



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA

Eficacia antibacteriana de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* y *Caesalpinia spinosa* sobre *Escherichia coli* BLEE comparado con meropenem.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

Médico Cirujano

AUTOR:

Jara Rubio, Kevin Arnold ([ORCID: 0000-0002-9232-6088](https://orcid.org/0000-0002-9232-6088))

ASESORES:

Dra. Goicochea Ríos, Evelyn Del Socorro ([ORCID: 0000-0001-9994-9184](https://orcid.org/0000-0001-9994-9184))

Dra. Otiniano García, Nelida Milly ([ORCID: 0000-0001-9838-4847](https://orcid.org/0000-0001-9838-4847))

Mg. Polo Gamboa Jaime Abelardo ([ORCID: 0000-0002-3768-8051](https://orcid.org/0000-0002-3768-8051))

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TRANSMISIBLES

TRUJILLO – PERÚ
2020

DEDICATORIA

A mis padres, por haber depositado su confianza, esfuerzo y sacrificio en mí y brindarme el apoyo incondicional para mi formación como persona y de manera profesional.

A mi hermano, por ser el cómplice perfecto de muchas aventuras y el mejor amigo que puedo tener, además de ser mi soporte emocional y académico durante toda mi vida.

A mi hija, por ser el motivo más grande de las cosas que haré de ahora en adelante.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por darme la vida, una familia unida y maravillosa y por darme la oportunidad de ser padre. Él es quien conoce mi manera de ser y sabe por lo que pasé para llegar hasta este momento.

A mi familia por haberme apoyado en el proceso de mi formación personal y académica.

A mis asesores, ya que fueron la guía para poder realizar este trabajo y de esa manera ayudarme a subir un escalón más en mi formación profesional.

A los amigos de universidad, quienes de alguna manera brindan su apoyo día a día para que de esa manera juntos lleguemos a la etapa final de nuestra formación académica.

A todos los docentes que estuvieron en cada ciclo de mi formación profesional, ya que gracias a sus exigencias y consejos pude llenar vacíos y dudas tanto en lo personal como académico.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
III. METODOLOGÍA.....	9
31. TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	9
32. VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN:.....	9
33. POBLACIÓN, MUESTRA.....	10
34. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD.....	11
35. PROCEDIMIENTO:.....	11
36. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS:	13
37. ASPECTOS ÉTICOS.....	13
IV. RESULTADOS	14
V. DISCUSIÓN	17
VI. CONCLUSIONES.....	20
VII. RECOMENDACIONES	20
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
ANEXOS.....	

Índice de tablas

Tabla 1: Promedios de halos de inhibición de aceites esenciales de <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Origanum vulgare</i> y extracto acuoso de <i>Caesalpinia spinosa</i> comparado con meropenem	14
Tabla 2: Comparación de los halos de inhibición de aceites esenciales de <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Origanum vulgare</i> , extracto acuoso de <i>Caesalpinia spinosa</i> y meropenem mediante la prueba de anova	15
Tabla 3: Subconjuntos homogéneos de los halos de inhibición de aceites esenciales de <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Origanum vulgare</i> , extracto acuoso de <i>Caesalpinia spinosa</i> y meropenem mediante la prueba de tukey	15
Pruebas de normalidad	28
Prueba de homogeneidad de varianzas	28
Comparaciones múltiples	28

Índice de gráficos y figuras

FIGURA 1: Comparación de medias de <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Origanum vulgare</i> , extracto acuoso de <i>Caesalpinia spinosa</i> y meropenem.....	16
--	----

RESUMEN

La finalidad de este estudio fue evaluar la eficacia antibacteriana de los aceites esenciales de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* y extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa*, sobre *Escherichia coli* BLEE comparado con meropenem en estudio in vitro. Material y Métodos: Se hizo mediante un diseño experimental con repeticiones múltiples post Tukey, se utilizó la técnica de observación directa para determinar la proliferación del microorganismo en las placas Petri. Los aceites esenciales fueron comprados, por la coyuntura actual, de manera segura además de contar con la certificación respectiva y el extracto se obtuvo a través del machacado de la planta. Respecto a la determinación de la sensibilidad antimicrobiana se utilizó el método de difusión con discos o método de Kirby - Bauer. La concentración de todos los agentes antibacterianos fue al 100%; meropenem, se utilizó a concentración de 10 ug el cual fue el control positivo y el agua destilada de control negativo. El proceso de incubación se realizó a temperatura de 37° C y las lecturas se realizaron en las próximas 24 horas. Resultados: De acuerdo a la prueba Post hoc de Tukey, el aceite esencial de *Origanum vulgare* (25.70mm) fue el tratamiento con mayor eficacia, seguido de meropenem (23.90) y *Thymus vulgaris* (22.60mm) con eficacia similar. Por último, el extracto de *Caesalpinia spinosa* (20.50mm) fue el de menor eficacia (ANOVA, p = 0,000). Conclusiones: El tratamiento con *Origanum vulgare* demostró ser más eficaz, *Thymus vulgaris* posee efecto similar al de meropenem y *Caesalpinia spinosa* posee la menor eficacia respecto a los anteriores.

Palabras clave: Resistencia bacteriana, meropenem, *Thymus vulgaris*, *Caesalpinia spinosa*, *Origanum vulgare*, *Escherichia coli* BLEE.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the antibacterial efficacy of the essential oils of *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* and aqueous extract of *Caesalpinia spinosa*, on *Escherichia coli* BLEE compared to meropenem in in vitro study. Material and Methods: It was made by an experimental design with multiple post Tukey repetitions, the direct observation technique was used to determine the proliferation of the microorganism in Petri plates. The essential oils were purchased, by the current juncture, safely in addition to having the respective certification and the extract was obtained through the crushing of the plant. Regarding the determination of antimicrobial sensitivity the method of diffusion with discs or method of Kirby - Bauer was used. The concentration of all antibacterial agents was 100%; meropenem, was used at a concentration of 10 ug which was positive control and negative control distilled water. The incubation process was carried out at a temperature of 37°C and the readings were carried out in the next 24 hours. Results: According to Tukey's Post Hoc Test, *Origanum vulgare* essential oil (25.70mm) was the most effective treatment, followed by meropenem (23.90) and *Thymus vulgaris* (22.60mm) with similar efficacy. Finally, the extract of *Caesalpinia spinosa* (20.50mm) was the least effective (ANOVA, $p < 0.000$). Conclusions: Treatment with *Origanum vulgare* proved to be more effective, *Thymus vulgaris* has effect similar to that of meropenem and *Caesalpinia spinosa* has the least efficacy compared to the previous ones.

Keywords: Bacterial resistance, meropenem, *Thymus vulgaris*, *Caesalpinia spinosa*, *Origanum vulgare*, *Escherichia coli* BLEE

I. INTRODUCCIÓN

Con el descubrimiento de los antibióticos para ser aplicados como terapia médica, se hizo presente el inconveniente de la resistencia bacteriana, un proceso escondido, hasta ese momento, para la humanidad, pero viviente a nivel microbiológico. Los antibióticos utilizados para el tratamiento en pacientes que padecen de infecciones, normalmente son réplica o transformación de sustancias hechas por los propios microorganismos. Para subsistir durante millones de años, estos, tuvieron que desarrollar, en paralelo, mecanismos que los protejan de otras especies (antibióticos) y antitóxicos contra los mecanismos de protección (resistencia a los antibióticos) de esas otras.¹

El aumento de casos de bacterias resistentes a tratamiento convencional genera en un problema en la actualidad, pues la existencia de microorganismos multidrogo resistentes ha ido incrementando su incidencia. *E. coli BLEE*, es el patógeno resistente aislado con más frecuencia en bacteriemias hospitalarias y comunitarias. Las infecciones causadas por este agente han vivido cambios en su epidemiología que han demostrado ser de gran importancia, esto es palpable en el aumento de casos de infecciones.²

A nivel mundial, se ha observado que el 30% de las bacteriemias han sido ocasionadas por distintos linajes de *E coli*. BLEE. Respecto a Latinoamérica, se han documentado con mayor continuidad, se evidenció que *E. Coli* BLEE fue responsable del 47% de las infecciones, cantidades las cuales rebasan los datos registrados en otras regiones, aquello podría estar relacionado a la inadecuada administración de fármacos pertenecientes a la familia de las cefalosporinas y al tratamiento empírico inapropiado.³

A nivel nacional se evidenció, en un Hospital de nivel 3 en Lima, que el 45,9% de infecciones fueron causadas por *E coli BLEE*. El número de casos registrados en el grupo pediátrico fue 16,3%, versus 31,1% en el grupo de adultos. Además, el 63,6% se registró en pacientes ambulatorios. Esto evidencia un problema latente en la realidad nacional.⁴

Por lo antes mencionado, es importante reconocer otros componentes activos y sobre todo eficaces contra esta bacteria como por ejemplo el aceite esencial de *Origanum vulgare*, “orégano”, cuyos principales metabolitos activos son el carvacrol y timol. Es una planta muy útil y ha sido reconocido por mucho tiempo como una medicina popular, solo que recientemente se ha empezado a reportar su intervención terapéutica potencial como propiedades antiespasmódicas, antisépticas y tónicas. Aunque el espectro antimicrobiano es amplio, por lo que fue motivo de estudio in vitro e in vivo, aún hay falta de conocimiento respecto a su efectividad en contra de las bacterias multidrogo resistentes (MDR) obtenidas en pacientes nosocomiales.⁵

Por otro lado, el aceite esencial de *Thymus vulgaris*, “tomillo” cuyo metabolito principal es el timol, ha demostrado tener gran actividad antibacteriana. De hecho, en muchos estudios realizados con esta planta, se demostró que tuvo la mejor actividad antibacteriana contra algunas especies de enterobacterias, especialmente *E. coli*. Sin embargo, hay poca información disponible sobre la actividad antibacteriana contra las cepas BLEE.⁶

En lo correspondiente al extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa*, “tara”, cuyos principios activos son la manosa y el galactomanano, ha demostrado tener una gran actividad antibacteriana sobre *Escherichia coli*, pero por el momento faltan estudios que respalden su actividad contra las cepas BLEE.⁷

Se propuso como problema de investigación: ¿Posee efecto antibacterial *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* como aceites esenciales y *Caesalpinia spinosa* como extracto acuoso frente a *Escherichia coli* BLEE, contrastado con meropenem, in vitro?

La ejecución del presente estudio se justifica por el hecho de reflexionar acerca de la problemática que genera la creciente resistencia que ofrecen los patógenos del humano a los antimicrobianos, incluso cuando existan nuevos tratamientos en reserva. A pesar de ser un problema antiguo, la existencia de

microbios resistentes a tratamientos convencionales y específicos es cada vez más frecuente; por ello, en este proyecto de investigación se busca demostrar la conducta de *Origanum Vulgare*, *Thymus vulgaris* en forma de aceites esenciales y de *Caesalpinia spinosa* en forma de extracto como agentes antibacterianos.

La importancia de este proyecto consiste en instaurar parámetros antibacterianos sobre la eficacia de *Origanum Vulgare*, *Thymus vulgaris* como aceites esenciales y de *Caesalpinia spinosa* como extracto, respecto a meropenem, que es el tratamiento gold standard utilizado en el manejo de afecciones en el tracto urinario, meningitis neonatal, infecciones a nivel del tracto gastro intestinal, neumonías intrahospitalarias, infecciones óseas, colecistitis, afectación articular, peritonitis, etc., causadas por *E. coli* BLEE, convirtiéndose en una de las fuentes principales de bacteriemias. Los aceites esenciales se obtendrán de fuente primaria para la realización de este estudio, con ello, se demostrarán las propiedades antibacterianas tanto de los aceites como del extracto de estas tres plantas medicinales presentes en nuestra región.⁸

La hipótesis de investigación fue: *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* en forma de aceites esenciales y *Caesalpinia spinosa* en forma de extracto acuoso, tienen actividad antimicrobiana sobre *Echerichia coli* BLEE, frente a meropenem, en estudio in vitro.

Siendo el objetivo general: Evaluar la actividad antimicrobiana del *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* como aceites esenciales y *Caesalpinia spinosa* como extracto acuoso, frente a *Escherichia coli* BLEE contrastado con meropenem, en estudio in vitro.

Los objetivos específicos: Identificar la actividad antibacterial de *Origanum vulgare* en forma de aceite esencial al 100% sobre *Escherichia coli* BLEE; Identificar la actividad antibacterial de *Thymus vulgaris* en forma de

aceite esencial al 100% sobre *Escherichia coli BLEE*; Identificar la actividad antibacterial del *Caesalpinia spinosa* en forma de extracto acuoso preparado al 100% sobre *Escherichia coli BLEE*; e Identificar la actividad antibacterial de meropenem sobre *Escherichia coli BLEE*.

II. MARCO TEÓRICO

Gadisa E et al⁹ (EE. UU. - 2019) estudiaron el efecto microbicida combinado entre un grupo de óleos esenciales obtenidos de distintas plantas, entre ellas *Thymus vulgaris* contra bacterias resistentes a múltiples fármacos (MDR) como: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *S. aureus* resistente a la metilcilina. El método utilizado fue la microdilución en caldo. El resultado fue que al combinar *B.cuspidata* y *T.schimperi* como aceites esenciales, consiguieron un halo inhibitorio entre 20 mm, el estimado de MIC es de $4 \pm 3 \mu / \text{ml}$ y MBC ($7 \pm 6 \mu \text{l} / \text{ml}$) sobre *E. Coli*, aunque la susceptibilidad de las bacterias gram negativas eran un poco menos que las bacterias gram positivas.

Benameur Q et al⁶ (España - 2018) en su investigación evidenciaron la susceptibilidad de BLEE *Enterobacteriaceae* frente *Thymus vulgaris* como aceite esencial (TVEO) y luego cefotaxima en combinación con TVEO. Dicha actividad antibacteriana fue investigada por métodos estándar. La interacción sinérgica fue determinada por la prueba de tablero de ajedrez. Timol (34.5%), p-cimeno (22.27%) y linalol (5,35%) fueron los componentes principales presentes en TVEO. Las cepas identificadas fueron resistentes a múltiples fármacos (MDR). TVEO mostró alta actividad contra todas las cepas de MDR con zonas de inhibición y valores MIC de 22 mm / 10 μ L Bey $7 \pm 3 \mu\text{g} / \text{mL}$, respectivamente. TVEO en combinación con CTX mostró una acción sinérgica contra *E. Coli BLEE*.

Sakkas et al¹⁰ (EE. UU. - 2016) en su estudio investigó el efecto antibacterial propio de diferentes plantas frente a bacterias Gram negativas MDR, resaltando *Origanum vulgare*. El cual demostró su fuerte actividad antibacteriana, sin embargo. Se halló que su efecto antibiótico varía según el

origen de la cepa (silvestre, de preferencia, sensible a medicamentos o resistente) midiéndose un halo de inhibición de 30mm. Se debe tener en cuenta siempre el potencial de los metabolitos activos de los vegetales para el desarrollo nuevos antimicrobianos.

Hongbin S¹¹ (EE. UU. - 2008) estudiaron la actividad antibacterial del *Origanum vulgare* como aceite esencial, sólo y sumado a otro fármaco, obteniendo como resultado que el óleo posee actividad antibacterial respecto a *E. coli* BLEE con una MIC de 2 y asociado a kanamicina su índice de concentración inhibitoria fue de 1.5. Se encontró además que posee actividad antibacterial *contra E. Coli* BLEE mostrando un halo de inhibición de 17mm, sin embargo, su asociación con otros antibióticos permite mayor sinergia y reduce en gran medida la dosis efectiva de los antibióticos, minimizando los efectos secundarios.

Cholán K⁷ (Perú - 2018) investigó el poder antimicrobial de *Caesalpinia spinosa* “taya” en forma de extracto etanólico al inhibir proliferación de *Salmonella typhi* y *Escherichia coli* en condiciones de laboratorio usando un diseño en bloques al azar. Para la evaluación de dicho efecto, se hizo uso del método de Kirby Bauer modificado, inoculando 50 uL de extracto con diferentes concentraciones. Se realizó el trabajo con apoyo de un control positivo. Como resultado se logró determinar que mientras mayor sea la concentración del extracto etanólico, hay eficiente inhibición de crecimiento. *E. coli* presentó un diámetro de inhibición 19.77mm, lo que evidencia que taya, como extracto, posee actividad antibacterial respecto a *E. coli*.

Zárate M¹² (Perú - 2014) evaluó la capacidad antimicrobiana de *C. spinosa* a través de su extracto etanólico frente a *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli*, cuyas cepas fueron obtenidas de un hospital nivel 3 en Trujillo. En este trabajo experimental, analizaron los urocultivos de ochenta pacientes diagnosticados con infección urinaria cuyo agente aislado fue *Escherichia coli*, teniendo como resultado que el extracto, en comparación con amoxicilina, resultó tener sensibilidad mayor y en comparación con cotrimoxazol, no se

observaron diferencias. Cuando se comparó con gentamicina, se obtuvo efecto similar, sin embargo, menor actividad respecto a ciprofloxacino, concluyendo que el extracto posee actividad antibacterial frente a *E. coli* con un halo de inhibición de 18.95mm, en estudio in vitro.

Shenoy S¹³ (Perú - 2014) evaluó la actividad antimicrobiana de diferentes aceites entre los que se encuentra el aceite de *Origanum vulgare* extraído comercialmente y los patógenos nosocomiales resistentes a múltiples fármacos dentro de los cuales se encuentra *E. Coli*. Entre los resultados se demostró que dicho óleo llegó a mostrar acción antibacterial importante e incluso mayor que las otras plantas con un MIC de 0.048 y halo de inhibición de 22.17±0.75mm, concluyendo así que posee efecto antibacteriano, además, con los estudios adecuados, estos pueden suponer una disminución del uso de los antibióticos actuales.

La automedicación ha ayudado en gran proporción a que las bacterias tengan la capacidad de desarrollar resistencia para poder contrarrestar los mecanismos por los cuales los antibióticos son efectivos. Por ello, es un problema latente y que aumenta exponencialmente a nivel mundial, provocando que los tratamientos convencionales fallen.¹⁴

La Organización Mundial de la Salud (OMS), recalca que los microorganismos han aumentado su capacidad para resistir al tratamiento convencional, lo que ha resultado en un problema grave de salud pública mundialmente. Si se quiere preservar la vida humana y animal, las intervenciones políticas y la colaboración global son vitales para corregir nuestro entendimiento acerca de la dinámica de la resistencia bacteriana e informar estrategias de contención y mitigación.¹⁵

Se menciona especialmente que el mecanismo por el cual los aceites esenciales y sus compuestos volátiles son efectivos, es gracias a que inhiben las bombas de flujo de salida, con esto, se invierte la resistencia a los medicamentos en bacterias gram negativas.¹⁶

Los aceites esenciales y extractos tanto acuosos como etanólicos han ido ganando terreno y siendo tema de interés por sus propiedades antibacterianas, antivirales e incluso antitumorales, refieren que han demostrado tener mejor efecto y especificidad como antibacteriano, superando incluso a las terapias gold standard.¹⁷

Origanum vulgare L., conocida como orégano, está compuesto por carvacrol, borneol, terpineol, timol y cimeno, también se pueden encontrar ácidos fenólicos, flavonoides, taninos y minerales que se obtienen al utilizar las partes floridas del *Origanum Vulgare*.^{18,19}

La fuerte actividad antibacteriana y el amplio espectro de acción que poseen es lo que se le reconoce como características propias del *Origanum vulgare*, además de sus efectos antiinflamatorios y antioxidantes. Se ha conseguido evidenciar que el óleo de *Origanum vulgare*, posee efecto antibacteriano *in vitro*. La forma de administración de este compuesto es vía oral y está contraindicado en gestantes e hipersensibilidad cualquiera de sus componentes, la que se puede manifestar como prurito, edema facial, disfagia, dificultad respiratoria y disfonía.^{20,21}

Thymus vulgaris, conocida como tomillo posee partes específicas donde se encuentran sus propiedades antibacterianas, son la flor y las hojas, las cuales servirán para obtener el aceite esencial.²²

Está compuesto químicamente por monoterpenos, monoterpenoles, esteres terpénicos; fenoles: timol, carvacrol, componentes que le otorgan propiedades farmacológicas como estimulante de la corteza suprarrenal: inmunoestimulante, antiinflamatorio, espasmolítico neurótropo: parasimpaticolítico (por el timol y carvacrol del aceite esencial) antiinfeccioso, antimicrobiano.^{23,24}

Caesalpinia spinosa, conocida como taya o tara. Hasta la actualidad se han llegado a aceptar 2 subgéneros: el primero es subgrupo *Caesalpinia* L. el cual

crece en oriente, quienes se han Diferenciado por su fruto no alado y el segundo viene a ser subgrupo *Mezoneuron* que se encuentran únicamente racionadas en Europa occidental y de frutos alados. El género *Caesalpinia* comprende especies que vienen a ser árboles, considerados trepadores. La flor tiene hojas en forma de cáliz, montados y caedizos.^{25,26,27,28}

El meropenem, perteneciente a la familia de los carbapenems, tiene un gran espectro de acción, efecto y capacidad para resistir a las β -lactamasas. Por todo lo antes mencionado, es indispensable para el manejo empírico de múltiples infecciones graves ya sean nosocomiales o incluso algunas de origen comunitario que son provocadas por bacterias gram negativas multirresistentes.²⁹

Su farmacodinamia le permite interrumpir la formación e integración de la pared celular, así es como promueve la lisis bacteriana, teniendo efecto bactericida. Dicha interrupción se lleva a cabo durante la tercera y la última fase de la síntesis, al mezclar en parejas a las "proteínas fijadoras específicas de las penicilinas" (PBPs, Penicillin-Binding-Proteins). El valor de estas proteínas se debe a que son indispensables para la formación de la pared celular.³⁰

Este antibiótico, tiene propiedad anfótera, ya que puede atravesar con mucha facilidad la membrana celular que es donde se une a varios tipos de proteínas fijadoras de penicilinas teniendo gran afinidad orientado a las de tipo PBP-2 y PBP-3. Asimismo, el meropenem también posee gran afinidad por las PBP-1a y PBP-1b que son proteínas que le brindan sostén a la pared bacteriana y al unirse a estas, genera rápidamente un proceso conocido como lisis bacteriana, por activación de autolisinas, que son enzimas proteolíticas propias de la bacteria. Se desconoce el mecanismo exacto para que se lleve a cabo activación enzimática, los antibióticos beta- lactámicos generan un obstáculo con un inhibidor de las autolisinas. El meropenem es capaz de soportar la acción de las beta-lactamasas.³¹

Tiene una gran distribución tisular, incluso llega hasta el líquido cefalorraquídeo. La dosis en la que se logra su efecto antibiótico es de 1g cada 8 horas. Se reportaron cuadros convulsivos y otras reacciones con afección del sistema nervioso central en personas sometidas a tratamiento con meropenem.³²

III. METODOLOGÍA

31. Tipo y diseño de investigación

Aplicada, Experimental puro.³³

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

Dónde:

G1: *Origanum vulgare* como aceite esencial preparado al 100%.

G2: *Thymus vulgaris* como aceite esencial preparado al 100%.

G3: *Caesalpinia spinosa* como extracto acuoso preparado al 100%.

G4: Control positivo con Meropenem 10 µg.

G5: Control negativo con agua destilada.

32. Variables y operacionalización:

Variable independiente: Agente antibacteriano

No farmacológico:

A. *Origanum vulgare*
(orégano)

B. *Thymus vulgaris*
(tomillo)

C. *Caesalpinia spinosa*
(tara)

Farmacológico:

– Meropenem 10 µg

Variable dependiente: Efecto antibacteriano

- ✓ Eficaz
- ✓ No eficaz

Operacionalización de variables: (Ver Anexo 1)

33. Población, muestra.

Población: Estuvo conformada por cepas de *E. coli* BLEE

Criterios de selección: Criterios de inclusión:

1. Placas cuyas cepas de *Escherichia coli* BLEE sean viables.
2. Cepas cultivadas entre 18 y 24 horas.

Criterios de exclusión:

1. Placas que contengan cepas contaminadas.
2. Placas que no muestren evidencia de crecimiento del cultivo.

Tamaño muestra:

Para calcular la muestra con la que se trabajó, se utilizó la fórmula de diferencia de medias concerniente a los halos de inhibición para computar la cifra de repeticiones por cada conjunto de experimentación³⁶.

$$n = \frac{(Z \alpha/2 + Z\beta)^2 2S^2}{(X1 - X2)^2}$$

Siendo:

n = Total de placas utilizadas

Z $\alpha/2$ = 1.96.

Z β = 0.84.

δ = 3 (desviación estándar)

X1 = 16 mm. (medida del halo inhibitorio del meropenem)³⁷.

X2 = 25 mm. (medida del halo inhibitorio de *Caesalpinia spinosa*)⁷.

n= 10 placas por cada uno de los grupos a trabajar

Muestreo: Se escogió a través de la técnica de muestreo aleatorio simple para cada grupo de observación

Unidad de análisis: Representada por cada cultivo de las cepas de *Escherichia coli* BLEE

34. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validación y confiabilidad.

- ✓ Se utilizó la técnica de observación de manera directa sobre la inhibición de la proliferación de las colonias de *E. coli* BLEE.
- ✓ El instrumento utilizado fue una ficha, que sirvió para recoger los datos necesarios en este proyecto de investigación, la misma que contó con la información de los principios activos evaluados. (Anexo 2)

35. Procedimiento:

Se realizó teniendo en cuenta las normas de bioseguridad.³⁸ (Anexo 4)

- a. Los aceites esenciales de *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* fueron obtenidos de manera comercial de la empresa Ekala debido a la coyuntura actual. Por lo tanto, contaron con la certificación respectiva garantizando así que las plantas utilizadas y el proceso por el cual se obtuvieron los aceites fueron los adecuados para su utilización en el presente estudio. (Anexo 5 y 6)

Respecto al extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa* conocido también como extracto crudo se obtuvo a través del machacado del vegetal, el cual se colocó en un mortero previamente esterilizado donde se machacó la muestra vegetal, adicionalmente se añadió agua destilada estéril mezclándose todo el contenido. Luego dicha mezcla fue filtrada a través de papel de celulosa para ser recogido en un vaso de precipitación. Este filtrado se esterilizó en filtros bacteriológicos, recolectado en frascos de vidrio pequeños previamente esterilizados y sellados con tapa de goma y se mantuvieron conservados a temperatura ambiente. (Anexo7)

- b. El agar para el cultivo de *Escherichia coli* BLEE fue Mueller-Hinton. Se incubó a temperatura de 37 grados centígrados por 18 a 20 horas, en estufa. Se prepararon cultivos para 10 placas petri, los cuales se esterilizaron en sistema sometido a presión interna, a 121 grados centígrados durante 15 minutos. Luego, fue colocado en las placas Petri previamente esterilizadas y se puso en reposo hasta que el contenido sea completamente sólido.

El inóculo se hizo vertiendo suero fisiológico dentro del tubo de ensayo previamente esterilizado, además se agregó una muestra del *E. coli* BLEE previamente cultivado, de manera que el contenido se torne turbio.

c. La determinación del efecto antibacterial se realizó mediante el método de Kirby – Bauer:

- Se sembró *Escherichia coli*, utilizando un hisopo estéril con el que se tomó una parte del inóculo y fue aplicado encima de la superficie sólida del preparado en las placas petri; de manera que la bacteria cubrió como una pequeña lámina en la superficie del cultivo.
- Luego se mojó el papel filtro con los preparados obtenidos de las plantas
- El papel filtro N° 1, fue humedecido con 5 µl de *Origanum vulgare* como aceite esencial.
- El papel filtro N° 2, fue humedecido con 5 µl de *Thymus vulgaris* en forma de aceite esencial.
- El papel filtro N° 3, fue humedecido con 5 µl de *Caesalpinia spinosa* en forma de extracto acuoso.
- El papel filtro N° 4, fue humedecido con 5 µl de agua destilada.
- Para el control positivo se utilizaron discos de sensibilidad con 10 ug de meropenem.

Se colocó por un periodo de 15 minutos en reposo, luego, de forma invertida, las placas se incubaron en la estufa a temperatura de 37 grados centígrados por 24 horas.

Luego se realizó la lectura utilizando la observación y las medidas del diámetro del halo inhibitorio se tomaron con una regla especial (Vernier). Con las medidas previas, se pudo interpretar si existe resistencia o sensibilidad, de acuerdo a lo estipulado en el Estándar M100 del CLSI. (Anexo 8)

36. Métodos de análisis de datos:

La estadística descriptiva fue aplicada en el presente proyecto para analizar la información. Ello implicó utilizar medidas de tendencia central y de dispersión las cuales son el promedio y desviación estándar respectivamente, con la finalidad de describir el halo de inhibición en cada uno de los tratamientos; así mismo se utilizó las tablas estadísticas para comparar los tratamientos que resulten ser eficaces o no. Del mismo modo la estadística inferencial se aplicó para la demostración de la hipótesis, para ello, se analizaron la normalidad y homogeneidad de varianzas, comprobando que la información obtenida posee comportamiento normal y sus varianzas son uniformes, se realizaron pruebas estadísticas para analizar la varianza (ANOVA), cuyo fin es evaluar si existen diferencias reveladoras respecto a las medias y varianzas de los halos de inhibición, encontrados en cada tratamiento. El análisis post hoc de Tukey permitió identificar el mejor tratamiento comparando las concentraciones mínimas que inhiban el crecimiento bacteriano tanto *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* en forma de aceites esenciales y *Caesalpinia spinosa* en forma de extracto acuoso, como la de meropenem sobre *Escherichia coli* BLEE.³⁶ (Anexo 3)

37. Aspectos éticos

Para llevar a cabo la realización del presente proyecto, se respetó lo estipulado en el artículo 86 de la sexta sección del Código de Ética Del Colegio Médico Del Perú: “De la docencia e investigación” donde se especifica que alterar los datos que se obtengan en el marco de investigaciones médicas, atenta contra la ética. Por ello, se declara que en el presente proyecto se realizaron procedimientos cuyas variables no fueron alteradas para obtener resultados deseados por el investigador y de esa manera garantizar la confiabilidad del estudio.³⁸

Respecto a la obtención de las plantas, en la Ley Forestal y de fauna silvestre, en su título preliminar, artículo II, inciso 10, menciona que la obtención de patrimonio forestal debe ser de origen legal. Por ello se admite que la obtención de las plantas a utilizadas en el presente trabajo de investigación, cumplen con lo estipulado en la ley antes mencionada.

IV. RESULTADOS

Tabla 1: Promedios de halos de inhibición de aceites esenciales de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* y extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa* comparado con meropenem

Tratamiento	N	Med	Desviación	Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
		(mm)	Estándar		Límite inferior	Límite superior		
<i>Thymus vulgaris</i>	10	22,60	1,647	,521	21,42	23,78	20	25
<i>Origanum vulgare</i>	10	25,70	1,703	,539	24,48	26,92	22	28
<i>Caesalpinia spinosa</i>	10	20,50	,972	,307	19,80	21,20	19	22
Meropenem	10	23,90	,568	,180	23,49	24,31	23	25

De la tabla 1, se puede apreciar en las mediciones medias de halo inhibitorio de *Escherichia coli* BLEE, obtenido por el aceite de *Thymus vulgaris* fue de 22.60 mm con una variabilidad de ± 1.647 mm, siendo el valor mínimo de 20 mm y el máximo de 25 mm; En la aplicación aceite de *Origanum vulgare* se obtuvo un halo medio de 25.70 mm con una variabilidad de ± 1.703 mm; siendo el valor mínimo obtenido con el aceite de *Origanum vulgare* de 22 mm y el máximo de 28 mm, evidenciándose que es el halo medio más alto respecto a los demás tratamientos; Para el caso de la *Caesalpinia spinosa* se obtuvo un halo medio de 20.50 mm con una variabilidad de ± 0.972 mm y sus valores se encuentran entre 19 y 22 mm . Finalmente, para el tratamiento farmacológico del Meropenem 10 mcg; se obtuvo un halo medio de inhibición de 23.90 mm con una variabilidad de ± 0.568 mm

TABLA 2: Comparación de los halos de inhibición de aceites esenciales de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa* y meropenem mediante la prueba de ANOVA

	Suma de cuadrados	Grado de libertad	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	143,875	3	47,958	27,892	,000
Dentro de grupos	61,900	36	1,719		
Total	205,775	39			

De la tabla 2, se puede apreciar en el análisis de varianza obtenido en los tratamientos que, si existe diferencias significativas ($p < 0.05$), con un valor de significancia de ,000 en los halos inhibitorios de cada uno de los tratamientos de aceites esenciales, extracto acuoso y el meropenem sobre *Escherichia coli* BLEE

Tabla 3: Subconjuntos homogéneos de los halos de inhibición de aceites esenciales de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa* y meropenem mediante la prueba de Tukey

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
<i>Caesalpinia spinosa</i>	10	20,50		
<i>Thymus vulgaris</i>	10		22,60	
<i>Meropenem</i>	10		23,90	
<i>Origanum vulgare</i>	10			25,70
Sig.		1,000	,138	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,000.

En la tabla 3, se puede evidenciar que los valores obtenidos de los promedios de los halos de inhibición de *Thymus vulgaris* y meropenem son similares por lo que su eficacia sería equivalente a la de Meropenem, sin embargo, el aceite de *Origanum vulgare* posee el promedio más alto con un promedio de 25.70 mm. Así mismo la prueba post ANOVA de Tukey nos evidencia que difiere de los demás tratamientos significativamente.

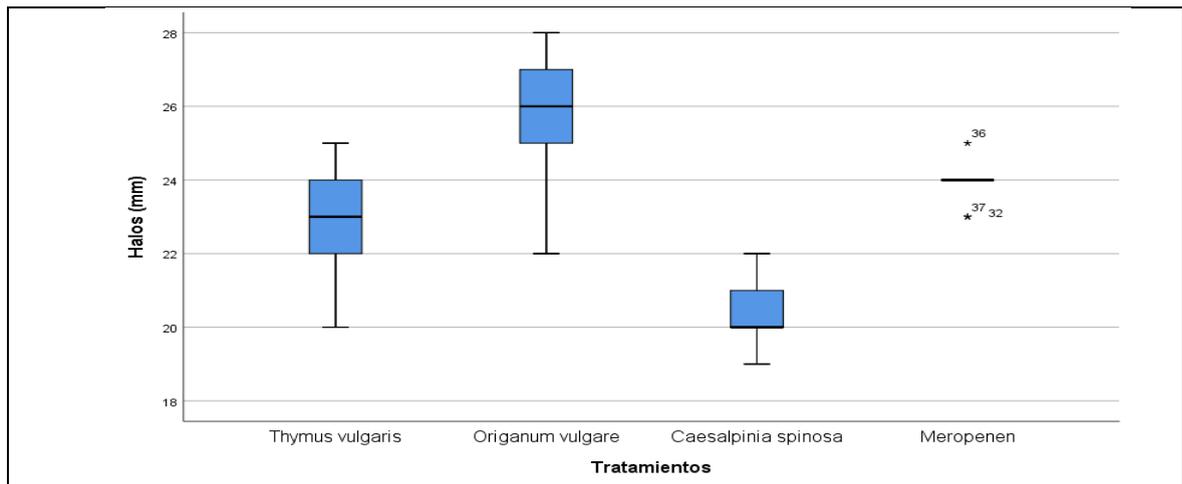


Figura 1: Comparación de medias de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa* y meropenem

De la Figura 1, se puede apreciar que en las mediciones medias de halo inhibitorio sobre *Escherichia coli* BLEE más alto se dió en la aplicación del aceite de *Origanum vulgare* con halo medio de 25.70 mm, verificándose además que para el tratamiento farmacológico el halo inhibitorio está por debajo del valor obtenido en el aceite de *Origanum vulgare*.

V. DISCUSIÓN

Los hallazgos acerca de las propiedades medicinales de las plantas han dado pie a que actualmente el uso de estas sea mucho más frecuente. Esto se respalda en numerosos ensayos farmacológicos los cuales sustentan su empleo en determinadas circunstancias. *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* y *Caesalpinia spinosa*, se usan por la población en forma empírica, así como en estudios científicos experimentales que demuestran su eficacia como agente antibacteriano.

El presente trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana que poseen que los aceites esenciales de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* y extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa* (Todos a concentraciones al 100%) frente a *Escherichia coli* BLEE, contrastado con meropenem (10ug), en estudio in vitro.

En la tabla 1 se observa que los valores promedios de los halos de inhibición obtenidos para *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Caesalpinia spinosa* (al 100%) y meropenem (10ug) son 25.70 mm, 22.60 mm, 20.50 mm y 23.90 mm respectivamente, demostrando que todos los tratamientos aplicados en el presente trabajo poseen eficacia antibacteriana sobre *E. coli* BLEE, in vitro, ya que el diámetro mínimo establecido por CLSI para que el tratamiento sea considerado eficaz respecto a dicha bacteria es de 16 mm.

En la tabla 2 al aplicar la prueba de ANOVA para la comparación de promedios de los halos de inhibición obtenidos con los tratamientos de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Caesalpinia spinosa* y meropenem sobre *E. coli*. BLEE, se encuentra diferencia altamente significativa con un valor de significancia de ,000. Esto demuestra que los tratamientos aplicados tienen alta probabilidad de ser efectivos sobre el crecimiento de dicha bacteria, in vitro.

En la tabla 3, donde se colocan en subconjuntos las medias de los tratamientos aplicados, se observa que el mejor tratamiento es *Origanum vulgare* ya que cuenta con mayor eficacia antibacteriana con un halo

promedio de 25.70 mm siendo incluso mayor que el tratamiento gold standard (meropenem) el cual se encuentra con un halo promedio similar al de *Thymus vulgaris*, 23.90mm y 22.60mm respectivamente, lo que demuestra que poseen similar eficacia antibacteriana. Y el tratamiento con menor eficacia antibacteriana es *Caesalpinia Spinosa*, con un halo promedio de 20.50mm.

En la figura 1 se puede observar con mayor claridad que *Origanum vulgare* posee la mayor eficacia antibacteriana de tal manera que el límite inferior de dicha planta es superior a la media de meropenem, lo que demuestra que hay diferencia ampliamente significativa respecto a los otros tratamientos utilizados en este proyecto. (Anexo 9)

Diversas investigaciones demostraron que *Origanum vulgare* tiene eficacia antibacteriana. Por ejemplo: Sakkas et al¹⁰ encontró un halo de inhibición de 30mm, Hongbin S¹¹ encontró un halo inhibitorio de 17mm, y por último Shenoy S¹³ encontró un halo inhibitorio de 22.17mm, resultados que, al compararlos con el presente proyecto, concuerdan en que la planta antes mencionada posee eficacia antibacteriana sobre *E. coli BLEE* según el valor dado por CLSI.

La diferencia es que en el primer trabajo se refleja un mayor halo inhibitorio respecto al encontrado en el presente trabajo porque el estudio se realizó sobre *E. coli* y otras bacterias de menor resistencia. El estudio realizado por Hongbin S revela un halo mucho menor al encontrado en el presente proyecto, en ambos se utilizó la misma bacteria, pero hay que tener en cuenta la pureza de la planta y la obtención y cuidado del aceite esencial. En el último estudio mencionado, se encuentra un halo inhibitorio que es el más cercano de los 3 al encontrado en el presente trabajo, pero sigue siendo menor, esto se explicaría a la pureza de la planta, ya que la utilizada en el presente proyecto es una planta 100% pura a diferencia de la utilizada por Shenoy S.

La actividad antibacteriana de *Origanum vulgare* se debe a que posee como principales metabolitos activos al carvacol y timol los cuales al ser lipofílicos penetran con facilidad la bicapa fosfolipídica bacteriana alterando la síntesis de ácidos grasos y uniéndose a proteínas de la membrana impidiendo el funcionamiento normal, lo que permite generar inestabilidad en el interior del microorganismo al aumentar su permeabilidad. Este mecanismo le permite tener una gran actividad antibacteriana frente a bacterias resistentes como *E. coli* BLEE.^{10,11,13}

Respecto a los estudios aplicados para demostrar la eficacia antibacteriana de *Thymus vulgaris* tenemos a Gadisa E et al⁹ donde encontró un halo inhibitorio de 20mm y Benameur Q et al⁶ encontrando un halo inhibitorio de 22mm, resultados que al compararlo con el obtenido en el presente trabajo no existe mucha diferencia, por lo que se respalda el resultado encontrado.

Las mínimas diferencias pueden deberse al origen de la planta de la cual se obtuvo el aceite, puesto que mientras más pura, más concentración de metabolitos activos, los cuales son el timol y el cimeno que al ser terpenos, poseen gran actividad antibacteriana por su fácil difusión a través de la pared de la bacteria y su fuerte actividad inhibitoria sobre enzimas, síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, dando como resultado una inhibición en serie de una vía común y la muerte de la bacteria.^{6,9}

Por otro lado, algunos estudios que demuestran la eficacia antibacteriana de *Caesalpinia spinosa* son Cholán K⁷ quien encontró un halo inhibitorio de 19.77 mm y Zárate M¹² quien encontró un halo inhibitorio de 20.95mm, que al compararlo con el resultado obtenido en el presente trabajo no hay diferencia significativa y se explica por la procedencia de la planta y los cuidados del extracto acuoso.

El efecto antibacteriano de *Caesalpinia spinosa* se debe a que tiene como metabolito activo al ácido gálico, el cual es un tanino que tiene la propiedad de inhibir la actividad enzimática bacteriana, generando desnaturalización de las proteínas de membrana, además puede quelar el hierro y el cobre disminuyendo la actividad metalo-enzimática de la bacteria.^{7,12}

VI. CONCLUSIONES

1. *Origanum vulgare*, a concentración de 100%, posee eficacia antibacteriana sobre *E. coli BLEE*, en estudio in vitro.
2. *Thymus vulgaris*, a concentración al 100%, posee eficacia antibacteriana sobre *E. coli BLEE*, en estudio in vitro.
3. *Caesalpinia spinosa*, a concentración del 100%, posee eficacia antibacteriana sobre *E. coli BLEE*, in vitro.
4. El tratamiento con mayor eficacia antibacteriana es *Origanum vulgare*, seguido por meropenem y *Thymus vulgaris*, los cuales poseen eficacia antibacteriana similar y por último *Caesalpinia espinosa*, la cual demostró tener la menor eficacia antibacteriana.

VII. RECOMENDACIONES

- Respaldar la ejecución de estudios en los cuales se determine la eficacia antibacteriana de las plantas utilizadas en el estudio a diferentes concentraciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Echevarria J, Resistencia bacteriana. Rev Med Hered [revista en internet] 1998 abril-junio [acceso 20 de febrero de 2020]; 9(2) Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X1998000200002
2. García A, García E, Hernández A, Ruiz J, Yagüe G, Herrero J, Gómez J, et al, Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. Rev. Esp Quimioter. [revista en internet] 2011 [acceso 20 de febrero de 2020]; 24(2): [57-66] Disponible en: <https://seq.es/seq/0214-3429/24/2/garcia.pdf>
3. Adrianzén D, Arbizu A, Ortiz J, Samalvides F, Mortalidad por bacteriemia causada por *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. Productoras de betalactamasas de espectro extendido: cohorte retrospectiva en un hospital de Lima, Perú. Rev Perú Med Exp Salud Pública [revista en internet] 2013, enero [acceso 20 de febrero de 2020] 30(1) [18-25] Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342013000100004
4. Yábar M, Curi B, Torres C, Calderón R, Riveros M, Ochoa T, et al, Multirresistencia y factores asociados a la presencia de betalactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* provenientes de urocultivos. Rev Perú Med Exp Salud Pública [revista en internet] 2017 octubre-Diciembre [acceso 20 de febrero de 2020] 34(4): [660-665] Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342017000400012
5. Coelho A, Cavalcanti B, Santos L, Lima E, Antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) against bacterial, multiresistant strains isolated from nosocomial patients. Rev Bras Farmacogn [revista en internet] 2009 Enero-Marzo [acceso 20 de febrero de 2020] 19(1B):[236-241] Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-95X2009000200010

6. Benameur Q, Gervasi T, Pellizzeri V, Pl'uchtová M, Tali-Maama H, Assaous F, Guettou B, Rahal K, Gruřová D, Dugo G, Marino A, Ben-Mahdi MH, et al, Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with cefotaxime against ESBL producing multidrug resistant Enterobacteriaceae isolates, *Nat Prod Res* 2019; 33(18): 2647-2654.
7. Cholán K, Efecto del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* "taya" sobre el crecimiento de *Salmonella Typhi* y *Escherichia coli* en condiciones de laboratorio. Tesis [Para obtener el grado académico de maestra en ciencias] Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo. 2018.
8. Fernández L, *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), un problema creciente en nuestros pacientes. *Revista Med. Hered.* 2017; 28 (1):139-141.
9. Gadisa E, Combined antibacterial effect of essential oils from three most commonly used Ethiopian traditional medicinal plants on multidrug resistant bacteria. *BMC Complement Altern Med* [revista en internet] 2019 enero [acceso 20 de febrero de 2020] 19(24): [3-9] Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6339401/pdf/12906_2019_Article_2429.pdf.
10. Sakkas H, Gousia P, Economou V, Sakkas V, Petsios S, Papadopoulou C, In vitro antimicrobial activity of five essential oils on multidrug resistant Gram-negative clinical isolates". *J Intercult Ethnopharmacol*, 2016; 5(3): 212-218.
11. Hongbin S, Jinqiang H, Zhichang L, Zhen-ling Z. Antibacterial effect of *Origanum Vulgare* essential oil alone and in combination with antibiotics against extended- spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008; 53(2): 190-194.
12. Zárate M, Efecto in vitro antibacteriano del extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa* "Tara" sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* y *escherichia coli* aisladas de pacientes del Hospital Regional Docente de Trujillo en el año 2014. Tesis [Para Obtener El Título De Médico Cirujano]. Trujillo: Universidad Privada Antenor Orrego.2014.
13. Shenoy S, Veena A, Bhat V, Comparative evaluation of antimicrobial activity of the essential plant oils on multidrug resistant nosocomial pathogens. *IJPCBS.*

2014; 4(2): 372-377.

14. Shaik S, Fatima J, Shakil S.Mohd S, Rizvi D, Kamal M, Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. Saudi J Biol Sci 2015; 22(1): 90–101.
15. World Health Organization. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) report: early implementation 2017-2018. Geneva: World Health Organization; 2017;8(1): 2-244.
16. Aelenei P, Miron A, Trifan A, Bujor A, Guille E, Aprotosoiaie C, Essential Oils and Their Components as Modulators of Antibiotic Activity against Gram-Negative Bacteria. MEDICINES (Basel) 2016; 3(3):19.
17. Saad N, Muller C, Lobstein A, Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. Rev Flav Frag Jour 2013; 28(1):269-279.
18. Muñoz L, Plantas Medicinales Españolas: Origanum Vulgare L. (Lamiaceae)(Origanum Vulgare). Acta de 27. ° Botánica Malacitana; 2001 octubre 274-279. España: Salamanca; 2002.4
19. Revista Alan [Publicación en línea] 2004. Diciembre [Citada: 2019 octubre 18]; 54(1): [Aproximadamente 22 pp]. Disponible en: http://sOriganumVulgare.com/wp-content/uploads/2017/02/El-organo_-propiedade.pdf.
20. López N, Grijalva E, Olivo G, Heredia B, Essential Oils of Origanum Vulgare: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties. Molecules 2017; 22(1):989.
21. García E, Castro F, Gutiérrez A, García S, Revisión de la producción, composición fitoquímica y propiedades nutraceuticas del Origanum Vulgare mexicano. Rev Mex Cien Agr 2012; 3(2): 339-353.
22. Armas J, Ortiz J, Jáuregui J, Ruiz J. Almonacid R, Aceite esencial de Thymus Vulgaris L (Thymus vulgaris), su combinación con EDTA contra Cándida albicans y formulación de una crema. Revista scielo, 2015; 76(3): [40-235] Disponible en: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/11230>
23. Lopez T. Thymus vulgaris Propiedades Farmacológicas e indicaciones terapéuticas. Offarm, 2006; 25(1): 1-4.
24. Rovetto G, Moreno N, Bolívar V, Calvo S, Suárez G, Justiniano C, Aplicaciones medicinales del Thymus vulgaris . Ucebol, 2009; 1(1): 1-5.

25. Bonilla H, López A, Carbajal Y, Siles M. Análisis de variables morfométricas de frutos de “tara” provenientes de Yauyos y Ayacucho para identificar caracteres agromorfológicos de interés. *Sci. Agropecu* 2016; 7(3): 157-165.
26. Vigo E, Quiroz V, Manual El cultivo de *Caesalpinia spinosa* en Cajamarca [en línea] 1° ed. Perú: Lima; 2006 [Citada: 2019 octubre 18]. Disponible en: http://www.agrolalibertad.gob.pe/sites/default/files/Manual_El_cultivo_de_tara_en_Cajamarca.pdf
27. Montenegro A, Actividad Antibacteriana de *Caesalpinia spinosa* (Taya) sobre *Porphyromonas Gingivalis* [Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
28. Bussmann R, y Sharon D, Plantas medicinales de los Andes y la Amazonía – La flora mágica y medicinal del Norte del Perú. *Revista Ethnobotany Reseach & Applications*, 2016; 15(1): 7-240.
29. Arias J, Bustamante S, Ortiz V, Moya M, Comparación de la actividad antimicrobiana de meropenem genérico y meropenem innovador por la técnica de micro dilución en cepas resistentes. *Revista Cubana de Farmacia*, 2015; 49(4): 651- 663.
30. Sociedad Española de Medicina Interna. Protocolo Tratamiento Antimicrobiano Domiciliario Endovenoso (TADE): SEMI; 2008: 32-421.
31. Chingaté J, Riaño A, Reacciones adversas a medicamentos (RAM) y problemas relacionados con medicamentos (PRM) por carbapenems reportados al Programa Distrital de Farmacovigilancia en la ciudad de

- Bogotá D.C durante el periodo 2012- 2017 [Trabajo de Grado para optar al Título de Químico Farmacéutico]. Bogotá D.C: Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (U.D.C.A); 2018.
32. Azanza J, Manubens A, Urdaneta M, Gómez A, Meropenem: Aspectos Farmacocinéticos/Farmacodinámicos y Seguridad. Revista Española Quimioter, 2010; 23(2): 18-24.
 33. Sampieri H, Fernandez C, Baptista P, Metodología de la investigación. Vol.1. 6ta. Ed. México, D. F.: McGraw-Hill; 2016.
 34. Leandro Barboza: Antibióticos [Internet]. [Consultado 24 Sept 2019]. Disponible en: http://www.farmacocin.com.uy/images/atb_parteras.pdf
 35. Katzung B, Trevor A, Farmacología Básica y Clínica. Ed. 13. Mexico, DF: Mc Graw Hill; 2016. Pag 776-779. Citado: 17\07\2018. Disponible en: <https://www.worldcat.org/title/22edalyc22ogía-basica-y-clinica-13ª-ed/oclc/951593446>
 36. García J, Reading A, López J, Investigación educación Médica – Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. Perú, 2013; 2(8) [Citado 11 de octubre 2019]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/artículo.oa?id=349733226007>
 37. Ministerio de Salud, Manual de procedimientos para la prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de disco difusión. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2002. pag.15-21
 38. Organización Mundial de la Salud, Manual de bioseguridad en el Laboratorio. Organización Mundial de la Salud. 2005; 3: 7-142.
 39. Colegio Médico del Perú. Del Trabajo Médico. En: Colegio Médico del Perú. Código de ética y deontología. Lima; 2007. pag. 16 - 17.

ANEXOS

ANEXO 1 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
VI: Agente antibacteriano para cepas de E. Coli BLEE	<p>Se denomina así a la sustancia con propiedades que tengan la capacidad de eliminar agentes bacterianos o inhibir su crecimiento o proliferación sin dañar el objeto, ambiente u organismo que las posee.³⁴</p> <p>Agente antibacteriano no farmacológicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Origanum vulgare</i> ➤ <i>Thymus vulgaris</i> ➤ <i>Caesalpinia spinosa</i> <p>Agente antibacteriano farmacológico:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Meropenem 10 µg 	<p>PLANTA 1: El <i>Origanum vulgare</i> se diluirá al: 100%</p> <p>PLANTA2: El <i>Thymus vulgaris</i> se diluirá al: 100%</p> <p>PLANTA 3: La <i>Caesalpinia spinosa</i> se diluirá al: 100%</p> <p>Meropenem 10 µg</p> <p>Agua destilada</p>	<p>RG1</p> <p>RG2</p> <p>RG3</p> <p>RG4</p> <p>RG5</p>	<p>Cualitativa nominal</p>
VD: Efecto antibacteriano	<p>Se denomina así a la acción realizada por los aceites esenciales de <i>Origanum vulgare</i>, <i>Thymus vulgaris</i> y extracto acuoso de <i>Caesalpinia spinosa</i> sobre las bacterias a través de la eliminación (Bactericida) o al inhibir su desarrollo (Bacteriostático).³⁵</p>	<p>Se medirá mediante el halo de</p> <p>Tiene Efecto</p> <p>No tiene efecto</p>	<p>≥16mm</p> <p><16mm</p>	<p>Cualitativa nominal</p>

ANEXO 2

FICHA PARA RECOGER DATOS

N°	Halo Inhibitorio para <i>E. coli</i> BLEE (mm)				
	AEO	AET	EAT	Meropenem	Agua destilada
	100%	100%	100%		
1	22	26	20	24	0
2	25	22	20	23	0
3	23	28	20	24	0
4	24	24	21	24	0
5	22	26	19	24	0
6	20	27	20	25	0
7	23	27	22	23	0
8	24	25	21	24	0
9	20	26	20	24	0
10	23	26	22	24	0

AEO: Aceite esencial de *Origanum vulgare*.

AET: Aceite esencial de *Thymus vulgaris*

EAT: Extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa*

ANEXO 3

Pruebas de normalidad

Tratamientos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.	
Halos	<i>Thymus vulgaris</i>	,196	10	,200*	,919	10	,351
	<i>Origanum vulgare</i>	,270	10	,037	,904	10	,243
	<i>Caesalpinia spinosa</i>	,297	10	,013	,868	10	,095
	<i>Meropenen</i>	,370	10	,000	,752	10	,004

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de	Levene	gl1	gl2	Sig.	
Halos	Se basa en la media	2,864	3	36	,050
	Se basa en la mediana	1,755	3	36	,173
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1,755	3	27,215	,179
	Se basa en la media recortada	2,628	3	36	,065

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Halos

HSD Tukey

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Origanum vulgare</i>	-3,100*	,586	,000	-4,68	-1,52
	<i>Caesalpinia spinosa</i>	2,100*	,586	,005	,52	3,68
	<i>Meropenen</i>	-1,300	,586	,138	-2,88	,28
<i>Origanum vulgare</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	3,100*	,586	,000	1,52	4,68
	<i>Caesalpinia spinosa</i>	5,200*	,586	,000	3,62	6,78
	<i>Meropenen</i>	1,800*	,586	,020	,22	3,38
<i>Caesalpinia spinosa</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	-2,100*	,586	,005	-3,68	-,52
	<i>Origanum vulgare</i>	-5,200*	,586	,000	-6,78	-3,62
	<i>Meropenen</i>	-3,400*	,586	,000	-4,98	-1,82
<i>Meropenen</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	1,300	,586	,138	-,28	2,88
	<i>Origanum vulgare</i>	-1,800*	,586	,020	-3,38	-,22
	<i>Caesalpinia spinosa</i>	3,400*	,586	,000	1,82	4,98

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

ANEXO 4

**San José**
LABORATORIO CLÍNICO
Calidad y profesionalismo al servicio de tu salud

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO

El Laboratorio "San José" deja constancia que ha cedido *ad honorem* sus instalaciones, en donde KEVIN ARNOLD JARA RUBIO, estudiante de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, ejecutó la parte experimental de su proyecto de tesis titulado "Eficacia antibacteriana de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* y *Caesalpinia spinosa* sobre *Escherichia coli* BLEE comparado con meropenem", durante los días 14 al 18 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.


José Luis Calla Guerrero
BIÓLOGO - MICROBIÓLOGO
C.B.P. 8301

ANEXO 5

Certificación del aceite esencial *Thymus vulgaris*



CERTIFICADO DE ANALISIS

Aceite Esencial	Tomillo
Nombre Botánico	<i>Thymus vulgaris</i>
Código de Producto	PEO1157
CAS #	8007-46-3 ; 84929-51-1 ; 85085-75-2
FEMA #	3064
EINECS #	284-535-7 ; 285-397-0
Nombre INCI	Aceite Esencial de <i>Thymus vulgaris</i> Flores/Hojas
Lote #	11571911
Fecha de Destilación	Noviembre 2019
Fecha de Vencimiento	Octubre 2021
Parte de la planta	Hojas y flores
Método de Extracción	Arrastre de Vapor
Calidad	100% Puro y Natural
Nota Aromática	Nota Media/Alta

PROPIEDADES	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
Apariencia	Líquido de color amarillo pálido a marrón rojizo	Conforme
Olor	Aroma fresco,, dulce-herbáceo	Conforme
Índice de refracción	1.490 - 1.510 @ 20°C	1.500
Gravedad específica	0.906 - 0.937 @ 20°C	0.922
Rotación óptica	-6° to +4°	Conforme
Solubilidad	Soluble en alcoholes y aceites fijos; Insoluble en el agua	Conforme
Comentarios	Calidad aromática es excelente	

ANÁLISIS MICROBIAL	ESPECIFICACIONES	ESTANDARES	RESULTADOS
Cuento de Bacterias mesófilas aeróbicas	< 100 CFU/g	ISO 21149	Conforme
Levadura y moho	< 10 CFU/g	ISO 16212	Conforme
Candida albicans	AUSENTE / 1g	ISO 18416	Conforme
Escherichia coli	AUSENTE / 1g	ISO 21150	Conforme
Pseudomonas aeruginosa	AUSENTE / 1g	ISO 22717	Conforme
Staphylococcus aureus	AUSENTE / 1g	ISO 22718	Conforme

ES AROMATERAPIA EIRL – Calle Venecia 147, Dpto. 201, San Borja
Teléfono: 337-2290 Celular: 977 779 444
www.ekala.pe



PRUEBA DE METALES PESADOS	ESPECIFICACIONES	ESTANDARES	RESULTADOS
Piomo: Pb (mg/kg o ppm)	< 10 ppm	NA	Conforme
Arsenicp: As (mg/kg o ppm)	< 2 ppm	NA	Conforme
Mercurio: Hg (mg/kg o ppm)	< 1 ppm	NA	Conforme

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO:

Manténgalo en un recipiente bien cerrado en un lugar fresco y seco, protegido de la luz solar.

Noviembre 2019

Descargo de responsabilidad y precaución: Por favor, consulte toda la información técnica relevante específica del producto, antes de su uso. La información contenida en este se obtiene de fuentes actuales y fiables. Ethereal Ingredients (P) Ltd. proporciona la información contenida en este documento, pero no hace representación en cuanto a su amplitud o exactitud. Los individuos que reciben esta información deben ejercer su juicio independiente para determinar su idoneidad para un propósito particular. El usuario del producto es el único responsable del cumplimiento de todas las leyes y reglamentos aplicables al uso del producto, incluidos los derechos de propiedad intelectual de terceros. Dado que el uso o los usos ordinarios o de otro tipo de este producto están fuera del control de Ethereal Ingredients (P) Ltd, no se hace ninguna representación o garantía -expresada o implícita- en cuanto a los efectos de tal uso o usos, (incluyendo daños o de la lesión), o los resultados obtenidos. La responsabilidad de Ethereal Ingredients (P) Ltd. se limita al valor de los bienes y no incluye ninguna consecuencia pérdida. Ethereal Ingredients (P) Ltd. no será responsable de ningún error o retraso en el contenido, o de ninguna acción tomada en relación con el mismo. Ethereal Ingredients (P) Ltd. no será responsable de ningún daño resultante del uso o la confianza en esta información.

Como se trata de un documento generado electrónicamente, no se requiere de una firma

NOTA: ESTE CERTIFICADO ES UNA TRADUCCION LITERAL DEL CERTIFICADO ORIGINAL EMITIDO POR EL LABORATORIO

ES AROMATERAPIA EIRL – Calle Venecia 147, Dpto. 201, San Borja
Teléfono: 337-2290 Celular: 977 779 444
www.ekala.pe

ANEXO 6
Certificado del aceite esencial de *Origanum vulgare*



CERTIFICADO DE ANALISIS

Aceite Esencial	Orégano
Nombre Botánico	<i>Origanum vulgare</i>
Código de Producto	PE01121
CAS #	8007-11-2 ; 84012-24-8
FEMA #	2828
EINECS #	281-670-3 ; 290-371-7
Nombre INCI	Aceite Esencial de Origanum Vulgare (Oregano)
Lote #	11211912
Fecha de Destilación	Diciembre 2019
Fecha de Vencimiento	Noviembre 2021
Parte de la planta	Hojas y flores
Método de Extracción	Arrastre de Vapor
Calidad	100% Puro y Natural
Nota Aromática	Nota Media/Alta



PRUEBA DE METALES PESADOS	ESPECIFICACIONES	ESTÁNDARES	RESULTADOS
Plomo: Pb (mg/kg o ppm)	< 10 ppm	NA	Conforme
Arsenicop: As (mg/kg o ppm)	< 2 ppm	NA	Conforme
Mercurio: Hg (mg/kg o ppm)	< 1 ppm	NA	Conforme

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO:

Manténgalo en un recipiente bien cerrado en un lugar fresco y seco, protegido de la luz solar.

Noviembre 2019

PROPIEDADES	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
Apariencia	Líquido de color amarillo pálido a marrón/ámbar	Conforme
Olor	Aroma fresco, cálido, picante-herbáceo, picante	Conforme
Índice de refracción	1.500 - 1.528 @ 20°C	1.520
Gravedad específica	0.935 - 0.970 @ 20°C	0.949
Rotación óptica	-3° to +3°	Conforme
Solubilidad	Soluble en alcoholes y aceites fijos; Insoluble en el agua	Conforme
Comentarios	Calidad aromática es excelente	

Descargo de responsabilidad y precaución: Por favor, consulte toda la información técnica relevante específica del producto, antes de su uso. La información contenida en este se obtiene de fuentes actuales y fiables. Ethereal Ingredients (P) Ltd. proporciona la información contenida en este documento, pero no hace representación en cuanto a su amplitud o exactitud. Los individuos que reciben esta información deben ejercer su juicio independiente para determinar su idoneidad para un propósito particular. El usuario del producto es el único responsable del cumplimiento de todas las leyes y reglamentos aplicables al uso del producto, incluidos los derechos de propiedad intelectual de terceros. Dado que el uso o los usos ordinarios o de otro tipo de este producto están fuera del control de Ethereal Ingredients (P) Ltd., no se hace ninguna representación o garantía -expresada o implícita- en cuanto a los efectos de tal uso o usos, (incluyendo daños o de la lesión), o los resultados obtenidos. La responsabilidad de Ethereal Ingredients (P) Ltd. se limita al valor de los bienes y no incluye ninguna consecuencia pérdida. Ethereal Ingredients (P) Ltd. no será responsable de ningún error o retraso en el contenido, o de ninguna acción tomada en relación con el mismo. Ethereal Ingredients (P) Ltd. no será responsable de ningún daño resultante del uso o la confianza en esta información.

Como se trata de un documento generado electrónicamente, no se requiere de una firma

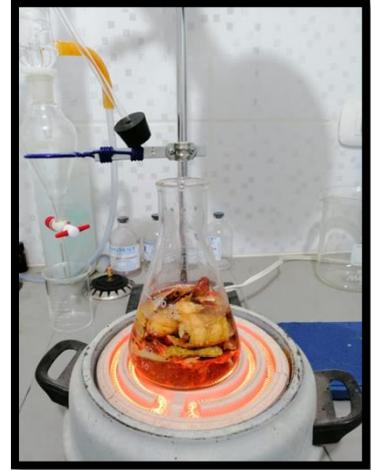
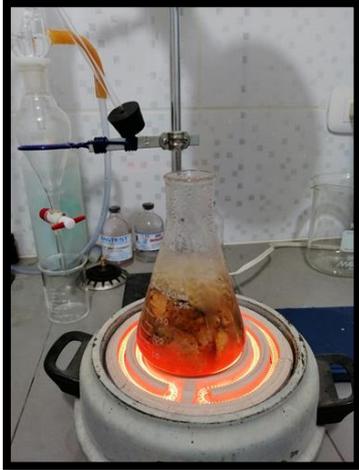
ANÁLISIS MICROBIAL	ESPECIFICACIONES	ESTANDARES	RESULTADOS
Conteo de Bacterias mesófilas aeróbicas	< 100 CFU/g	ISO 21149	Conforme
Levadura y moho	< 10 CFU/g	ISO 16212	Conforme
Candida albicans	AUSENTE / 1g	ISO 18416	Conforme
Escherichia coli	AUSENTE / 1g	ISO 21150	Conforme
Pseudomonas aeruginosa	AUSENTE / 1g	ISO 22717	Conforme
Staphylococcus aureus	AUSENTE / 1g	ISO 22718	Conforme

NOTA: ESTE CERTIFICADO ES UNA TRADUCCION LITERAL DEL CERTIFICADO ORIGINAL EMITIDO POR EL LABORATORIO

ES AROMATERAPIA EIRL – Calle Venecia 147, Dpto. 201, San Borja
Teléfono: 337-2290 Celular: 977 779 444
www.ekala.ape

ES AROMATERAPIA EIRL – Calle Venecia 147, Dpto. 201, San Borja
Teléfono: 337-2290 Celular: 977 779 444
www.ekala.ape

ANEXO 7
Obtención del extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa*



ANEXO 8



Sembrado de E. Coli BLEE en placa petri con agar Mueller Hinton



Colocación del papel filtro y disco de meropenem



Humidificación del papel filtro con los aceites y el extracto

ANEXO 9

Evidencia de los halos de inhibición obtenidos

