



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

**EFFECTO IN-VITRO DEL EXTRACTO ACUOSO DE ALLIUM
CEPA – “CEBOLLA” SOBRE CULTIVOS DE KLEBSIELLA
PNEUMONIAE, PSEUDOMONA AERUGINOSA Y
ESCHERICHIA COLI PRODUCTORAS DE
BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (*BLEE*)**

PRESENTADA POR

KATHERINE MILAGROS RAMOS CALDERON

ASESORES

VÍCTOR SOTO CÁCERES

LIZZIE BECERRA GUTIÉRREZ

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICA CIRUJANA

CHICLAYO – PERÚ

2018



**Reconocimiento - Compartir igual
CC BY-SA**

La autora permite a otros re-mezclar, modificar y desarrollar sobre esta obra incluso para propósitos comerciales, siempre que se reconozca la autoría y licencien las nuevas obras bajo idénticos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

EFFECTO *IN-VITRO* DEL EXTRACTO ACUOSO DE *ALLIUM CEPA* – “CEBOLLA” SOBRE CULTIVOS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, *PSEUDOMONA AERUGINOSA* Y *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (*BLEE*)

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICA CIRUJANA

PRESENTADA POR

KATHERINE MILAGROS RAMOS CALDERON

ASESORES

Dr. VÍCTOR SOTO CÁCERES

Dra. LIZZIE BECERRA GUTIÉRREZ

CHICLAYO, PERÚ

2018

DEDICATORIA

A mis padres porque han estado
conmigo a cada paso que doy, cuidándome y
dándome fortaleza para continuar,
depositando su entera confianza en cada reto
que se me presentaba sin dudar ni un solo
momento en mí.
Los amo con mi vida.

AGRADECIMIENTO

A mis padres quienes a lo largo de toda mi vida me han apoyado y motivado, creyeron en mí en todo momento; gracias a sus consejos y palabras de aliento que me han ayudado a crecer como persona y a luchar por lo que quiero.

A mis asesores por el tiempo dedicación y paciencia en la elaboración de este trabajo.

ÍNDICE

	Páginas
PORTADA	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
I. INTRODUCCIÓN	7
II. MATERIALES Y MÉTODOS	9
III. RESULTADOS	12
IV. DISCUSIÓN	15
V. CONCLUSIONES	17
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
VII. ANEXOS	22

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el efecto *in-vitro* del extracto acuoso de *Allium cepa* - “cebolla” sobre cultivos de *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). **Material y métodos:** Estudio cuantitativo con enfoque experimental. La población estuvo conformada por 3 cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* control y BLEE proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Martín de Porres. El extracto acuoso fue obtenido de cebolla morada (*Allium cepa*) la cual fue previamente identificada por un experto botánico, fue procesada y se determinaron concentraciones al 25%, 50%, 75% y 100% conservándose en viales oscuros hasta su posterior uso. La determinación del efecto *in vitro*, se encontró mediante el promedio del diámetro máximo medible de los halos de inhibición por cada patógeno en estudio. Para el análisis estadístico se empleó el programa Microsoft Excel 2010 y el complemento Megastat 2007, considerando una diferencia significativa, si $p < 0.05$. **Resultados:** Las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *A. cepa* produjeron halo de inhibición en el total de cepas control y BLEE de *E. coli*; mientras que para *K. pneumoniae* los halos de inhibición solo se produjeron en las cepas control y para *P. aeruginosa* no hubo efecto inhibitorio. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para *E. coli* BLEE es 65 mg/ml mientras que su Concentración Mínima Letal (CML) es 130 mg/ml. **Conclusiones:** El extracto acuoso de *A. cepa* presentó actividad inhibitoria sobre cultivos de *E. coli* BLEE, siendo dicha actividad dependiente de la concentración utilizada.

Palabras clave: *Allium cepa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* (Fuente: DeCS-BIREME)

ABSTRACT

Objective: evaluate the in vitro effect of the aqueous extract of *Allium cepa* - "onion" on pathogenic bacterial strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* and *Escherichia coli* producing extended spectrum beta-lactamases (ESBLs). **Material and methods:** Quantitative study with experimental approach. The population consisted of three pathogenic bacterial strains of *E. coli*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* control and ESBLs provided by the Laboratory of Microbiology of the University San Martin de Porres. The aqueous extract was obtained from purple onion (*Allium cepa*) which was previously identified by a botanical expert, was processed and concentrations were determined at 25%, 50%, 75% and 100% being stored in dark vials until their subsequent use. The determination of the in vitro effect was found by averaging the maximum measurable diameter of the inhibition halos for each pathogen under study. For the statistical analysis, the Microsoft Excel 2010 program and the Megastat 2007 add-on were used, considering a significant difference, if $p < 0.05$. **Results:** The different concentrations of the aqueous extract of *A. cepa* produced inhibition halo in the total of *E.coli* control and ESBLs pathogenic bacterial strains; while for *K. pneumoniae* the inhibition halos were only produced in the control strains; And in *P. aeruginosa* there was no inhibitory effect. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for *Escherichia coli* ESBLs is 65 mg / ml while its Minimum Lethal Concentration (CML) is 130 mg / ml. **Conclusions:** The aqueous extract of *A. cepa* presented inhibitory activity on *E. coli* ESBLs cultures, this activity being dependent on the concentration used.

Keywords: *Allium cepa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* (Source: MeSH)

I. INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana es uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo, sobre todo en los países en vías de desarrollo en los cuales no existen políticas de salud para la utilización adecuada de los fármacos (1,2). Uno de los grupos de antibióticos mayormente utilizados en la actualidad y con gran significancia clínica es el llamado grupo de los β -lactámicos, los cuales, debido a su baja toxicidad y su amplio espectro de acción son ampliamente utilizados para el tratamiento de diversas infecciones bacterianas. En ellos la causa más común de resistencia es la capacidad bacteriana de producir enzimas Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) las cuales fenotípicamente se caracterizan por conferir resistencia a penicilinas y cefalosporinas, incluyendo las de tercera y cuarta generación.(3) Las bacterias productoras de BLEE son principalmente *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*, las cuales son encontradas en aislamientos hospitalarios de sangre, orina, heridas o esputo de unidades de cuidados intensivos y en menor incidencia en el resto de las salas de un hospital.(4) En España, en el año 2000 en un estudio realizado en 40 hospitales se aislaron cepas de *E. coli* productoras de BLEE con una prevalencia que alcanzaba el 2,4%; seis años después en un segundo estudio los aislamientos de *E. coli* con BLEE, la prevalencia fue del 4,04%(4) Actualmente América Latina tiene la prevalencia más alta en el mundo de aislamientos para *K. pneumoniae* portadora de BLEE con un 45-52% y para *E. coli* de un 9-18%, siendo Brasil y Chile los países de mayor prevalencia (5). En el Perú, se ha mostrado que la producción de BLEE en *K. pneumoniae* y *E. coli* aisladas de hemocultivos de

nueve hospitales de Lima durante el 2008- 2009 fue de 75,1 % y 76,8 %, respectivamente (6).

En un estudio realizado en un hospital de la ciudad de Chiclayo en pacientes con hemocultivos o urocultivos positivos para BLEE, se encontró la presencia de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE en 61 % y 39 % respectivamente. (7) Debido a este aumento de la incidencia de infección de bacterias BLEE, la dificultad de su tratamiento y la resistencia frente a los principales antibióticos es que se busca encontrar nuevos tratamientos que sean de bajo costo y fácil acceso a toda la población, tal es el caso de la medicina alternativa y complementaria. Al recolectar información acerca de trabajos sobre las principales especies botánicas usadas por la población contra infecciones en las cuales se haya demostrado experimentalmente su poder antimicrobiano se encontraron múltiples estudios que demuestran la capacidad antibacteriana del extracto de *Allium cepa* - “cebolla” pero solo frente a bacterias silvestres(8-11). Teniendo en cuenta la problemática actual y la falta de estudios que utilicen cepas resistentes, se planteó el siguiente problema: ¿Cuál es el efecto *in-vitro* de las concentraciones de extracto acuoso de *A. cepa* - “cebolla” sobre cultivos de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) ?.

El presente trabajo tiene por objetivo evaluar el efecto *in-vitro* del extracto acuoso de *A. cepa*- “cebolla” sobre cultivos de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), comparando la acción antibacteriana de sus diversas concentraciones; así como también determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), la concentración mínima bactericida (CMB) de la planta.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio experimental, con enfoque cuantitativo en el laboratorio durante 2 meses. Para este estudio la población estuvo conformada por 3 cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Martín de Porres. La muestra fue constituida por cada repetición realizada en placas Petri con cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y cepas control, expuestas a diferentes concentraciones de extracto acuoso de *Allium cepa*- “cebolla”. Para determinar el tamaño de muestra se calculó el número de repeticiones mediante fórmula estadística:

$$n = 2 \left[\frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})\sigma}{\epsilon} \right]^2$$
, usando el cálculo de muestra para probar hipótesis en estudios que

comparan dos medias (12). Donde n: número de repeticiones, Z_{α} : Nivel de confianza $(1 - \alpha) = 1.96$, Z_{β} : Potencia de la prueba $(1 - \beta) = 0.842$, ϵ : valor de la diferencia entre medias que tienen significado $(\mu_1 + \mu_2 \text{ Precisión relativa}) = 2$ y σ : Valor previsto de las desviaciones estándar de las dos poblaciones = 1. Obteniéndose 16 que es el número de repeticiones que se evaluaron para cada variable.

Procedimientos

Bacterias

Para la reactivación de las cepas se realizó su siembra en caldo nutritivo e incubación a 37°C X 20 a 24 h, luego un aislamiento primario en agar nutritivo incubándose a 37°C

X 18 a 20 h y antibiograma según técnica de difusión en discos y posteriormente la lectura de placas y comprobación de cepas BLEE.(13-15).

Preparación de extractos

Se utilizó el extracto acuoso de *A. cepa*; el producto fue previamente identificado por experto botánico (anexo N°1). El procedimiento para la obtención del extracto consistió en pelar y lavar los bulbos de cebolla con agua destilada, seguido de una desinfección utilizando hipoclorito de sodio a una concentración de 200 ppm durante 5 minutos y luego un enjuague de los bulbos en suficiente agua destilada estéril, para retirar el hipoclorito residual, seguidamente se procedió a realizar un triturado de la planta (50 g), utilizando para ello una licuadora previamente esterilizada y en presencia de una mínima cantidad de agua destilada estéril (5 ml). Este contenido fue filtrado dos veces: primero a través de una gasa plegada varias veces, para retirar los residuos más groseros y segundo empleando papel filtro (Papel Whatman N° 41), esto último se repitió tres veces. Finalmente el extracto filtrado se esterilizó por medio de una filtración por membranas (Filtros Milipore 0,45 micras). Del extracto final estéril (considerado a una concentración de 100 %) se estandarizaron concentraciones de 25%, 50%, 75% y fueron conservados en viales oscuros de 2 ml a 4 °C durante 72 horas hasta su posterior uso (8)

Determinación del efecto antibacteriano

Se prepararon 25 ml de Agar Mueller Hinton fluido a 45°C y se le inoculó 1 ml de suspensión de inóculo (tubo 0.5 de la escala de Mc Farland) de un cultivo de 24 horas de las cepas indicadoras, que luego fue servido en placas. Una vez solidificado el agar se realizaron pocillos de 5 mm de diámetro con ayuda de un sacabocados estéril sobre los cuales se colocó 30 µl del extracto acuoso de *A. cepa* (cebolla) de las diferentes

concentraciones ya obtenidas anteriormente (0%, 25%, 50%, 75% y 100%). Estas placas fueron incubadas a 37° C por 18 - 24 horas observándose posteriormente los halos de inhibición producidos por la actividad del extracto acuoso. La actividad antibacteriana fue cuantificada a través de las medidas de los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento de las cepas indicadoras BLEE con sus respectivos controles de cepas no BLEE. (16) La concentración mínima bactericida (CMB) se realizó mediante el método descrito por Abadie (17), mientras que la concentración mínima inhibitoria (CMI), se realizó según el método descrito por el Instituto Nacional de Salud en el manual de normas técnicas N° 30 (14).

Análisis estadístico

Para presentar los resultados se usaron tablas de resumen y gráficos estadísticos. Se utilizó el programa SPSS versión 23 para el análisis estadístico y se usó la prueba de Shapiro-Wilk para un análisis de normalidad, que permitió decidir el uso de pruebas no paramétricas. Se procedió a hallar el promedio del diámetro máximo medible de los halos de inhibición. Para la comparación de los resultados se utilizó el Test de Kruskal-Wallis con un nivel de confianza de 0.05 en el programa Microsoft Excel 2010 y el complemento Megastat 2007.

Aspectos éticos

Se emplearon medidas de bioseguridad durante el procesamiento de las muestras biológicas para minimizar riesgos potenciales a la salud de la investigadora y las personas encargadas del laboratorio, pues este proyecto contempló el uso de bacterias patógenas.

El proyecto fue evaluado y aprobado por el comité institucional de ética en investigación de la Red Asistencial de Lambayeque.

III. RESULTADOS

Tabla 01 Promedio de diámetros inhibitorios del extracto acuoso de *A. cepa* – “cebolla” a las concentraciones de 25%, 50%, 75%, 100% sobre cultivos de *E. coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

CEPAS	CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ACUOSO <i>A. cepa</i>								p
	"cebolla" - HALOS DE INHIBICION (mm)								
	25%		50%		75%		100%		
	mm	σ	mm	σ	mm	σ	mm	σ	
Cepa Control	10,4	0,5	12,7	0,5	14,6	0,5	16,6	0,5	<0,05
Cepa 1 BLEE	7,2	0,4	8,6	0,5	10,6	0,5	13,3	0,5	<0,05
Cepa 2 BLEE	7,9	0,3	9,7	0,5	11,9	0,3	13,9	0,3	<0,05
Cepa 3 BLEE	7,6	0,5	9,6	0,5	11,8	0,4	14,3	0,4	<0,05

σ : desviación estándar, valor p calculado con la prueba de Kruskal-Wallis

La tabla 01 nos muestra el promedio de los halos de inhibición de todas las cepas de *E. coli* usadas en la investigación, indica que el extracto acuoso presentó actividad inhibitoria sobre cepas control y BLEE, y que a mayor concentración de extracto, mayor es el diámetro de los halos inhibitorios, en estos datos existe diferencia significativa (valor de $p < 0.05$.) entre el efecto inhibitorio y las diferentes concentraciones del extracto usado.

σ : desviación estándar, valor p calculado con la prueba de Kruskal-Wallis

Tabla 02 Promedio de diámetros inhibitorios del extracto acuoso de *A. cepa* – “cebolla” a las concentraciones de 25%, 50%, 75%, 100% sobre cultivos de *K. pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

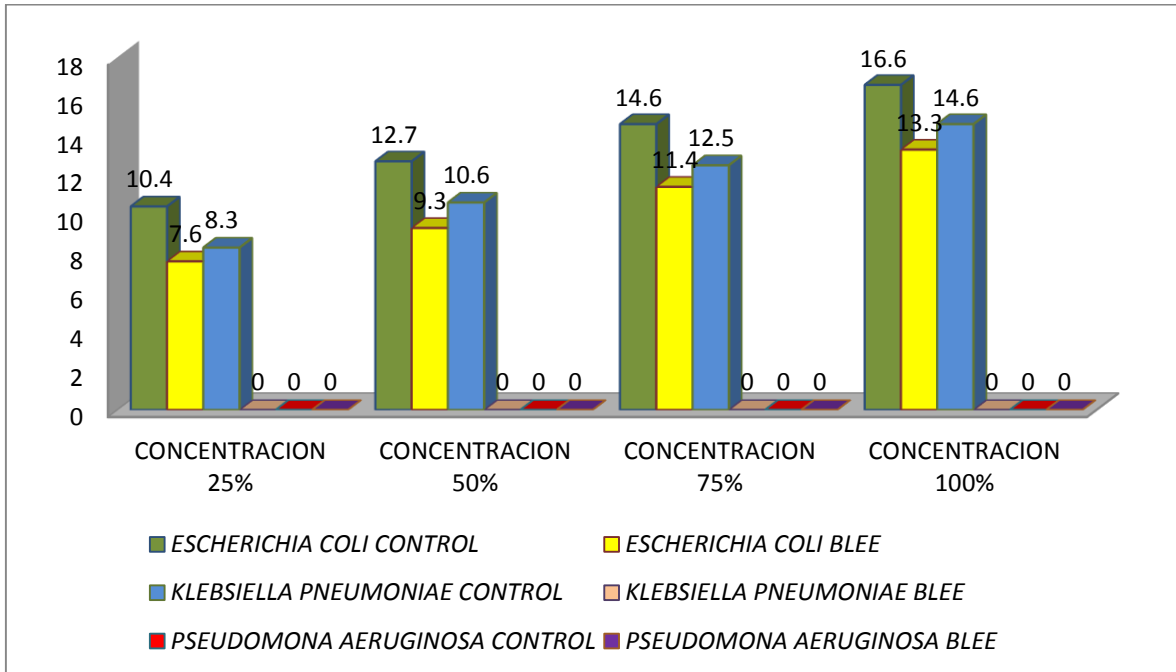
CEPAS	CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ACUOSO <i>A. cepa</i>								p
	"cebolla" - HALOS DE INHIBICION (mm)								
	25%		50%		75%		100%		
	mm	σ	mm	σ	mm	σ	mm	σ	
Cepa Control	8,3	0,4	10,6	0,5	12,5	0,5	14,6	0,5	<0,05
Cepa 1 BLEE	0	0	0	0	0	0	0	0	-
Cepa 2 BLEE	0	0	0	0	0	0	0	0	-
Cepa 3 BLEE	0	0	0	0	0	0	0	0	-

La tabla 02 nos muestra el promedio de los halos de inhibición de todas las cepas de *K. pneumoniae* usadas en la investigación, la cual indica que el extracto acuoso solo presentó efecto inhibitorio en la cepa control, donde a mayor concentración de extracto, mayor es el diámetro de los halos inhibitorios, en estos datos existe diferencia significativa (valor de $p < 0.05$.) entre el efecto inhibitorio y las diferentes concentraciones del extracto usado.

Tabla 03 Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del extracto acuoso de *A. cepa* - “cebolla” sobre cultivos de *E. coli* silvestres y productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

DETERMINANTES	<i>E. coli</i> CONTROL	<i>E. coli</i> BLEE
CMI	65 mg/ml	65 mg/ml
CMB	130 mg/ml	130 mg/ml

Gráfico 01 Comparación del promedio de diámetros inhibitorios en mm del extracto acuoso de *A. cepa* – “cebolla” a las concentraciones de 25%, 50%, 75%, 100% sobre cultivos de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli* control y BLEE



El gráfico 01 nos muestra que el extracto acuoso presentó efecto inhibitorio para las cepas control y BLEE de *Escherichia coli*; para *K. pneumoniae* solamente hubo inhibición en cepas control, mientras que para las cepas de *P. aeruginosa* (control y BLEE) no se observó efecto inhibitorio. Este efecto se presenta según se aumente la concentración del extracto acuoso de *A. cepa*.

IV. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se comprobó que el extracto acuoso de *A. cepa* presenta actividad antibacteriana contra cepas silvestres y BLEE, esto confirma lo ya demostrado por otros investigadores, los cuales evaluaron solamente acción inhibitoria contra cepas estándar.

Para *E. coli* se observó que el extracto acuoso presentó actividad inhibitoria en todas las cepas estudiadas, siendo el promedio de los halos de inhibición creciente de acuerdo a la concentración del extracto usada. Como se muestra en los resultados, para cepas silvestres enfrentadas con una concentración del 25% del extracto acuoso se observó un promedio de 10,4 mm de halo, mientras que para cepas BLEE el promedio fue de 7.6 mm y para la concentración de 100% contra cepas silvestres el promedio del halo fue 16,6 mm y para cepas BLEE 13,8 mm. Estos resultados coinciden con los datos encontrados por Shinkafi y col. los que obtuvieron un promedio de halo de inhibición de 15 mm, el cual es mínimamente menor al encontrado en el presente estudio. Así mismo, Arroyo y col. determinaron que se necesita de una concentración mayor al 10% para que se produzca la inhibición del crecimiento bacteriano, mientras que en este estudio se observó efecto inhibitorio a partir del 25 % de concentración del extracto acuoso (10,11).

Bakht y col. demostraron que el extracto acuoso de *A. cepa* presenta actividad inhibitoria contra cepas estándar (ATCC) de *K. pneumoniae* a partir de una concentración del 40 % de extracto, siendo esto similar a lo que se obtuvo en la presente investigación, en la que el efecto inhibitorio se logró a partir del 25% del extracto acuoso. Como se muestra en los datos obtenidos, al igual que para *E. coli*, se demostró que a mayor concentración del extracto, hay un promedio de halo inhibitorio

mayor para ambos tipos de cepas. No se observó efecto inhibitorio en las cepas BLEE de *K. pneumoniae* bajo ninguna concentración del extracto (21).

En los resultados de la investigación se observa que el extracto acuoso de *A. cepa* no desarrolló efecto inhibitorio sobre las cepas de *P. aeruginosa* (cepas silvestres y BLEE), estos datos contrastan con los resultados obtenidos por García y col. en los cuales para cepas de *p. aeruginosa* silvestre se encontró un promedio en los halos de inhibición de 7mm, utilizándose en ambos estudios el extracto acuoso. Esta diferencia se podría explicar porque el tipo de cepas usadas en dicho estudio son cepas estándar (ATCC) las cuales son cepas puras y en las que se ha comprobado que no tienen ningún tipo de resistencia, a diferencia de las cepas silvestres usadas en el este estudio, en las cuales solo se comprobó la resistencia a betalactamasas y que pueden tener algún factor de resistencia extra que no permita un resultado similar al encontrado en dicho trabajo (8).

En la tabla 3 se observa que la CMI tanto para las cepas control y las cepas BLEE de *E. coli* es de 65 mg/ml, esto contrasta lo encontrado por Arroyo y col. en el cual la CMI indicada fue de 25 mg/ml, un valor bastante menor al encontrado en el presente estudio; esto se puede explicar por las diferencias metodológicas en ambos estudios, así como también que en dicho estudio se usaron cepas control ATCC, las cuales son sensibles y no presentan ningún tipo de resistencia bacteriana, a diferencia de las cepas silvestres usadas en el presente estudio (10).

Entre las limitaciones se debe mencionar que las cepas control con las que se trabajó fueron cepas silvestres, a diferencia de los trabajos revisados, donde se usaron cepas estándar (ATCC) las cuales son cepas puras y sin ningún tipo de resistencia; esto podría llevar a la variación de los resultados obtenidos en el estudio.

V. CONCLUSIONES

El extracto acuoso de *Allium cepa* - “cebolla” presenta efecto *in-vitro* sobre cultivos de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y cepas control no BLEE; siendo este efecto dependiente de las concentraciones usadas, es decir, a mayor concentración mayor efecto.

El extracto acuoso de *Allium cepa* - “cebolla” no presenta efecto *in-vitro* sobre cultivos de *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), pero si para cepas control no BLEE.

El extracto acuoso de *Allium cepa* - “cebolla” no presenta efecto *in-vitro* sobre cultivos de *Pseudomona aeruginosa* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) ni para cepas control no BLEE.

Se determinó que la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de *Allium cepa* - “cebolla” sobre cultivos de *Escherichia coli* productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) es de 65 mg/ml al igual que para el control de cepas no BLEE.

Se determinó que la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto acuoso de *Allium cepa* - “cebolla” sobre cultivos de *Escherichia coli* productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) es de 130 mg/ml al igual que para el control de cepas no BLEE.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pujol M, Peña C. El significado clínico de las betalactamasas de espectro extendido. Rev. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003; 21 (2): 69 - 71.
2. Acuña M, Benadof D, Rodriguez P, Herrera P. Antibióticos y expresión de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en agentes bacterémico. Rev Chil Pediatr. 2011; 82 (3): 198-203.
3. Cercenado E. Impacto pronóstico de las betalactamasas de espectro extendido. Rev Clin Esp. 2011; 211 (3): 139-141.
4. García A, García E, Hernández A, Ruiz J, Yagüe G, Herrero J, Gómez J. Bacteriemias por Escherichia coli productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. Rev Esp Quimioter. 2011; 24(2):57-66.
5. Morales I. Prevalencia de cepas portadoras de marcadores de resistencia (BLEE) aisladas en muestras clínicas provenientes de pacientes ambulatorios. [Tesis de grado]. [Perú]: Universidad Nacional Autónoma De México. 2014; 54 p.
6. Morales J, Reyes K, Monteghirfo M, Roque M, Irey J. Presencia de β -lactamasa de espectro extendido en dos hospitales de Lima, Perú. Rev. An Fac Med Lima. 2005; 66 (1): 24 - 32.
7. Escalante J, Síme A, Díaz C. Características clínicas y epidemiológicas en pacientes con infección intrahospitalaria por bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. Rev. Peru. Epidemiol. 2013; 17(1): 01-06
8. García R, Herrera F. Evaluación de la inhibición del crecimiento de cinco cepas bacterianas patógenas por extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium*

- fistulosum* y *Allium cepa*: estudio preliminar in vitro. Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. Colombia 2007; 05 (2): 68 - 79.
9. Nieto L, González W. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria y letal de los extractos de cebolla roja (*Allium cepa* L) para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. [Tesis de grado]. [Colombia]: Universidad de Cartagena. 2010. 93 p.
 10. Arrollo A, Sánchez M, Landin L, Alonso A, Suarez G. Actividad inhibitoria de *Allium cepa* y *Allium sativum* sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*. Rev. Científica Biológico Agropecuaria Tuxpan. 2015; 3 (5): 1045-1052.
 11. Shinkafi S, Dauda H. Antibacterial Activity of *Allium Cepa* (Onion) On Some Pathogenic Bacteria Associated With Ocular Infections. Scholars Journal of Applied Medical Sciences (SJAMS)Sch. J. App. Med. Sci. 2013; 1(3):147-151
 12. Pérez L, Mejía E. Efecto antimicrobiano *in vitro* de tres concentraciones de la corteza de *Copaifera officinalis* sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. [Tesis de grado]. [Perú]: Universidad Nacional de Trujillo. 2013 . 75 p.
 13. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias. Serie de Normas Técnicas N° 28. Perú: Ministerio de Salud. 2005
 14. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos para la prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Difusión en Disco. Serie de Normas Técnicas N° 30. Perú: Ministerio de Salud. 2002

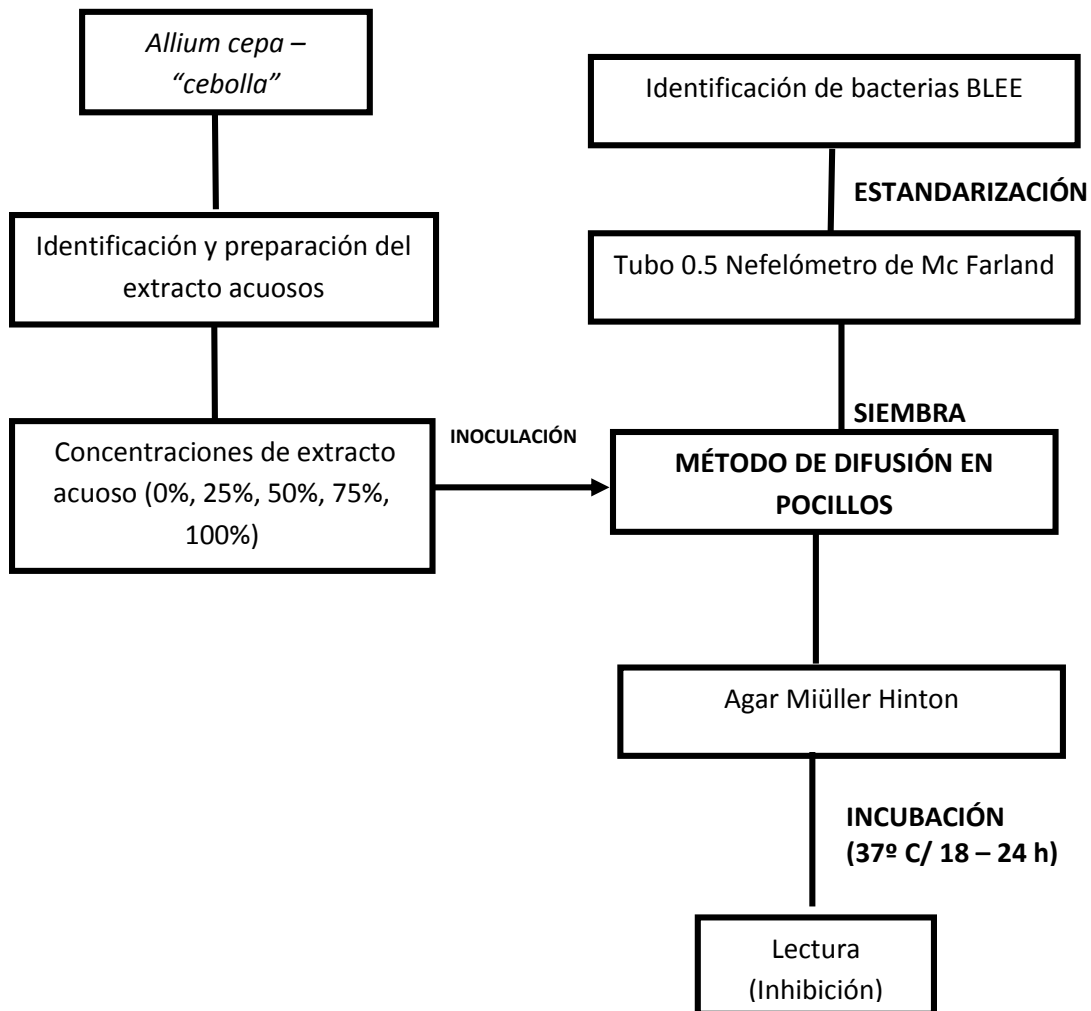
15. Koneman E, Winn W, Allen S, Janda W, Procop G, Scherencjenberger P, Woods G. Diagnostico Microbiológico, Texto y Atlas en color. 6° Edición. Buenos Aires-Argentina: Edit. Médica Panamericana; 2008
16. Torres J. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de Luna chequen (molina) a. gray “arrayán” frente a patógenos aislados de hemocultivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, Lima – Perú. [Tesis de grado]. [Perú]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2014.130 p.
17. Abadie R, Medina R, Ruiz L, Tresierra A. Actividad antibacteriana de extractos vegetales sobre cepas aisladas del Hardware de computadoras del Hospital Cesar Garayar - Iquitos. [Tesis de grado]. [Perú]: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. 2014.117 p.
18. Mejía E, Vera G. Efecto antimicrobiano in vitro de tres concentraciones del aceite esencial *Cinnamomum zeylanicum* (canela) sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. [Tesis de grado]. [Perú]: Universidad Nacional de Trujillo. 2013 . 76 p.
19. Brooks G, Carroll K, Buter J, Morse S, Mietzner T. Microbiología Clínica de Jawest, Melnick y Adelberg. 25° Edición. México: Mc Graw Hill Interamericana. 2011.
20. Pérez L, Mejía E. Efecto antimicrobiano *in vitro* de tres concentraciones de la corteza de *Copaifera officinalis* sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. [Tesis de grado]. [Perú]: Universidad Nacional de Trujillo. 2013. 75 p.

21. Bakht J, Khan S, Shafi M. In Vitro antimicrobial activity of *Allium cepa* (dry bulbs) against Gram positive and Gram negative bacteria and fungi. *Rev. Pak. J. Pharm.* 2014;27(1): 139-145

VII. ANEXOS

ANEXO N° 1

ALGORITMO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Allium cepa* – “CEBOLLA” CON EFECTO IN VITRO SOBRE CULTIVOS DE *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* Y *Escherichia coli* PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE).



CONSTANCIA

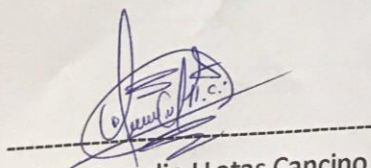
La que suscribe, Biólogo - Botánico con colegiatura CBP N° 7778,

HACE CONSTAR

Que la especie botánica que tengo a la vista le corresponde el nombre científico: **Allium cepa** L., especie conocida comúnmente con el nombre de "cebolla".

Se expide la presente como constancia a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Chiclayo, 19 setiembre 2016.



MSc. Dunalía LLatas Cancino
Biólogo - Botánico

