysia triphylla* respectivamente.⁷

Los beneficios que aporta el cedrón es su acción antibacteriana del AE de las partes de las hojas, flores y tallo. Todos los AE *Aloysia citriodora*, revelaron acción bactericida elevada contra *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus*, excepto el AE de las flores que presentó actividad antimicrobiana moderada contra cepas de *Estafilococo aureus*.⁸

Por lo mencionado, se planteó el siguiente problema: **¿Tiene efecto sinérgico antibacteriano, la asociación del aceite esencial *Aloysia citriodora* al 100% con meropenem a 10 µg/ml sobre *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem, en estudio *in vitro*?**

Se justificó realizar la investigación, porque contribuye al conocimiento de nuevos agentes naturales para un manejo terapéutico alternativo o coadyuvante frente a bacterias resistentes a los antibióticos. Además, debido a la casi inexistente información, sobre el aceite esencial de *Aloysia citriodora* "cedrón" como agente antibacteriano contra *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos, es útil actualizar estudios al respecto; que serán de gran utilidad y aplicabilidad debido a la fácil accesibilidad y no toxicidad que tiene el cedrón, y el costo está al alcance de toda la población. Además, se puede utilizar el aceite esencial de *A. citriodora* sin que pueda ocasionar daño ni efectos adversos secundarios.

Los resultados de esta investigación han aportado valiosa información y conocimientos para que sean considerados en futuras investigaciones complementarias, en la búsqueda de nuevas alternativas naturales para el tratamiento contra bacterias resistentes.

Para este estudio se planteó como objetivo general: Evaluar la sinergia antibacteriana del aceite esencial de *Aloysia citriodora* al 100% con meropenem a 10 $\mu\text{g/ml}$ sobre *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem, en estudio *in vitro*.

De esta manera, se planteó los objetivos específicos: a) Establecer la eficacia antimicrobiana del aceite esencial *Aloysia citriodora* al 100% y b) Establecer la eficacia antimicrobiana del meropenem a 10 $\mu\text{g/ml}$ sobre *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem.

Para responder a la interrogante del problema se planteó las hipótesis: H1: La asociación del aceite esencial *Aloysia citriodora* con meropenem a 10 $\mu\text{g/ml}$ tiene efecto sinérgico antibacteriano sobre *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem, en estudio *in vitro*; y H0: La asociación del aceite esencial *Aloysia citriodora* con Meropenem a 10 $\mu\text{g/ml}$ no tiene efecto sinérgico antibacteriano sobre *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem, en estudio *in vitro*.

II. MARCO TEÓRICO

Estudios en diferentes países muestran la eficacia que tiene *Aloysia citriodora* sobre las *Enterobacteriaceae*; por ejemplo, **Ebani, et al.**⁹ (India, 2018), realizaron un estudio cuya finalidad fue investigar su contenido químico y su acción antimicrobiana in vitro de dieciséis aceites esenciales, entre ellos *Aloysia triphylla* y cinco mezclas contra cepas de *E. coli* y *A. fumigatus*. Utilizaron el procedimiento de disco difusión en agar. Observaron al AE de *A. triphylla* que no fue efectivo contra *E. coli*, pero mostró la mejor actividad antimicótica (con 0,855 mg/ml). Este estudio muestra resultados prometedores para utilizar AE en el medio ambiente con fines de desinfección.

Asimismo, **Küçük, et al.**¹⁰ (Turquía 2017), evaluaron los extractos de acetona, alcohol y hexano de *Aloysia triphylla*, para determinar la actividad antibacteriana a través del método de disco difusión. Estos extractos se probaron en bacterias grampositivas y gramnegativas, entre ellas Kp, así como en 7 hongos. Los extractos de *Aloysia triphylla* inhibieron el crecimiento de microorganismos utilizados en estas pruebas en diferentes proporciones y extractos (alcohol, acetona y hexano) con un halo de inhibición con extractos de: alcohol de 10 mm, acetona de 15 mm y hexano de 7 mm. Se concluyó que el extracto de acetona de esta planta, evidenció actividad antimicrobiana contra las bacterias; pero sin actividad antifúngica contra los hongos utilizados en este estudio.

Oukerrou, et al.¹¹ (Marruecos, 2017), investigaron los efectos citotóxicos y antibacterianos in vitro del AE de *Aloysia citriodora*, cosechados en diferentes zonas de Marruecos. Se cultivaron cepas de varios microorganismos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) en medios Müller Hinton. Luego, se comprobó la acción antibacteriana por disco difusión en agar, la concentración bactericida mínima (CBM) y la concentración inhibitoria mínima (CIM) usando el método de microdilución. El AE reveló una actividad antimicrobiana significativa frente a cepas Gram positivas y Gram negativas (8 a 10 mm). Las CIM oscilaron entre 2,84 y 8,37 mg/ml.

Azuero, et al.¹² (Ecuador, 2016), comprobaron la acción antibacteriana de los extractos metanólicos de *Lippia citriodora* (cedrón) y 11 especies vegetales más. Usaron la técnica de difusión en agar, probaron cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. albicans*. Todos los extractos analizados, a excepción de *L. citriodora* y *A. conyzoides*, presentaron una acción bactericida contra todas las cepas bacterianas ensayadas. Sin embargo, *L. citriodora* mostró un efecto antibacteriano mediano contra *E. coli* y *P. aeruginosa* (8 a 10 mm) y un efecto antibacteriano bajo contra *S. aureus* (<6 mm).

Crestani, et al.¹³ (Brasil, 2012) establecieron la acción antimicrobiana y la composición química del AE de *Aloysia triphylla*. El AE se obtuvo por hidrodestilación y se estudió por espectrometría de masas y cromatografía de gases. Se evaluó la acción antimicrobiana por el procedimiento de difusión de disco contra 13 bacterias grampositivas y gramnegativas, entre ellas Kp. El AE mostró actividad antimicrobiana contra todas las bacterias probadas. Observaron que contra Kp formó zonas de inhibición de $21 \pm 0,01$ mm de diámetro. Concluyeron que existe efecto positivo al aumentar la dosis de AE en relación con el tamaño del halo y una mayor actividad sobre bacterias Gram-positivas frente a Gram-negativas.

Por su parte **Zare, et al.**¹⁴ (Irán, 2011) estudiaron las actividades antimicrobianas del extracto metanólico de las hojas y flores de *Lippia citriodora* H.B.K. (verbenaceae), haciendo uso del método de difusión en disco. Los extractos metanólicos de esta planta mostraron un impacto antimicrobiano en 8 bacterias, incluida Kp y 2 hongos. Observaron que, al aumentar la concentración del extracto, aumentó la actividad antimicrobiana en todos los microorganismos. Los hongos fueron más sensibles que las bacterias y de éstas más, las grampositivas. El extracto de hojas de *L. citriodora* a partir del 25% tuvo efecto sobre Kp ($22,00 \pm 1,52$ mm, al 50% ($30,00 \pm 2,08$ mm)).

Además, **Calderón.**¹⁵ (Colombia, 2011), estudió la actividad antibacteriana del *Aloysia triphylla*, frente a *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Cándida albicans*, Kp, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, empleando el procedimiento de difusión con pozos en agar. Obtuvo de la planta extractos de diclorometano, n-

hexano y metanol. Observó que el extracto de *Aloysia triphylla* no presentó actividad antimicrobiana significativa a concentraciones de 250 - 4000 mg/L sobre los microorganismos estudiados.

Rudas.¹⁶ (Perú, 2017) estudió la composición química del AE de *Aloysia citriodora palau* de la región de Huarochirí, Lima y realizó un fraccionamiento biodirigido con el fin de conocer la acción in vitro del AE y sus fracciones contra *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. El AE mostró actividad antibacteriana in vitro. La fracción con mejor actividad antibacteriana fue la AE2, la cual presentó un MIC de 1.6% contra las bacterias *E. coli* y *S. typhimurium*. El compuesto mayoritario en la fracción AE2 fue el citral siendo el responsable de la actividad antibacteriana.

Las especies de *Klebsiella* causan una amplia gama de enfermedades que incluyen neumonía, infección del tracto urinario y sepsis. Estas infecciones son particularmente un problema entre los neonatos, ancianos e inmunocomprometidos. *Klebsiella* se halla en todas partes de la naturaleza, incluido el agua, suelo y animales; pueden colonizar dispositivos médicos y el entorno sanitario. Se consideran patógenos oportunistas que colonizan las superficies mucosas del tracto gastrointestinal sin causar patología; sin embargo, desde las mucosas, *Klebsiella* puede diseminarse a otros tejidos causando infecciones potencialmente mortales^{17, 18}

Klebsiella pneumoniae, miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo en forma de bastón, gram negativo, fermentador de lactosa, con una cápsula prominente. Es un típico patógeno oportunista que se encuentra ampliamente en la boca, la piel y los intestinos. Afecta a población con sistemas inmunes comprometidos o que están debilitados por otras infecciones. Sus biopelículas formadas in vivo protegen al patógeno de los ataques de las respuestas inmunitarias y antibióticos del huésped y los aislamientos nosocomiales de Kp a menudo muestran fenotipos de resistencia a múltiples fármacos que comúnmente son causados por las β -lactamasas de espectro extendido.¹⁹

El amplio resistoma de este patógeno, abarca abundantes genes resistentes a antibióticos (GRA) regulados por cromosomas y plásmidos. Bajo presión selectiva de antibióticos, *K. pneumoniae* acumula continuamente GRA, mediante mutaciones de novo y mediante la adquisición de plásmidos y elementos genéticos transferibles, lo que conduce a cepas extremadamente resistentes a los medicamentos (XDR) que albergan un "super resistoma".²⁰

En la década de 1990 surgió una nueva familia ESBL, el grupo cefotaximasa-M (CTX-M), que actualmente son las BLEE dominantes en Kp. Estas enzimas confieren resistencia a las penicilinas y al espectro expandido de cefalosporinas, pero son ineficaces contra carbapenémicos. Entre los patógenos resistentes a múltiples fármacos, Kp es una de las superbacterias más peligrosas del mundo; y tiende a volverse resistente a prácticamente todos los antibióticos disponibles en la actualidad.^{21, 22}

Se informan sobre las cepas de KPC cada vez más en todo el mundo. Las bacterias que producen estas enzimas generalmente son susceptibles solo a unos pocos antibióticos y están asociadas con una alta mortalidad, especialmente en pacientes con infecciones del torrente sanguíneo. Además de ser resistentes a todas las β lactamasas disponibles, las carbapenemasas de KPC tienen una alta capacidad de propagación. Aunque se ha informado una alarmante dispersión de Kp resistente a carbapenem, no se ha descrito el impacto clínico de este patógeno.^{23, 24}

Gran parte de cepas productoras de carbapenemasas (gramnegativos) corresponden a Kp y *Escherichia coli*, siendo las enzimas de carbapenemasas más frecuentes identificadas el del tipo KPC, IMP, NDM-1, VIM, OXA-181 y OXA-48 (de oxacilinas). Las variantes más comunes son KPC-2 y KPC-3 responsables de brotes epidémicos, la enzima KPC-2 predomina en el mundo, con brotes informados en Estados Unidos, China y Europa, mientras que la enzima KPC-3 fue detectado principalmente Estados Unidos, América Latina y Israel.^{25, 26, 27}

Recientemente, se ha propuesto la asociación de dos carbapenémicos sinérgicos (ertapenem, meropenem, doripenem o imipenem), solos o combinados con otros

antibióticos, como tratamiento de rescate para las infecciones por Kp resistente a carbapenem. Dicha terapia combinada fue evidenciada ya que ertapenem mostró menor actividad in vitro contra este patógeno, debido a una mayor afinidad por las carbapenemasas. Su papel, como antibiótico, permitiría que los carbapenémicos más activos expresen su actividad más fuerte en el sitio de la infección. Sin embargo, aunque los datos son alentadores, se limitan a estudios in vitro, informes de casos y series cortas de casos.^{28, 29}

Existe una necesidad urgente de asistencia médica para tratar estas bacterias resistentes. El uso empírico de antibióticos es uno de los factores que favorecen el incremento de la resistencia a los medicamentos. Hoy en día, los investigadores están buscando algunas moléculas antimicrobianas novedosas que tengan un espectro amplio de acción frente a bacterias Gram positivas y negativas sin tener muchos o ningún efecto secundario. Están explorando una gran diversidad de plantas con propiedades medicinales. Las acciones antimicrobianas de las plantas se atribuyen a la presencia de compuestos activos, por ejemplo, quinonas, fenoles, alcaloides, flavonoides, terpenoides, aceites esenciales, taninos, lignanos, glucosinolatos y algunos metabolitos secundarios.^{30, 31}

Las plantas aromáticas y medicinales han adquirido especial atención en el campo de la investigación intensiva sobre los compuestos antimicrobianos naturales. Constituyen una fuente constante de principios activos contra gérmenes patógenos. Entre estos productos, los aceites esenciales producidos por plantas aromáticas como metabolitos secundarios, han ganado un interés neto por muchos investigadores.^{32, 33}

Se han desarrollado muchas listas en la composición del aceite esencial de cedrón (*Aloysia citriodora*) que difieren de cada una debido a los diferentes entornos geográficos, climáticos y al tiempo de cosecha. Los ingredientes principales en estas listas son citral (neral y geranial), limoneno y 1,8 cineol. También se estudiaron las propiedades antioxidantes y antibacterianas, especialmente cuando se aplican a los siguientes patógenos: *Escherichia coli*, Kp, *Mycobacterium*

tuberculosis, Staphylococcus aureus, Helicobacter pylori, Pseudomonas aeruginosa y *Candida albicans*.^{34, 35}

Las hojas de *Aloysia citriodora* son ricas en aceites esenciales. Estos aceites se utilizan en la medicina tradicional como manejo terapéutico de algunos trastornos gastrointestinales, como agentes antimicrobianos, antimicóticos y como antioxidantes. También se informó que es una excelente fuente de sustancias farmacéuticamente activas utilizadas como carminativo, antiespasmódico y sedante, así como para las náuseas y los mareos.³⁶

En el análisis del AE de *Aloysia citriodora*, se han identificado en total más de cuarenta compuestos. Entre los principales componentes del aceite esencial se encuentran citronelal (27,30%), geranial (17,72%), neral (15,91%) y limoneno (12,41%), seguidos de óxido de cariofileno (9,30%) y α -curcumeno (7,90%), así como 1, 8-cineol (5,49%), trans-Caryophyllene (5,39%), trans-cariofileno (6,20%), entre otros.^{37, 38}

III. METODOLOGÍA

3.1 TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN:

TIPO DE ESTUDIO: Básico.³⁹

Diseño de Investigación: Experimental, con repeticiones múltiples y post pruebas. Se trabajó con un total de 4 grupos de cepas de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem, en el primer grupo se aplicó Meropenem a 10 μ g/ml más el aceite esencial de *Aloysia citriodora*, en el segundo grupo se usó el aceite esencial de *Aloysia citriodora*, el tercer grupo se usó para el control positivo a Meropenem a 10 μ g/ml y el último para el control negativo se utilizó el dimetilsulfóxido, aplicándose 10 repeticiones por cada grupo de estudio. Finalmente se evaluó el efecto antibacteriano mediante el diámetro del halo de inhibición, que indica su efectividad frente a ese patógeno.³⁹ (ANEXO 01)

3.2 VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN.

VARIABLE INDEPENDIENTE: Agente antibacteriano para cepas de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem.

No farmacológico: Aceite esencial de *Aloysia citriodora*.

Farmacológico: Meropenem a 10 µg/ml.

VARIABLE DEPENDIENTE: Efecto antibacteriano.⁴⁰

Si efecto: zona de inhibición ≥ 23 .

No efecto: zona de inhibición < 23 .

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES (ANEXO 02)

3.3 POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO

POBLACIÓN: La población estuvo constituida por todos los cultivos de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 productoras de carbapenemasas cultivadas en el laboratorio "San José".

Criterios de inclusión: Todos los cultivos de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 productoras de carbapenemasas, con 20 a 24 horas de sembrados.

Criterios de exclusión: Todos los cultivos de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 productoras de carbapenemasas contaminados.

MUESTRA:

Tamaño de la muestra, estimada por la fórmula estadística para comparación de dos medias.⁴¹ (ANEXO 03)

Muestreo: Se tomó las muestras de cultivos mediante muestreo probabilístico aleatorio simple.⁴²

Unidad de análisis: Lo conformó cada cultivo de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 productoras de carbapenemasas.

Unidad de muestra: Cada placa Petri con cepas de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 productoras de carbapenemasas.

3.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS:

TÉCNICA: Se utilizó la técnica de observación directa del experimento sobre la inhibición del crecimiento de las colonias de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 productoras de carbapenemasas.³⁹

INSTRUMENTO: Se aplicó como instrumento una ficha de recolección de datos elaborada para este estudio, que contiene la cantidad de repeticiones y los grupos de agentes antibacterianos (aceite esencial de *Aloysia citriodora*, meropenem y DMSO) (ANEXO 04)

VALIDEZ Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

El instrumento fue validado con la técnica de evaluación de expertos³⁹ participaron en la validación 3 profesionales del área de la salud (1 médico maestro en farmacia y Ciencias químicas, 1 médico reumatólogo y 1 microbiólogo), que garantizaron que los datos obtenidos en el experimento fueran registrados adecuadamente acorde con los objetivos del presente experimento. (ANEXO 05)

3.5 PROCEDIMIENTO: (ANEXO 06)

- a. Identificación taxonómica de *Aloysia citriodora* por parte del Herbario de la Universidad Nacional de Trujillo.
- b. El aceite esencial de *Aloysia citriodora* se obtendrá mediante el método por arrastre con vapor de agua.⁴³
- c. La cepa de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas será cultivada mediante la técnica por agotamiento en superficie, en medio de cultivo agar Mueller-Hinton.⁴⁰
- d. El efecto sinérgico antibacteriano será evaluado mediante el método de difusión con pozos en agar.⁴⁵
- e. El proyecto se ejecutó en el Laboratorio "San José".

3.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS:

La obtención de resultados de los diferentes tamaños de halos de inhibición fue registrada en la ficha de recolección de datos, luego, se registró en una hoja de cálculo del software Microsoft Excel 2019. Después, fue procesado con el software estadístico SPSS versión 26. Se comprobó la normalidad de los datos. Se analizó con pruebas paramétricas, aplicando el análisis de varianza ANOVA, para evaluar la diferencia significativa de los promedios de diámetros de los halos de inhibición. Asumiendo medias diferenciadas, se efectuó la prueba post hoc Tukey y Duncan para identificar el mejor tratamiento, así mismo se graficó el diagrama de cajas, donde se aprecia el comportamiento de los datos obtenidos. ⁴²

3.7 ASPECTOS ÉTICOS:

Durante todo el progreso del proyecto de investigación, se consideró los aspectos éticos referidos al tratamiento de residuos peligrosos, resguardo de la indemnidad de las personas y del medio ambiente, de acuerdo a lo estipulado según la OMS en el "Manual de Bioseguridad en el Laboratorio"⁴⁶ y la conservación de la diversidad biológica y la utilización sostenible de sus competentes según la Ley N°26839 "Ley sobre la conservación y aprovechamiento sostenible de la diversidad biológica"⁴⁷ (ANEXO 08)

IV. RESULTADOS

Tabla 01. Medidas estadísticas descriptivas de ¹ la sinergia antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Aloysia citriodora* con meropenem sobre *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem, en laboratorio

TRATAMIENTO	N	Media	Desv. Desviación	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
AEAC	10	14.80	1.476	13.74	15.86	12	17
AEAC+MRP	10	26.30	0.949	25.62	26.98	25	28
MRP	10	23.40	1.265	22.50	24.30	21	25

Fuente: Salida De SPSS 26.0

AEAC: Aceite esencial de *Aloysia citriodora*.

MRP: Meropenem.

Tabla 02. Estudio de ¹ varianza de las medidas del efecto antibacteriano del aceite esencial de *Aloysia citriodora*, de Meropenem y de la combinación de ambos sobre *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem.

⁷ ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	715.400	2	357.700	229.404	0.000
Dentro de grupos	42.100	27	1.559		
Total	757.500	29			

Fuente: Salida De SPSS 26.0

Tabla 03. Comparación de las medias de los halos inhibición con la prueba de Tukey entre el aceite esencial de *Aloysia citriodora*, el Meropenem y la combinación de ambos, sobre *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem.

HSD Tukey ^a				
Agente antibacteriano	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
AEAC	10	14.80		
MRP	10	23.40		
AEAC+MRP	10	26.30		
Sig.		1.000	1.000	1.000

Fuente: Reporte SPSS 26.0

AEAC: Aceite esencial de *Aloysia citriodora*.

MRP: Meropenem.

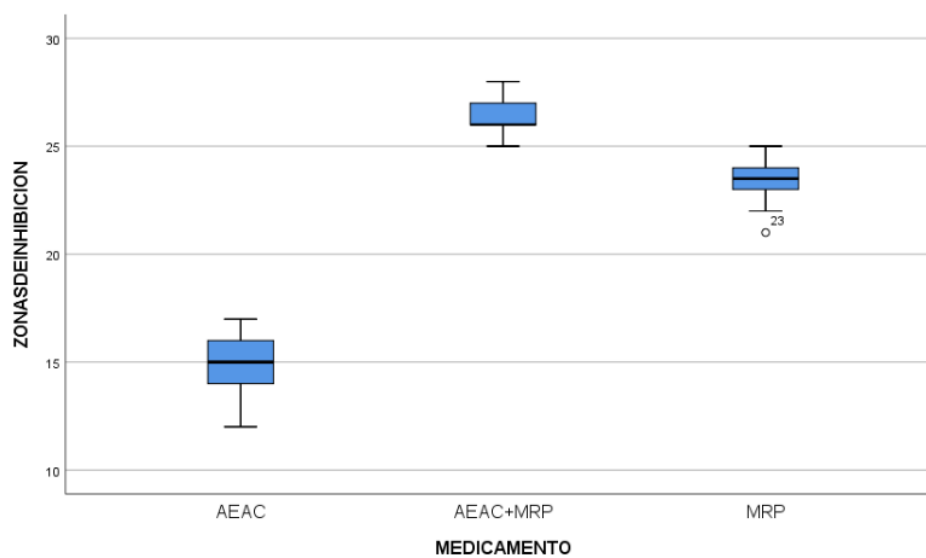


Figura 01. Diagrama de cajas de los halos de inhibición por grupos de estudio.

V. DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la sinergia antibacteriana del aceite esencial de *Aloysia citriodora* al 100% más meropenem a 10 µg/ml, sobre *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem, observando los siguientes resultados.

En la tabla 01, se observa que los tres tipos de sustancias utilizadas, presentaron actividad antibacteriana. El meropenem alcanzó una zona de inhibición (media: 23.4mm, DS: ±1.265, IC 95%: 22.50 a 24.30) siendo sensible (CLSI ≥ 23 mm). Sin embargo, la combinación del aceite esencial de *Aloysia citriodora* con meropenem mostró efecto sinérgico obteniéndose una zona de inhibición mayor que el fármaco solo (media: 26.3 mm, DS: ±0.949, IC 95%: 25.62 a 26.98).

La Tabla 02, se evalúa la varianza de las medias (después de haber trabajado la prueba de Levene, ver anexo 07), este análisis ANOVA nos indica que existen diferencias significativas entre los promedios de halos de inhibición en los grupos estudiados ($p= 0.000$).

Lo que se refuerza con la tabla 03 (Post ANOVA) y figura 01 que confirman la diferencia de los promedios de los halos de inhibición respectivamente, evidenciando el grupo que presentó mayor eficacia, en el presente estudio fue la combinación entre el aceite esencial de *Aloysia citriodora* más meropenem.

No se obtuvieron trabajos que estudiaran la sinergia entre *Aloysia citriodora* con meropenem u otro antibiótico, solo evaluaron el efecto de la planta en diferentes extractos, sin considerar la "*Klebsiella* resistente"; así tenemos Zare, et al.¹⁴ que reporta zonas de inhibición mayores (extracto de hojas de *L. citriodora* a partir del 25% tuvo efecto sobre Kp 22,00±1,52 mm, al 50% 30,00±2,08 mm), al igual que Crestani, et al.¹³ (21±0,01 mm). Menores zonas de inhibición demuestran, Küçük, et al.¹⁰ (alcohol de 10 mm, acetona de 15 mm y hexano de 7 mm).

Otros investigadores experimentaron con otros microorganismos como Ebani, et al.⁹ (India, 2018), actividad antimicótica (con 0,855 mg/ml), Oukerrou, et al.¹¹

(actividad antimicrobiana Gram positivas y Gram negativas de 8 a 10 mm), Azuero, et al.¹² (*E. coli* y *P. aeruginosa* de 8 a 10 mm y *S. aureus* <6 mm), Rudas.¹⁶ (MIC de 1.6% contra *E. coli* y *S. typhimurium*).

La razón de este resultado se remite a las bases moleculares de los mecanismos de acción de ambos componentes antibacterianos, en el caso del Meropenem inhibiendo la formación de la pared bacteriana en la tercer y cuarta fase, al unirse a proteínas ligandos específicos de las penicilinas tipo 1, 2 y 3, interfiriendo con las proteínas de soporte la pared bacteriana, activándose las autolisinas y en consecuencia provocar la permeabilidad de la membrana celular⁴⁴ y en el caso del aceite esencial *Aloysia citriodora*, la fracción AE2 del citral tiene actividad antibacteriana inhibiendo el anillo de biofilm, al inhibir la producción de EPS que es un componente de la matriz de la biopelícula, además inhibe la transcripción de genes responsables en la producción de la proteasa extracelular⁴⁸, de esta manera el aceite esencial de *Aloysia citriodora* concomitante a la vancomicina, generan una interacción sinérgica positiva al actuar sobre posibles diferentes sitios de acción.

El efecto antibacteriano se debe a sus compuestos fitoquímicos; el aceite esencial de cedrón (*Aloysia citriodora*) en sus componentes tiene citral (neral y geranial), limoneno y 1,8 cineol, que le confieren las propiedades insecticidas, antioxidantes y antibacterianas^{34, 35} El compuesto mayoritario en la fracción AE2 fue el citral siendo el responsable de la actividad antibacteriana.¹⁶ En el análisis del AE de *Aloysia citriodora*, se han identificado más de cuarenta compuestos: citronellal (27,30%), geranial (17,72%), neral (15,91%) y limoneno (12,41%), seguidos de óxido de cariofileno (9,30%) y α -curcumeno (7,90%), así como 1, 8-cineol (5,49%), trans-Caryophyllene (5,39%), trans-cariofileno (6,20%) limoneno (6,07%), entre otros.^{37, 38} La concentración de los compuestos difieren en relación a los diferentes entornos geográficos, climáticos y al tiempo de cosecha.^{34, 35}

VI. CONCLUSIONES

- En el estudio se evidenció sinergia antibacteriana entre el aceite esencial de *Aloysia citriodora* al 100% con meropenem sobre *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 resistente a carbapenem, siendo mayor la zona de inhibición en comparación con el CLSI ≥ 23 mm; por lo cual se acepta la hipótesis del investigador.
- El aceite esencial *Aloysia citriodora* al 100% evidenció menor efecto antibacteriano
- El meropenem tuvo actividad antibacteriana en rango considerado en el CLSI como sensible.

VII. RECOMENDACIONES

- La sinergia del aceite esencial de *Aloysia citriodora* con meropenem, debería ser considerada como una opción de medicina alternativa complementaria, debido a que potencia la sensibilidad frente a esta bacteria resistente, según lo determinado por el CLSI (≥ 23 mm).
- Se recomienda completar este estudio, evaluando la actividad individual de cada uno de los constituyentes fitoquímicos presentes en el aceite esencial de *Aloysia citriodora* con la finalidad de profundizar el mecanismo de acción que ejerce, puesto que existen escasas investigaciones.
- Investigar sobre la sensibilidad del aceite esencial *Aloysia citriodora* frente a otros microorganismos resistentes, realizando la comparación con el medicamento Gold estándar.
- Realizar investigaciones sobre la sinergia del aceite esencial *Aloysia citriodora* aunado a meropenem en animales de experimentación.