

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS

RECURSOS NATURALES

*Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Ingeniera en
Biotecnología de los Recursos Naturales*

TRABAJO EXPERIMENTAL:

“EVALUACIÓN IN VITRO DE LA CAPACIDAD

ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE MORINGA

(*Moringa oleífera Lam.*) Y ALTAMISA (*Ambrosia arborescens Mill.*)

FRENTE A LA BACTERIA *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70693”

AUTORA:

VERÓNICA CAROLINA CASTAÑEDA MATUTE

TUTORA:

INÉS PATRICIA MALO CEVALLOS, PhD

CUENCA – ECUADOR

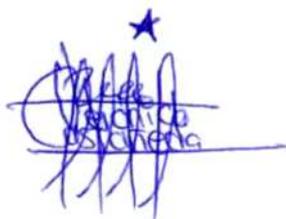
2019

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Verónica Carolina Castañeda Matute con documento de identificación N° 0106328479, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación: **“EVALUACIÓN IN VITRO DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE MORINGA (*Moringa oleífera Lam.*) Y ALTAMISA (*Ambrosia arborescens Mill.*) FRENTE A LA BACTERIA *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70693”**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, septiembre del 2019



Verónica Carolina Castañeda Matute

C.I. 0106328479

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación:
**“EVALUACIÓN IN VITRO DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE
LOS ACEITES ESENCIALES DE MORINGA (*Moringa oleífera Lam.*) Y
ALTAMISA (*Ambrosia arborescens Mill.*) FRENTE A LA BACTERIA *Klebsiella
pneumoniae* ATCC 70693”**, realizado por Verónica Carolina Castañeda Matute,
obteniendo el *Trabajo Experimental* que cumple con todos los requisitos estipulados
por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, septiembre del 2019



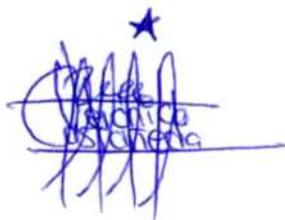
Inés Malo Cevallos, PhD

0102291044

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, Verónica Carolina Castañeda Matute con documento de identificación N° 0106328479, autora del trabajo de titulación: **“EVALUACIÓN IN VITRO DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE MORINGA (*Moringa oleífera Lam.*) Y ALTAMISA (*Ambrosia arborescens Mill.*) FRENTE A LA BACTERIA *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70693”**, certifico que el total contenido del *Trabajo Experimental*, es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, septiembre del 2019



Verónica Carolina Castañeda Matute

C.I. 0106328479

DEDICATORIA

A DIOS, por haber brindado salud, sabiduría y fortaleza en este proceso de formación profesional.

A mis padres Luis Eduardo y Rosa Alcira, por su apoyo económico y moral en todo momento de mi vida universitaria.

A mis hermanos, abuelos y sobrinos, por su amistad incondicional y su cariño brindado hacía mi persona.

AGRADECIMIENTO

A DIOS, por haberme dado sabiduría, fortaleza, y amor porque gracias a ello he logrado alcanzar esta meta tan importante en mi vida.

A mis padres Luis Eduardo y Rosa Alcira, que a pesar de las adversidades me apoyaron en todo momento en mi vida universitaria, brindándome su cariño, consejos y fortaleza, ellos son el pilar fundamental para lograr esta meta.

A mis hermanos Luis, Carlos, Wilson, Ana, Silvia, Diego y Daniela, por haberme dado su apoyo incondicional en los momentos que más necesite, por ser mis soportes en mis caídas en el sendero de la vida, y por enseñarme a ser fuerte.

A mis abuelos, Eloy, Victoria, José y Rosenda, por sus consejos de sabiduría para aplicarlos a en mi vida para cometer menos errores.

A mi madrina Valbina, por ser mi inspiración y mi ejemplo a seguir, por sus ánimos y apoyo brindado en todo este tiempo cursado en la universidad.

A mis sobrinos Angélica, Victoria, Catalina, Luisa, Ignacio, Miguel, Carlos, Daniela, Adrián, Jesús, Ángeles, Josemy, Edward, Carolina y Alcira, por su amor y sus abrazos que me fortalecían siempre.

A mi mejor amigo por haber estado en los momentos difíciles de la universidad, por ser una de las personas que siempre me brindo su cariño, paciencia y sobre todo por darme su compañía de estudio, por todo eso le doy gracias.

A mi mascota Arturito por su compañía en mis noches de estudio.

Finalmente, a la Dra. Inés Malo por su apoyo incondicional y aporte de conocimientos en el desarrollo del trabajo de titulación.

SIGLAS Y ACRÓNIMOS

AE: Aceite esencial

AEA: Aceite esencial de altamisa

AEM: Aceite esencial de moringa

CG: Cromatografía de Gases

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

DMSO: Dimetil sulfóxido

F: Fórmula

AEs: Aceites esenciales

RESUMEN

La presente investigación se efectuó en los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, con el fin de determinar las características fisicoquímicas de los aceites esenciales de moringa (*Moringa oleífera Lam.*) y altamisa (*Ambrosia arborescens Mill.*), y el efecto antibacteriano frente a la bacteria *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70693, con el propósito de generar nuevas alternativas para tratar la misma, con la elaboración de algún antibiótico a base de los aceites esenciales antes mencionados.

Los aceites esenciales se sometieron a pruebas para evaluar las características fisicoquímicas, obteniendo como resultado que la densidad a 20 °C: AEA (1,112 g/mL), AEM (0.8404 g/mL), miscibilidad en etanol: el AEA y AEM son solubles, el punto de congelación de los aceites esenciales es a 4 °C, la viscosidad del AEA (0.479 p), AEM (2.171 p) y el pH del AEA (5.3), AEM (6.1), concluyendo que los aceites esenciales están dentro de los estándares de calidad.

Para la estimación de la composición química de los aceites se realizó el análisis cromatográfico usando el equipo GS/MS, obteniendo como resultado que el AEM posee 11 compuestos los más representativos son: 23.49 Copaene<alpha>-Dup1, 25.36 Caryophyllene(E-)-Dup1 y 29.29 Amorphene<delta>-Dup1, en cuanto al AEA se registraron 57 compuestos los más característicos son: Germacrene D-Dup2, 28.04 Curcumene<gamma> y Benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-.

Para la verificación de la cepa utilizada se efectuaron pruebas bioquímicas concordando los resultados obtenidos con investigaciones realizadas en la caracterización de la *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70693.

La valoración del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales frente a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70693, se realizó mediante dos métodos: el primero por el método de discos a diferentes concentraciones (5%, 35%, 75% y 100%): como control positivo se usó la amoxicilina/ácido clavulánico y a modo negativo agua destilada, DMSO). Estableciendo en el caso del AEA mayor inhibición al 100% (20,7 mm), en cuanto al de moringa a la misma concentración presento (7 mm) y el segundo método es la microdilución con el fin de determinar del CMI, este se realizó en microplacas de 96 pocillos, por el método de doble dilución con concentraciones de 6%, 3%, 1,5%, 0,75%, 0,375%, 0,1875%, 0,09375% y 0,046875% de los aceites esenciales, obtenido el CMI del AEM al 3% mientras y el de AEA al 1,5%, concluyendo que los dos aceites poseen actividad antimicrobiana frente al microorganismo antes mencionado.

PALABRAS CLAVES: Aceite esencial, altamisa, moringa, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70693.

ABSTRACT

This research was carried out in the Life Sciences Laboratories of the Salesian Polytechnic University, in order to determine the physicochemical characteristics of the essential oils of moringa (*Moringa oleífera* Lam.) and altamisa (*Ambrosia arborescens* Mill.), also the antibacterial effect against the bacteria *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70693, with the purpose of generating new alternatives to treat the same, by creating an antibiotic based on the essential oils previously mentioned.

The essential oils were tested to evaluate the physicochemical characteristics, obtaining the following results with density at 20 °C: AEA (1,112 g / mL), AEM (0.8404 g / mL), miscibility in ethanol: the AEA and AEM are soluble, the freezing point of essential oils is at 4 °C, the viscosity of the AEA (0.479 p), AEM (2.171 p) and the pH of the AEA (5.3), AEM (6.1), determined that the essential oils are within the quality standards.

For the estimated chemical composition of the oils, a chromatographic analysis was performed using the GS/MS equipment, obtaining as a result that the AEM has 11 compounds, the most representative are: 23.49 Copaene <alpha-> -Dup1, 25.36 Caryophyllene (E-) -Dup1 and 29.29 Amorphene <delta-> -Dup1, regarding the SAA, 57 compounds were registered, the most characteristic being: Germacrene D-Dup2, 28.04 Curcumene <gamma-> and Benzene, 1- (1,5-dimethyl-4- hexenyl) -4-methyl-.

Biochemical tests were done for the verification of the strain, the results matched those of investigations carried out in the characterization of the *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70693.

The assessment of the antimicrobial effect of essential oils against *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70693, was carried out by two methods: first, the method of disks

at different concentrations (5%, 35%, 75% and 100%): amoxicillin/clavulanic acid was used as a positive control and distilled water for the negative control, DMSO). Establishing in the case of the SAA greater inhibition at 100% (20.7 mm), in terms of moringa at the same concentration it presented (7 mm), the second method applied in order to determine the MIC was microdilution, this was performed in 96-well microplates, by the double dilution method with concentrations of 6%, 3%, 1.5%, 0.75%, 0.375%, 0.1875%, 0.09375% and 0.046875% of the essential oils, obtaining the CMI of the AEM at 3% while of the AEA at 1.5%, concluding that both oils mentioned have antimicrobial activity against the aforementioned microorganism.

KEY WORDS: essential oil, altamisa, moringa, *Klebsiella pneumoniae* ATCC

ÍNDICE

CAPITULO 1.....	1
1.1 ANTECEDENTES	1
1.2 INTRODUCCIÓN	3
1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.4 JUSTIFICACIÓN	5
1.5 OBJETIVOS	6
1.5.1 GENERAL.....	6
1.5.2 ESPECÍFICOS	6
1.5 HIPÓTESIS.....	7
CAPITULO 2.....	7
2.1 MARCO DE REFERENCIA	7
2.1.1 Plantas medicinales	7
2.1.2 Principio activo	7
2.1.3 Formas de uso de las plantas medicinales	8
2.1.4 Importancia de las plantas medicinales.....	8
2.1.5 Plantas medicinales en el Ecuador	9
2.1.6 Botánica de las especies vegetales	10
2.1.6.1 Moringa (<i>Moringa oleífera</i>)	10
2.1.6.2 Altamisa (<i>Ambrosia arborescens</i>)	12
2.2 ACEITES ESENCIALES	14
2.2.1 Localización y principales propiedades físicas de los aceites esenciales	14
2.2.2 Rendimiento.....	15

2.2.3	Métodos de extracción para los aceites esenciales	15
2.2.3.1	Destilación	16
2.2.3.2	Destilación por arrastre con vapor de agua.....	17
2.2.3.3	Destilación con agua o hidrodestilación	17
2.2.3.4	Maceración en grasa.	17
2.2.3.5	Extracción con solventes volátiles.....	17
2.2.3.6	Extracción por fluidos supercríticos	18
2.3	Capacidad antimicrobiana.....	18
2.4	Determinación de las características fisicoquímicas de los AEs	18
2.4.1	Características organolépticas.....	18
2.4.2	Determinaciones físicas	18
2.4.2.1	Densidad a 20 °C	18
2.4.2.2	Miscibilidad en etanol.....	19
2.4.2.3	Punto de congelación	19
2.4.2.4	Viscosidad.....	19
2.4.3	Determinación química.....	19
2.4.4	Análisis cromatográfico	19
2.5	BACTERIA <i>Klebsiella pneumoniae</i>	20
2.5.1	Taxonomía	20
2.5.2	Morfología	21
2.5.3	Metabolismo	21
2.5.4	Hábitat.....	21
2.5.5	Aislamiento	21
2.5.6	Importancia de la <i>Klebsiella pneumoniae</i>	21

2.5.7	Transmisión de la <i>K. pneumoniae</i>	22
2.6	Medios de cultivo.....	22
2.7	Características de medios de cultivos utilizados para la verificación y pruebas de sensibilidad de la bacteria <i>K. pneumoniae</i> (Anexo 3)	22
2.8	Métodos de estudio de sensibilidad bacteriana	22
2.8.1	El método de Kirby-Bauer (método de difusión en agar).....	22
2.8.2	Dilución en agar	23
2.8.3	Macrodilución en caldo.....	23
2.8.4	Método de microdilución	24
2.8.5	Épsilon test.....	24
	CAPITULO 3.....	25
	MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1	RECURSOS.....	25
3.2	Obtención del aceite esencial de moringa (<i>Moringa oleífera</i> Lam.) altamisa (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill.).....	25
3.2.1	Extracción de los aceites esenciales por arrastre de vapor.....	25
3.3	Evaluación de las características fisicoquímicas de los aceites esenciales de moringa (<i>Moringa oleífera</i> Lam.) y altamisa (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill).....	26
3.3.1	Características organolépticas	26
3.3.2	Determinaciones físicas	26
3.3.3	Densidad a 20 °C.....	26
3.3.4	Miscibilidad en etanol.	27
3.3.5	Punto de congelación	27
3.3.6	Viscosidad	27

3.4	Análisis químico	28
	Los análisis químicos ejecutados en los aceites esenciales tienen como finalidad caracterizar a los mismos, permitiendo conocer factores fundamentales para su utilización.....	28
3.4.1	pH.....	28
3.4.2	Análisis cromatográfico de los AEs	29
3.5	Caracterización de la bacteria <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70693.....	30
3.5.1	Prueba de citrato	30
3.5.2	Prueba de motilidad	30
3.5.3	Prueba de Ureasa.....	30
3.5.4	Prueba de oxidasa	30
3.5.5	Prueba de lactosa.....	31
3.5.6	Prueba de catalasa.....	31
3.5.7	Prueba de rojo de metilo y Voges Proskauer	31
3.5.8	Tinción de Gram	32
3.6	Comparación de la actividad antimicrobiana de los AEs mediante pruebas de sensibilidad por discos	33
3.6.1	Estandarización del inóculo	33
3.6.2	Preparación de las diferentes disoluciones de los aceites esenciales al 5%, 35%, 75% y al 100% de moringa y altamisa	34
3.6.3	Preparación de los discos y placas para la inoculación.....	34
	Se retiraron los discos de sensibilidad de Amoxicilina-clavulánico del congelador para el antibiograma, debido a que estos deben estar a temperatura	

ambiente con el objetivo de evitar la humedad que puede afectar la concentración de los agentes antimicrobianos (García, R., et al., 2000).....	34
3.6.4 Inoculación de las placas.....	35
3.6.5 Distribución de los discos	35
3.6.6 Medición de los halos.....	36
3.7 Concentración mínima inhibitoria de los AEs por medio del método microdilución en el caldo.....	37
3.7.1 Preparación del inóculo.....	37
3.7.2 Preparación del control positivo.....	38
3.7.3 Microdilución.....	38
CAPITULO 4.....	40
4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
4.1.1 Obtención de aceite esencial	40
4.1.2 Análisis de las características fisicoquímicas de los AEs	40
Análisis cromatográfico de los aceites esenciales.....	41
4.1.3 ANÁLISIS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS REALIZADAS A LA BACTERIA <i>Klebsiella pneumoniae</i>	42
4.4 Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de moringa y altamisa mediante pruebas de sensibilidad por discos (Kirby Bauer)	43
4.5 Determinación de CMI de los aceites esenciales de moringa y altamisa mediante micro dilución en caldo	50
4.5.1 Adición de la resazurina.....	51
4.5.2 Determinación de la viabilidad celular en cada pocillo	52

4.5.3 Determinación del efecto bacteriostático o bactericida que ejercen los aceites esenciales de moringa y altamisa sobre <i>K. pneumoniae</i>	54
CAPITULO 5	57
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	57
5.1 Recomendaciones.....	58
BIBLIOGRAFÍA	59
ANEXOS	67
ANEXO 1.....	67
ANEXO 2.....	69
ANEXO 3.....	70
ANEXO 4.....	73
ANEXO 5.....	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Métodos de extracción de aceites esenciales.	16
Tabla 2 Diámetro crítico para <i>K. pneumoniae</i> en CMI.....	37
Tabla 3 Resultado de los análisis fisicoquímicos de los AEs.	40
Tabla 4 Principales componentes de los AEs de altamisa y moringa.	41
Tabla 5 Diámetros en mm de los halos de inhibición alcanzados por las distintas concentraciones de los AEs.	44
Tabla 6 Porcentaje de inhibición.....	46
Tabla 7 Hipótesis para la prueba de Kruskal-Wallis.....	48
Tabla 8 Estadísticas descriptivas del método de Kruskal-Wallis.	49
Tabla 9 Evaluación de la CMI alcanzada por los tratamientos.....	54

Tabla 10 Resultados obtenidos de los aceites esenciales evaluados para comprobar si son bacteriostáticos o bactericidas.	55
--	----

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 Estructuras de la especie vegetal de moringa.....	11
Ilustración 2 Planta de altamisa.....	14
Ilustración 3 Hojas de moringa (<i>Moringa oleífera</i> Lam.) y altamisa (<i>Ambrosia arborescens</i> Mill.).	26
Ilustración 4 Prueba de miscibilidad en alcohol.....	27
Ilustración 5 Visualización de las tiras del pH.....	29
Ilustración 6 Equipo de cromatografía de gases acoplado a masas y muestras preparadas de los AEs.....	29
Ilustración 7 Placa lista para la observación en el microscopio.	32
Ilustración 8 Medición de la absorbancia con el equipo GENESYS 20.....	33
Ilustración 9 Disoluciones de los AEs en diferentes concentraciones.	34
Ilustración 10 Placas lista para la incubación.....	35
Ilustración 11 Colocación de los discos.	36
Ilustración 12 Placa con halos de inhibición.....	37
Ilustración 13 Medición de los halos de inhibición formados por el efecto antimicrobiano del AEM y AEA.	43
Ilustración 14 Microplaca preparada incubada durante 24 horas.....	51
Ilustración 15 Resazurina y coloración de esta a las cero horas de incubación.....	52
Ilustración 16 Coloración de los pocillos a las 2 horas de incubación con la resazurina.....	53

Ilustración 17 Crecimiento bacteriano (bactericida sin crecimiento bacteriano y bacteriostático crecimiento bacteriano).	56
Ilustración 18 Prueba de citrato positiva.	73
Ilustración 19 Prueba de motilidad negativa.	73
Ilustración 20 Prueba de ureasa positiva.	73
Ilustración 21 Prueba de oxida negativa.....	73
Ilustración 22 Prueba de lactosa positiva.	74
Ilustración 23 Prueba de catalasa positiva.....	74
Ilustración 24 Prueba rojo de metilo negativa y prueba de Voges Proskauer positiva. ..	74
Ilustración 25 Tinción de Gram donde se puede observar bacilos Gram negativos.	74

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Promedio de halos inhibición	45
Gráfico 2 Grafica de normalidad	47

CAPITULO 1

1.1 ANTECEDENTES

Desde el siglo XIX se habla de la bacteria denominada *Klebsiella*, la cual es un patógeno que habita en el intestino del ser humano, causante de varias infecciones que pueden ser mortales. Una de las especies más importantes en la salud humana es la *Klebsiella pneumoniae*, la cual se identificó por primera vez a finales de los años 90 en los Estados Unidos, dos años más tarde se logró el aislamiento de esta y en el 2004 se registraron los primeros brotes de enfermedades causadas por *K. pneumoniae* en los hospitales de Nueva York (El origen de la bacteria KPC, 2011).

Estudios realizados en los últimos años han demostrado que es una bacteria que representa un alto riesgo para la salud humana, ya que produce infecciones nosocomiales, como son: neumonía y septicemias entre otras. Es una bacteria productora de β -lactamasas que le da resistencia a los antibióticos (Ramírez-Alfaro & Villalobos-Vindas, 2016) como: carbenicilina, ampicilina y quinolonas (*Klebsiella pneumoniae*: la preocupante bacteria resistente a todos los antibióticos, 2017). Las infecciones con dicha bacteria suelen adquirirse en hospitales y centros de atención a largo plazo.

La tasa de prevalencia de la *K. pneumoniae* en los distintos lugares del mundo tienen un registro de: 44 % en Latinoamérica, 22.4% en Asia, 13.3% en Europa, y 7.5% en los Estados Unidos (Ramírez-Alfaro & Villalobos-Vindas, 2016). En Ecuador se han realizado investigaciones en hospitales públicos y privados en donde se ha determinado una prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* del 34 % en los pacientes de terapia intensiva (Telégrafo, 2017). En el 2014 se registraron

cerca de 27 mil pacientes aislados que presentaron bacterias resistentes, en el 2015 esa cifra aumentó a cuarenta y nueve mil (Izquieta, P, s. f.).

Debido a la resistencia a los antibióticos comerciales que presenta la bacteria, se han realizado estudios investigativos *in vitro* utilizando aceites esenciales naturales, con el propósito de buscar nuevos agentes antimicrobianos para contrarrestar los efectos de la bacteria *Klebsiella pneumoniae*.

Los aceites esenciales naturales han despertado un interés notable debido a sus propiedades bactericidas tanto en organismos Gram positivos como Gram negativos (Argote Vega et al., 2017), además, fungicidas y antioxidantes (Rodero et al., 2006 y Vilela et al., 2011).

La *Moringa oleífera* Lam. y *Ambrosia arborescens* Mill. son plantas que, según estudios de Alarcón et al., (2017) y Astudillo (2003) poseen propiedades antimicrobianas contra *K. pneumoniae*. El objetivo de estudio de los aceites esenciales de estas plantas tiene como finalidad identificar el que podría tener mayor efecto inhibitorio contra la *K. pneumoniae*.

Para la extracción de los aceites esenciales se aplican varios métodos, pero el que va a ser utilizado en este trabajo experimental es el arrastre por vapor. Para realizar el proceso de obtención se debe tener en cuenta principalmente la calidad de la materia prima, pues estudios realizados proporcionan resultados variantes dependiente de este factor. Además, se aplicará el método de Kirby-Bauer (método de difusión en agar) el mismo que permite obtener un halo de inhibición bacteriana de los aceites esenciales (Rodero et al., 2006).

1.2 INTRODUCCIÓN

Moringa oleífera también conocida como moringa o marango, es una planta originaria del sur del Himalaya, nordeste de la India, Bangladesh, Afganistán y Pakistán (Foidl et al., s. f.), fue introducida en los años 1920 en América central como planta ornamental y para cercas vivas (Pérez, A, Sánchez, T, Armengol, N, & Reyes, F, 2010), su uso data desde hace milenios. Se empleaban prácticamente todas sus partes, las flores, frutos, hojas, semillas y raíces, su aplicación fue prácticamente empírica y su información existente proviene de la tradición oral o de publicaciones de carácter general. En la actualidad son usadas en la alimentación, medicina, perfumería, cosmetología y remediación ambiental, entre otras.

En el siglo XX *Moringa oleífera* empezó a recibir una atención merecida por parte de la comunidad científica (Martín et al., 2013), en el Ecuador el cultivo es favorable en la parte costera como en Santa Elena, Portoviejo, Naranjito y Salitre debido a su clima («La moringa en Ecuador | La Revista | EL UNIVERSO», s. f.).

Moringa oleífera es un árbol caducifolio, y se puede encontrar en áreas a nivel del mar hasta los 1800 metros de altura, con una temperatura de 25-35 °C (Doménech et al., 2017), se reproduce por medio de estacas o semillas, es de crecimiento rápido y puede llegar alcanzar una altura de 7- 9 m y un diámetro de 20 a 40 cm (Foidl et al., s. f.), posee raíces tuberosas y gruesas, flores bisexuales, frutos en cápsulas trilobuladas y pueden poseer de 12 a 25 semillas, las hojas son de color verde claro y compuestas, las semillas que posee esta planta son de color oscuro con una forma redonda provistas de tres alas blanquecinas (Doménech et al., 2017 y Foidl et al., s. f.), tiene un alto contenido de proteínas en sus hojas, ramas y tallos. Sus frutos y flores

contienen vitaminas A, B y C y proteínas. Las semillas tienen entre 30 y 42% de aceite y su torta contiene un 60% de proteína. (Foidl et al., s. f.).

La *Ambrosia arborescens* llamada comúnmente altamisa, marcu o artemisa es originaria de América de sur encontrándose distribuida en Perú, Colombia, Bolivia y Ecuador, la misma que está en todas las provincias andinas de la Sierra, entre los 2000 y 3500 msnm («Ambrosia arborescens», s. f.). Es una planta medicinal que se emplea para dolores de: cabeza, menstruales, de parto, fiebres entre otras, también se usa para repelar insectos, plagas y parásitos (Permatree, 2016).

La *Ambrosia arborescens* es un arbusto que puede medir de 0.50 a 1.50 m de altura, posee a su vez flores masculinas, hermafroditas, estériles y femeninas, sus hojas son de color verde oscuro, con una longitud de 5 a 20 cm, pinnadas y con pelos blanco en el envés, su tallo es erecto (Hinojosa Benavides & Moreno Vigo, 2013).

Klebsiella pneumoniae es una enterobacteria Gram negativo con forma de bacilo, esta pertenece al grupo de coliformes, las misma que generan un gran interés medico debido a que son oportunistas y generan enfermedades infecciosas respiratorias, urinarias, neumonías, entre otras en las población humana (Gómez, 2018).

1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad se ha evidenciado un aumento de enfermedades infecciosas causadas por la bacteria *Klebsiella pneumoniae* pudiendo ocasionar la morbilidad y mortalidad, (González, 2013), siendo potencialmente más susceptibles los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, inmunodeprimidos y en neonatos (Santisteban Larrinaga et al., 2014).

En América la mortalidad en niños menores de cinco años alcanza cifras alrededor de 400 000 muertes por año y más del 40 % ocurren en el período neonatal

(Santisteban Larrinaga et al., 2014). Varios estudios concuerdan que la *Klebsiella pneumoniae* es una bacteria multirresistente a los agentes antimicrobianos, debido a que la misma produce una enzima con acción contra los antibióticos betalactámicos (Cuervo et al., 2014).

Ante esto, se precisa investigar una alternativa mediante principios activos que posean actividad antibacteriana para tratar este tipo de bacteria, y una de estas opciones puede ser el uso de aceites esenciales de las plantas *Moringa oleífera* y *Ambrosia arborescens*.

1.4 JUSTIFICACIÓN

Klebsiella pneumoniae se constituye como el agente patógeno causante de infecciones intrahospitalarias (Padilla Chumacero, 2012). Las bacteriemias por esta cepa se asocian a mayor falla terapéutica, por ende, elevada mortalidad. Algunos estudios reportan una mortalidad del 14% a causa de la bacteria *Klebsiella pneumoniae* no productora de BLEA (β -lactamasas de espectro ampliado) y del 68% para las bacteriemias por KPBLEA+ (Ramírez-Alfaro & Villalobos-Vindas, 2016).

Las infecciones intrahospitalarias provocadas por la *Klebsiella pneumoniae* en la actualidad cada vez son mayores, debido a la resistencia a los antibióticos, las mismas que pueden ser mortales. Como posible solución a esta problemática nacen las investigaciones para encontrar nuevos agentes antimicrobianos. Una de las técnicas de mayor aplicación es el uso de aceites esenciales, que son extraídos de las diferentes partes de las plantas (Nereyda & Saucedo, 2011), por diversos métodos físicos que pueden ser destilación por arrastre de vapor, extracción mediante disolventes, prensado en frío (Argote Vega et al., 2017).

Siendo una alternativa el uso de los aceites esenciales de moringa y altamisa, debido a que poseen propiedades antimicrobianas, los AEs están formados por varias sustancias orgánicas volátiles, pudiendo ser alcoholes, cetonas, ésteres, aldehídos, los cuales se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas (Los Aceites Esenciales, s. f.).

La extracción de los aceites esenciales y la investigación *in vitro* frente a la bacteria *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70693 se realizará en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana, si la respuesta es positiva, posteriormente se podrá utilizar para la formulación de algún producto natural en el tratamiento de afectaciones casuales por la misma.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 GENERAL

Determinar la capacidad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales de moringa (*Moringa oleífera* Lam.) y altamisa (*Ambrosia arborescens* Mill.) estableciendo la concentración mínima inhibitoria frente a la bacteria *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70193.

1.5.2 ESPECÍFICOS

1.5.2.1 Obtener el aceite esencial de moringa (*Moringa oleífera* Lam.) y altamisa (*Ambrosia arborescens* Mill.) mediante arrastre de vapor, para su posterior uso en pruebas *in vitro*.

1.5.2.2 Evaluar las características fisicoquímicas de los aceites esenciales de moringa (*Moringa oleífera* Lam.) y altamisa (*Ambrosia arborescens* Mill.) mediante pruebas de laboratorio para la determinación de la calidad del producto obtenido.

1.5.2.3 Caracterizar la bacteria *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70693 mediante pruebas bioquímicas para verificación de la cepa utilizada.

1.5.2.4 Determinar la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de moringa (*Moringa oleífera* Lam.) y altamisa (*Ambrosia arborescens* Mill.) frente a la bacteria *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70693, mediante el método de Kirby-Bauer (método de difusión en agar) y microdilución en caldo determinando la actividad bacteriana.

1.5 HIPÓTESIS

Los aceites esenciales de moringa (*Moringa oleífera* Lam.) y altamisa (*Ambrosia arborescens* Mill.) tienen efecto antimicrobiano frente a la bacteria *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70693.

CAPITULO 2

2.1 MARCO DE REFERENCIAL

2.1.1 Plantas medicinales

Son vegetales que elaboran metabolitos secundarios, a los cuales se denominan principios activos, estas sustancias poseen acción farmacológica (beneficiosa o perjudicial) sobre un organismo vivo («Plantas medicinales - EcuRed», s. f.), cuyas partes o extractos se utilizan como drogas o medicamentos para el tratamiento de alguna afección o enfermedad que padece un individuo o animal.

2.1.2 Principio activo

Los principios activos son de naturaleza química muy variada. Se puede tener la presencia de varios de estos principios activos en la misma planta, los mismos que, son los responsables de su acción farmacológica (Machín & Rodríguez, 2011).

La actividad de un principio activo varía debido a su naturaleza, pero siempre está relacionada a la cantidad ingerida o absorbida (Rovetto et al., 2010)

2.1.3 Formas de uso de las plantas medicinales

- **Infusión:** llevar el agua a punto de ebullición, verter sobre la planta, tapar y dejar reposar alrededor de diez minutos y finalmente colar.
- **Decocción:** se hierve la planta conjuntamente con el agua durante veinte minutos, se cuela y se ingiere.
- **Maceración:** las plantas se cubren de líquido, agua, aceite, alcohol o vino y se dejan así durante cierto tiempo el mismo que puede variar, dependiendo de la planta ya sea fresca o seca y del líquido utilizado.
- **Tinturas:** en este caso se usa alcohol para extraer las propiedades medicinales de las plantas.
- **Cataplasmas, compresas y emplastos:** se aplican directamente sobre la piel y son muy eficaces para aliviar el dolor.
- **Aceites esenciales:** estos se extraen de las plantas por destilación y son muy potentes.
- **Ungüentos, pomadas y cremas:** a la base extraída de las plantas se les añade aceite, vaselina, lanolina, etc., y se usan en casos de quemaduras, picaduras, contusiones, infecciones de la piel etc.
- **Esencias florales:** contienen la esencia de la planta y son muy eficaces a nivel emocional y energético (Arcas, 2018).

2.1.4 Importancia de las plantas medicinales

Las plantas medicinales poseen una gran importancia a nivel de salud, debido a que contienen principios activos que pueden contrarrestar varias enfermedades. Todas

sus partes son aprovechadas en diversos preparados como son las infusiones, macerados, jarabes, jugos entre otros. Las plantas medicinales son apreciadas por su bajo costo y por los reducidos índices de toxicidad, en comparación con los productos de síntesis (Gallegos-Zurita, 2016).

2.1.5 Plantas medicinales en el Ecuador

En el mundo se han registrado más de 28 000 plantas con poderes medicinales de las cuales 3 200 están en Ecuador, según estudios revelan que el 80% son nativas y las restantes fueron introducidas al país (Flores, s. f.), las mismas, que se utilizan en la medicina tradicional que es desarrollada y utilizada por las poblaciones de la región andina y puede ser una solución a varios problemas de salud (Philippe, 2014).

Los saberes ancestrales son transmitidos de generación en generación con el fin de utilizar las propiedades curativas que brindan las plantas para tratar, prevenir y curar enfermedades que afectan a la población.

Según estudios realizados, la información registrada proporciona los siguientes datos respecto al uso de plantas medicinales en el Ecuador, siendo los grupos étnicos los principales usuarios en cuanto a variedad de especies como: los Kichwas en la Amazonía, presentan el mayor número de especies (26%), seguido por los Kichwas de la Sierra (18%) y los mestizos de la Costa y Galápagos con el (14%). En la Azuay se registra 1575 especies de plantas utilizadas por la sociedad (Navia-Barzola, 2014).

En la sociedad ecuatoriana existe desconocimiento de las propiedades que poseen las plantas medicinales, sus formas de empleo y modos de aplicación. Para avanzar en el conocimiento se realizan estudios etnobotánicos que son de gran relevancia en los últimos años, ya que varias compañías farmacéuticas están interesadas en las plantas como un gran potencial, para la obtención de fármacos de origen natural que son

útiles en el tratamiento de las enfermedades que más afectan a las comunidades (Escalona Cruz, Tase Aguilar, Estrada Martínez, & Almaguer Mojena, 2015).

2.1.6 Botánica de las especies vegetales

Las características y aspectos más selectos de las especies vegetales en estudio se presentan a continuación.

2.1.6.1 Moringa (*Moringa oleifera*)

Árbol perteneciente a la familia Moringaceae, es nativa de las estribaciones meridionales del Himalaya y en la actualidad se cultiva prácticamente en todas las regiones tropicales, subtropicales y semiáridas del mundo. Puede crecer en condiciones de escasez de agua (Foidl et al., 2001).

Las hojas son excepcionalmente ricas en vitaminas y diferentes aminoácidos, por lo que se recomiendan para tratar problemas de malnutrición en niños (Fuglie, 2001). También se emplean como forraje, biopesticida y para la producción de biogás (Fahey, 2005). Las semillas se utilizan en la alimentación, la medicina, el tratamiento de aguas y como fertilizantes (Foidl et al., 2001). La corteza del tronco es útil en la adsorción de metales pesados (Reddy et al., 2011), así como para la fabricación de cuerdas y alfombras (Ramachandran et al., 1980).

El aceite se usa en las industrias dedicadas a la elaboración de perfumes, en la de cosméticos como lubricante, en la alimentación humana y en la producción de biodiesel (Rashid et al., 2008). Las cascarillas de las semillas sirven de materia prima para la producción de carbón activado y de intercambiadores aniónicos. La planta también se emplea como cerca viva o cortina rompevientos, mientras que la biomasa lignocelulósica del tronco y de las ramas puede ser utilizada como material de construcción y para producir pulpa celulósica y etanol (Fahey, 2005).

- **Taxonomía**

Nombre Científico: *Moringa oleífera* Lam.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Brassicales

Familia: Moringaceae

Género: Moringa

Especie: *Moringa oleífera* Lam.

(Sherwin & Olson, 2012)



Ilustración 1 Estructuras de la especie vegetal de moringa.

(Sherwin & Olson, 2012)

- **Composición química**

La corteza de la raíz contiene afomina y espiraquina. Las semillas y la raíz contienen 4 (a-L-ramnosiloxi) benzilisocianato y pterigospermina. El aceite contiene ácido palmítico, esteárico, benoptérico y morínico (Sherwin & Olson, 2012).

La semilla contiene aceite fijo (21%): ácidos oleico (67.5%), esteárico (10.5%); bencenoides: (α -L-ramnosil-oxi) fenil-acetonitrilo, 4-hidroxi-fenilacetónitrilo y 4-

hidroxifenilacetamida, moringina, niazirina, derivados de bencil-carbamatos; misceláneos: niazimicina; compuestos sulfurados: bencil-4-rhamnosil-oxi-glucosinolato, pterigospermina, 4-(α -L-rhamnosil-oxi)-bencil isocianato y derivados; esteroides: derivados de daucosterol (Tramil, 2017).

La hoja contiene bencenoides: derivados de bencil-carbamatos y benciltiocarbamatos; alcaloides: colina, ácido nicotínico; flavonoides: gossipitina, quercetina y derivados, rutina; compuestos sulfurados: derivados de isotiocianato; misceláneos: niazicina A, B, niazimina A, B (Tramil, 2017).

- **Aplicaciones**

- Alimentación humana: valor nutritivo, vitamínico y mineral
- Usos medicinales: tos, fiebre, vómitos, etc.
- Prevención del cáncer
- Actividad antiinflamatoria
- Actividad antioxidante
- Actividad antimicrobiana
- Actividad hipoglucemiante y antihipertensiva (Martín & García. 2013).

2.1.6.2 Altamisa (*Ambrosia arborescens*)

Planta perenne de hasta 1 m de altura, muy ramificada, tallos erectos, con ramas herbáceas, flexibles de olor muy fuerte, característico y agradable. Toda la planta está cubierta de una pubescencia fina de color verde grisácea. Hojas alternas, trilobuladas las inferiores y bilobuladas las superiores; las inferiores son más grandes que las superiores, foliolos lanceolados; aromáticas, con haz verde grisáceo y envés gris blanquecino. Flores amarillas agrupadas en panículas terminales, de numerosas cabezuelas globosas pendulares. Fruto tipo aquenio (Fonnegra, 2016).

Usos en medicina tradicional: se emplea para tratar trastornos gástricos y biliares, se usa como digestivo, estimulante de la secreción de jugos gástricos, estimulante cardíaco, digestivo, contra cólicos y parásitos intestinales, antiséptico, carminativo, emenagogo, colagogo, amargo, antiespasmódico, para curar resfriados, reumatismo, es estimulante uterino y calma el dolor durante el parto (Fonnegra, 2016).

- **Taxonomía**

Nombre Científico: *Ambrosia arborescens* Mill.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Tribu: Anthemideae

Género: Artemisia

Especie: *Ambrosia arborescens* Mill.



Ilustración 2 Planta de altamisa.

Fuente: Autor

2.2 ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales (AEs) son componentes secundarios de las plantas, generalmente de naturaleza volátil. Se caracterizan de acuerdo con sus múltiples composiciones químicas, naturaleza y propiedades bio-activas. La concentración y tipo de AE en las plantas varía por especie y segmento de la planta principalmente. La función principal de los AEs es brindarle a la planta protección contra agentes estresantes abióticos y bióticos, y en algunas ocasiones atraer a otros organismos para favorecer la polinización y dispersión de sus semillas (Raygoza et al., 2014).

2.2.1 Localización y principales propiedades físicas de los aceites esenciales

Los aceites esenciales pueden localizarse en glándulas, semillas, sacos, venas y/o pelos glandulares de diversas partes de las plantas.

Estos son altamente volátiles, poseen un aspecto oleoso, los mismos son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos (aceites, éter y alcohol).

Los aceites debido a su composición son: inflamables, responsables de los colores, aromas y sabores de las plantas, pueden ser en ocasiones dulces y otras amargas, su densidad generalmente es inferior a la del agua, se componen principalmente de hidrocarburos de la serie polietilénica del grupo de los terpenos, casi siempre oxigenados (Casado-Villaverde, I., 2018).

2.2.2 Rendimiento

En la literatura de los AEs se lo define como el cociente entre la masa del aceite esencial obtenido respecto a las masas de materia prima vegetal introducida inicialmente (Casado-Villaverde, I., 2018).

El contenido de aceite esencial de la mayoría de las plantas varía 0.01 a 10%. En las plantas aromáticas la cantidad media es alrededor de 1 a 2%. El contenido puede aumentar después de la lluvia y alrededor del mediodía.

2.2.3 Métodos de extracción para los aceites esenciales

Existen varios métodos físicos y químicos para la obtención de aceites esenciales (tabla 1), los mismos que dependen de la variabilidad de la materia vegetal, estabilidad del aceite esencial, parte de la planta que se va a emplear, en donde la correcta aplicación determina la calidad del producto final.

Tabla 1 Métodos de extracción de aceites esenciales.

Tipo de método	Procedimiento	Productos obtenidos
Métodos directos	Extrusión	Aceites esenciales cítricos
	Exudación	Resinas, gomas, bálsamos
Destilación	Directa	
	Destilación - maceración	Aceites esenciales y aguas aromáticas
	Arrastre con vapor de agua	
Extracción con solventes	Solventes volátiles	Infusiones y resinoides alcohólicos
		Concretos y absolutos
	Solventes fijos	Absolutos de pomadas
		Absolutos de enflorados
	Extracción con fluidos en estado supercrítico	

Fuente: (Bandwolf, & Salcedo. s.f.)

2.2.3.1 Destilación

Es la técnica más utilizada para la extracción de los aceites esenciales debido a que es un proceso fácil y barato, consiste en separar sustancias volátiles por medio del calor (Nature, S., 2014) es un proceso físico en el cual, no se produce ningún tipo de transformación a la sustancia (Ramírez, s. f.).

En general los componentes del equipo de destilación para extraer aceite esencial son:

- Fuente de energía
- Destilador

- Intercambiador de calor
- Decantador

2.2.3.2 Destilación por arrastre con vapor de agua

Es el proceso más común, ya que es fácil, de bajo costo y sus resultados son más constantes y reproducibles. Para la obtención del aceite esencial, esta técnica aprovecha la propiedad que poseen las moléculas de agua en estado de vapor para asociarse con moléculas de aceite (Bandwolf, & Salcedo, s.f.).

2.2.3.3 Destilación con agua o hidrodestilación

En esta técnica se sumerge la materia vegetal, generalmente en polvo, con el agua, se procede a calentar hasta que hierva, con el objeto de que el vapor ejerza la acción en el mayor número de partículas vegetales. Presenta un inconveniente con respecto los demás tipos de extracción y es que provoca que algunos compuestos presentes se degraden o pierdan por la temperatura empleada (Albarracín-Montolla., & Gallo-Palma, 2003).

2.2.3.4 Maceración en grasa.

Es un proceso de extracción sólido-líquido del cual se obtiene oleomacerados o macerados en aceite caliente, generalmente se aplica para obtener el aceite de los pétalos de las flores y finalmente se extrae las esencias con alcohol (Bandwolf, & Salcedo, s.f.).

2.2.3.5 Extracción con solventes volátiles

Los disolventes orgánicos poseen una gran capacidad para penetrar en el material vegetal y disolver los aceites volátiles, se trabaja a temperaturas bajas debido a que el punto de ebullición es diferente en las materias usadas, por lo que no se produce una

termo destrucción ni alteración química de los compuestos químicos de aceite (Bandwolf, & Salcedo, s.f.).

2.2.3.6 Extracción por fluidos supercríticos

Se usa sustancias químicas en condiciones especiales de temperatura y presión. El material vegetal se corta y se licua, en un cámara de acero inoxidable circula un líquido supercrítico, finalmente el líquido supercrítico se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente y el aceite se solubiliza y se obtiene puro (Bandwolf, & Salcedo, s.f.).

2.3 Capacidad antimicrobiana

Los efectos antimicrobianos identificados están relacionados con los componentes químicos presentes en los aceites esenciales, para evaluar su efecto inhibitorio incluyen métodos como: dilución, difusión, caja Petri invertida y cámara hermética. La técnica más utilizada para determinar y cuantificar los componentes químicos es la cromatografía.

2.4 Determinación de las características fisicoquímicas de los AEs

2.4.1 Características organolépticas

Se describen el olor, color, sabor y aspecto de los aceites esenciales, estas características físicas definen la calidad y orientan sobre las posibles aplicaciones industriales (Bandwolf, & Salcedo, s.f.).

2.4.2 Determinaciones físicas

2.4.2.1 Densidad a 20 °C

Es una magnitud escalar referida a la cantidad de masa en un determinado volumen de una sustancia. Para obtener la densidad se utiliza la siguiente fórmula: $\rho = \frac{m}{V}$.

Donde m es la masa y V es el volumen (Puerta, et al., 2015).

2.4.2.2 Miscibilidad en etanol

Permite definir la calidad del AE, es decir contribuye a detectar adulteraciones provocadas por la adición de aceites vegetales o minerales, que son insolubles en alcohol (Bandwolf, & Salcedo., s.f.), esta técnica se realiza a 20 °C, con etanol al 70%, 75%, 80%, 85%, 90% y 95% (Plaza, M., & Ricalde, M., 2015).

2.4.2.3 Punto de congelación

Se realiza esta prueba con el fin de determinar y separar componentes de distinto punto de solidificación (Bandwolf, & Salcedo, s.f.).

2.4.2.4 Viscosidad

Es la resistencia de una parte del fluido que se mueve en relación a otro, en los aceites esenciales tienen relación directa con algún producto químico característicos de los lípidos, como son la longitud de la cadena de los ácidos grasos que constituyen los triglicéridos y el grado de insaturación (Soto V., 2011).

2.4.3 Determinación química

pH: indica el grado de acidez del aceite esencial, este puede ser muy variable generalmente si estas están expuestas a la acción del aire y la luz la acidez crece lentamente al principio y con rapidez después, estos no deben sobrepasar el límite dado ya que se considera como impureza en la grasa («Índice de Acidez», s. f.)

2.4.4 Análisis cromatográfico

La cromatografía de gases permite separar los componentes de una muestra vaporizada en virtud de que éstos se distribuyen entre una fase gaseosa móvil y una fase estacionaria líquida o sólida contenida en una columna (Parrales et al., s. f.), este permite identificar los componentes químicos de una muestra, se trabaja en un amplio rango de temperaturas (-70 a 400 °C). La muestra para analizar deber ser volatilizada

antes de ingresar a la columna cromatográfica, en esta técnica se pueden presenciar los fenómenos de adsorción y de partición, esta técnica es usada para el análisis cuantitativo (Reyes-Juraso, F, Palou, E, & López-Malo, A., 2014).

2.5 BACTERIA *Klebsiella pneumoniae*

Es un tipo de bacteria que forma parte de la flora normal gastrointestinal, sin embargo, su importancia médica radica debido a que es una bacteria oportunista, es decir que frente a pacientes inmunológicamente comprometidos pueden producir enfermedades nosocomiales como infecciones respiratorias, urinarias, neumonías, etc. Las cepas de *Klebsiella pneumoniae* tienen el potencial para causar morbilidad y mortalidad, particularmente en las unidades de cuidados intensivos pediátricos y servicios quirúrgicos (González, 2013).

Klebsiella pneumoniae es productora de las enzimas β -lactamasas de espectro extendido, las mismas que son capaces de hidrolizar las cefalosporinas de amplio espectro y los monobactámicos (González et al., 2013). Esta bacteria posee un mecanismo resistente a los antibióticos β -lactamasas por lo que representa una grave amenaza a la salud pública, debido al crecimiento alarmante del número de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a los carbapenems, los cuales son fármacos para los patógenos productores de BLEE (Bailón & Sacaquispe, 2013).

2.5.1 Taxonomía

Nombre científico: *Klebsiella pneumoniae*

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *klebsiella* («Klebsiella pneumonia - EcuRed», s. f.)

2.5.2 Morfología

Son bacilos Gram negativos de la familia Enterobacteriaceae (Bailón & Sacaquispe, 2013), con un tamaño entre 0.50 μm , y 2.0 μm , forma endosporas y no presenta flagelo, por lo que es inmóvil (Microbitos, 2015).

2.5.3 Metabolismo

Son microorganismos facultativos anaerobios, crecen favorablemente a temperaturas entre 30 °C y 37 °C. Poseen la enzima catalasa, ureasa, fermenta muchos carbohidratos, como la lactosa, por lo tanto, son capaces de formar ácidos fuertes en sus procesos metabólicos.

2.5.4 Hábitat

Se encuentra en humanos y otros animales, en aguas residuales y suelos contaminados (Bagley, 1985).

2.5.5 Aislamiento

Se pueden aislar de varios lugares, ya que se encuentran en forma natural en el agua, verduras y en el suelo, la parte beneficiosa de esta bacteria es que posee la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico para un mejor aprovechamiento por parte de las plantas.

En los humanos, puede ser aislada de la faringe, la piel y del tracto gastrointestinal (Jeronimo, 2013).

2.5.6 Importancia de la *Klebsiella pneumoniae*

Es un patógeno muy importante, pues se ha implicado en infecciones en entornos de atención médica, su tratamiento se ha vuelto más difícil como consecuencia de la

propagación y aparición de nuevas cepas resistentes a múltiples antimicrobianos (Moradigaravand, Martin, Peacock, & Parkhill, 2017).

2.5.7 Transmisión de la *K. pneumoniae*

La bacteria puede transmitirse de diferentes formas por equipos médicos y hemoderivados, pueden transportarse dentro del tracto intestinal de los pacientes y en la superficie de la piel del personal del hospital, las fuentes que actúan como reservorio de la misma son: los alimentos y animales (Moradigaravand et al., 2017).

2.6 Medios de cultivo

Existe varios medios de cultivo en la actualidad, los cuales se clasifican en cuatro grupos generales: 1) medios no selectivos enriquecidos, 2) medios selectivos, 3) medios diferenciales y, 4) medios especializados (Anexo 5).

2.7 Características de medios de cultivos utilizados para la verificación y pruebas de sensibilidad de la bacteria *K. pneumoniae* (Anexo 3)

2.8 Métodos de estudio de sensibilidad bacteriana

Para realizar las pruebas de sensibilidad, se cuenta con los métodos siguientes:

- Difusión en agar
- Dilución en agar
- Macrodilución en caldo
- Microdilución en caldo
- Épsilon test (Herrera, 1999)

2.8.1 El método de Kirby-Bauer (método de difusión en agar)

La difusión con disco es una de las técnicas más antiguas para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos y sigue siendo la más utilizada en la rutina de los laboratorios clínicos. Esta técnica es adecuada para la evaluación de la mayoría de

los patógenos bacterianos incluyendo los microorganismos exigentes más frecuentes, permite el estudio de una gran diversidad de antimicrobianos y no requiere un material especial (Rodero et al., 2006).

Se fundamenta en un disco que tiene una cantidad específica de antimicrobiano que es aplicado en la superficie inoculada con el microorganismo. El antimicrobiano se difunde desde el disco al medio de cultivo produciendo una zona de inhibición, la misma que es medida y se relaciona inversamente con la concentración mínima inhibitoria (Método de difusión en agar según Kirby Bauer, s.f.).

2.8.2 Dilución en agar

Consiste en realizar varias concentraciones, generalmente al doble de un antimicrobiano, cada una de ellas se mezcla con agar al 50 °C, se vierte en la caja Petri y deja solidificar (García, R., et al., 2000), posteriormente se coloca alrededor de 20 µL de inóculo estandarizado en el agar con el antibiótico. Si se observa el crecimiento de la cepa en la superficie, se reporta como resistente a esa concentración del antibiótico, de lo contrario si no crece se reporta como sensible a la concentración (Herrera, 1999).

2.8.3 Macrodilución en caldo

Esta técnica no se utiliza en la actualidad debido a que se maneja grandes cantidades de material, al igual que presenta problemas para la detención de contaminación en el medio, por lo que podría producir una falsa resistencia (Herrera, 1999). Sin embargo, la técnica e interpretación que se utiliza es la misma de la micro dilución.

2.8.4 Método de microdilución

El método de micro dilución en caldo es una técnica útil para determinar la CMI, en un gran número de muestras. La ventaja sobre los métodos de difusión radica en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, además permite diferenciar entre un efecto bactericida o bacteriostático (Ramírez, 2009).

En este método se utilizan pocillos con medios líquidos, los mismos que contienen concentraciones crecientes del AE diluido en el caldo, en los que se inoculan un número definido de células bacterianas, el volumen final es de máximo de 500 μ L por pocillo. Se realiza la incubación de 16-24 horas, esto depende del microorganismo con el cual se está trabajando, si se puede apreciar sedimentación o turbidez en los pocillos indica crecimiento del microorganismo. Finalmente, para verificar la inhibición, se toma alícuotas de los pocillos sin turbidez y se siembra en agar, obteniendo la CMI al determinar la concentración más baja que implica crecimiento visible de los organismos (Reyes-Juraso, F, Palou, E, & Lopez-Malo, A., 2014).

2.8.5 Épsilon test

Este método en la actualidad es uno de los más utilizados debido a su fácil implementación y lectura, esta técnica involucra el inóculo del microorganismo, el mismo que se coloca en la superficie del agar previamente preparado, seguido de la aplicación de una tira plástica impregnada con un gradiente de antibiótico, lo cual permite la CMI Posteriormente se vincula a 37 °C por 24-48 h, generándose una elipse de inhibición que permite obtener le CMI (Zapata-González, F., & Cardona-Castro, N. 2012).

CAPITULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 RECURSOS

La presente investigación se desarrolló en la Universidad Politécnica Salesiana / Sede-Cuenca, en los laboratorios de Ciencias de la Vida, específicamente en el área de microbiología, en relación con la bacteria *K. pneumoniae* ATCC 70693 fue proporcionada por la UPS, y los aceites esenciales fueron obtenidos mediante destilación por arrastre de vapor en la universidad.

3.2 Obtención del aceite esencial de moringa (*Moringa oleífera* Lam.) y altamisa (*Ambrosia arborescens* Mill.)

3.2.1 Extracción de los aceites esenciales por arrastre de vapor

Las partes usadas de la planta de *Moringa oleífera* fueron recolectadas en el cantón Arenillas, situada en la provincia de El Oro, mientras que la *Ambrosia arborescens* se recolectó en el cantón Sevilla de Oro, perteneciente a la provincia del Azuay. Las hojas recolectadas de las especies antes mencionadas se clasificaron, lavaron, posteriormente, se realizó la destilación por arrastre de vapor, utilizando el hidro destilador industrial. Se recoge el producto que sale del hidro destilador en decantadores, se deja reposar por 24 horas y se realiza la decantación para obtención del aceite esencial de la de moringa (*Moringa oleífera* Lam.) y altamisa (*Ambrosia arborescens* Mill.).

Se centrifuga el aceite en tubos cónicos para obtener una mejor separación del aceite y del agua, posterior a esto se pasa por-un filtro de 0.45 μm .



Ilustración 3 Hojas de moringa (*Moringa oleífera* Lam.) y altamisa (*Ambrosia arborescens* Mill.).

Fuente: Autor

3.3 Evaluación de las características fisicoquímicas de los aceites esenciales de moringa (*Moringa oleífera* Lam.) y altamisa (*Ambrosia arborescens* Mill)

3.3.1 Características organolépticas

Para la determinación de las características organolépticas de los aceites esenciales se realizó la prueba de apariencia, color y olor, el mismo que permite observar posibles alteraciones, cuerpos extraños, etc. (Albaladejo-Meroño, Q. 1999)

3.3.2 Determinaciones físicas

3.3.3 Densidad a 20 °C

Se pesa en gramos el aceite obtenido, luego se mide el volumen del aceite producido. Una vez obtenido estos datos se procede a la aplicación de la fórmula (1 F) con la cual se obtiene la densidad.

$$1 F \quad p = \frac{m}{v}$$

m= masa

v= volumen

p= densidad

3.3.4 Miscibilidad en etanol.

Se colocó en un tubo cónico AEA y AEM, posteriormente se añadió el etanol a 95% agitándolo constantemente hasta obtener una solución transparente.



Ilustración 4 Prueba de miscibilidad en alcohol.

Fuente: Autor

3.3.5 Punto de congelación

Se transfirió a un tubo cónico AEA y AEM, se dispuso a una temperatura menor a 6 °C, tomando el tiempo en el cual cambia del estado líquido a sólido.

3.3.6 Viscosidad

Se coloca en un tubo de ensayo un 1 mL de agua, posteriormente se toma el tiempo que tarda en recorrer el producto desde un punto a hasta el punto b, luego se realiza el mismo procedimiento con los aceites esenciales, esta prueba se ejecuta a temperatura

ambiente entre 20 °C y 25 °C, una vez que ya se obtuvieron los tiempos se procede con el cálculo de la viscosidad absoluta mediante la siguiente fórmula (2 F).

2 F

$$\eta_2 = \frac{\eta_1 \rho_2 t_2^2}{\rho_1 t_1^2}$$

η_2 : Viscosidad absoluta del aceite

η_1 : Viscosidad absoluta del agua

ρ_2 : Densidad del aceite

ρ_1 : Densidad del agua

t_2 : Tiempo de flujo del aceite

t_1 : Tiempo de flujo del agua

3.4 Análisis químico

Los análisis químicos ejecutados en los aceites esenciales tienen como finalidad caracterizar a los mismos, permitiendo conocer factores fundamentales para su utilización.

3.4.1 pH

Se introdujo en el aceite el papel pH el mismo que es indicativo, posteriormente se realiza la comparación con la escala de pH («Papel Tornasol o Papel PH» TP - Laboratorio Químico», s. f.) obteniendo el pH de las sustancias analizadas.

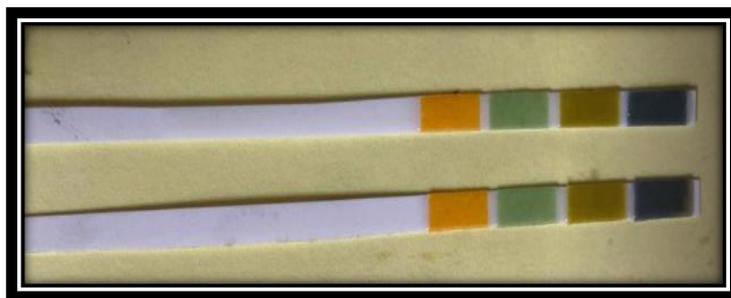


Ilustración 5 Visualización de las tiras del pH.

Fuente: Autor

3.4.2 Análisis cromatográfico de los AEs

En la preparación de las muestras se utilizó 10 μL de AE en 990 μL de hexano, realizando así una dilución, esto se efectuó en un vial ámbar, finalmente se colocó en equipo CG/MS para el análisis correspondiente, el mismo se ejecutó por triplicado (Ilustración 6).



Ilustración 6 Equipo de cromatografía de gases acoplado a masas y muestras preparadas de los AEs.

Fuente: Autor

3.5 Caracterización de la bacteria *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70693

3.5.1 Prueba de citrato

Para realizar la prueba correspondiente se utilizó *K. pneumoniae* ATCC 70693, sembrada el día anterior a 37 °C. Previamente se esterilizaron tubos con el medio de cultivo citrato de Simmons. Con la ayuda de un asa bacteriológica estéril se tomó una UFC del cultivo, se procedió a estriar en la superficie del medio y se incubó de 24 – 72 horas a 37 °C.

3.5.2 Prueba de motilidad

Para la siembra del inóculo bacteriano para las pruebas bioquímicas, se utilizó *K. pneumoniae* ATCC 70693, sembrada el día anterior a 37 °C. Previamente se esterilizaron tubos con el medio de cultivo SIM. Con la ayuda de un asa bacteriológica estéril se tomó una UFC del cultivo, se procedió a punzar una vez en la superficie del medio y se incubó de 24 - 72 horas a 37 °C.

3.5.3 Prueba de Ureasa

Se utilizó *K. pneumoniae* ATCC 70693, sembrado el día anterior a 37 °C. Previamente se esterilizaron tubos con el medio de cultivo ureasa. Con la ayuda de un asa bacteriológica estéril se tomó una UFC del cultivo, se procedió a estriar en la superficie del medio y se incubó de 24 - 72 horas a 37 °C.

3.5.4 Prueba de oxidasa

Se tomó una muestra de la bacteria *K. pneumoniae* ATCC 70693, sembrado el día anterior a 37 °C. Con la ayuda de un asa bacteriológica se colocó en un disco impregnado con el reactivo de Kovacs incoloro durante 30 segundos para la observación el resultado con el cambio de coloración.

3.5.5 Prueba de lactosa

Se realizó la siembra de la *K. pneumoniae* ATCC 70693, en el medio de cultivo MacConkey, con la ayuda de un asa bacteriológica estéril se tomó una UFC del cultivo, se procedió a estriar en la superficie del medio y se incubó durante 48 horas a 37 °C. posteriormente se observa la coloración para la determinación del resultado positivo o negativo.

3.5.6 Prueba de catalasa

Se colocó una gota de peróxido de hidrógeno en el portaobjetos, con la ayuda de un asa bacteriológica estéril se tomó una muestra de *K. pneumoniae* ATCC 70693, y se mezcló con lo anterior, se observó el resultado, en este caso es positivo si se presenta burbujeo.

3.5.7 Prueba de rojo de metilo y Voges Proskauer

Se siembran la *K. pneumoniae* ATCC 70693 en dos tubos de tapa rosca con el medio RM-VP previamente preparado, con la ayuda de un asa bacteriológica esterilizada se toma una muestra y se realiza el cultivo, incubando por 24 a 48 horas a 35 °C.

En uno de los tubos se le adicionó 5 gotas de la solución indicadora, en este caso rojo de metilo, se homogenizó y se observó la coloración que se presenta, si vira al rojo es positivo, si mantiene el color amarillo es negativo. En cuanto a la prueba de Voges Proskauer se tomó el segundo tubo y se le añadió 0.6% del reactivo A Alfa-naftanol 5% en alcohol etílico absoluto, visualizando un aspecto lechoso en el medio, luego se coloca 0.2 mL del reactivo B KOH 40% agitando fuertemente. Desaparece el aspecto lechoso y se agita nuevamente.

Si la prueba es positiva, antes de cinco minutos aparece un color rosado-violáceo, más o menos intenso, que se inicia en la parte superior del tubo. Si la prueba es negativa no aparece coloración alguna (MR-VP Medio, s.f.).

3.5.8 Tinción de Gram

Con la ayuda de una asa bacteriológica se colocó una colonia de bacterias en el portaobjeto, se fijó la muestra y se procedió a empapar lo anterior con cristal violeta por un minuto, se enjuagó con abundante agua, se colocó el yodo dejándolo actuar por un minuto y al igual se enjuagó, una vez realizado esto se procedió a colocar el decolorante por 10 a 30 segundos, se retiró el decolorante con abundante agua, se empapó con el colorante en este caso safranina y se dejó actuar por 45 segundos y luego se enjuagó.

Se secó el portaobjeto, con la muestra preparada y se observó en el microscopio.

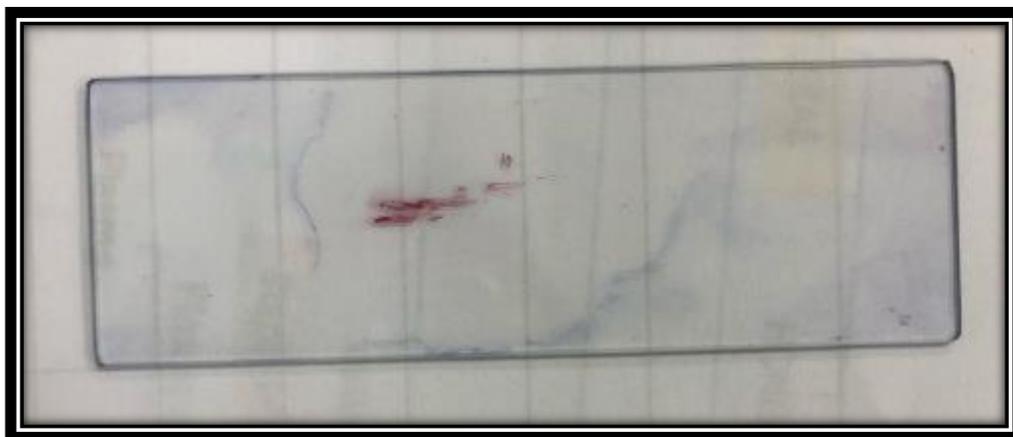


Ilustración 7 Placa lista para la observación en el microscopio.

Fuente: Autor

3.6 Comparación de la actividad antimicrobiana de los AEs mediante pruebas de sensibilidad por discos

3.6.1 Estandarización del inóculo

Método de suspensión directa de colonias o Kirby-Bauer modificado

A partir de una placa con un medio de cultivo no selectivo incubado durante 18 horas a 35 °C con la bacteria (Método de difusión con discos, 2012), con la ayuda de una asa bacteriológica estéril se tomó de 4 a 5 colonias y se suspendieron en el tubo de ensayo previamente esterilizado con 10 mL de suero fisiológico estéril, se procedió a agitar con el Vortex durante 15 segundos, el inóculo se ajustó a la turbidez de McFarland 0.5 que equivale 1.5×10^8 ufc/mL (Tacoro, R., Seija, V., & Vignoli, R, s. f.), para verificación de la densidad del estándar se usó el equipo Genesys 20 el cual se ajustó la absorbancia a una longitud de onda de 645 nm la misma que puede presentar un valor entre 0.08 a 0.1 (Unknown, 2016).

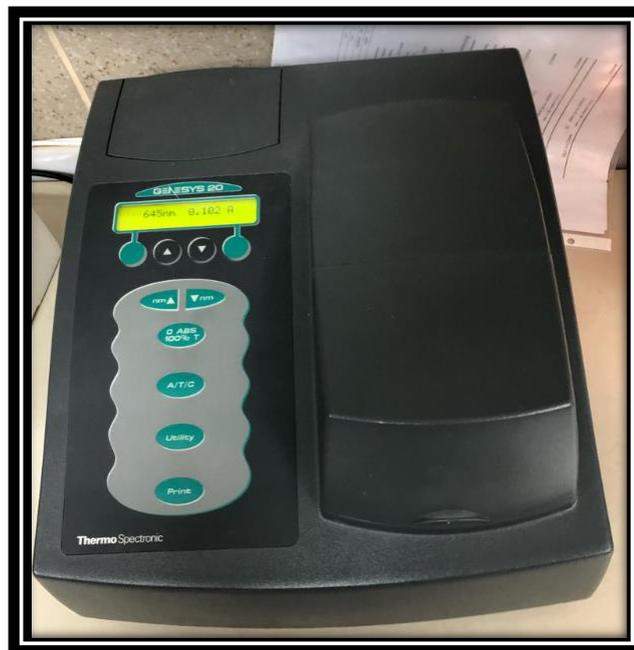


Ilustración 8 Medición de la absorbancia con el equipo GENESYS 20.

Fuente: Autor

3.6.2 Preparación de las diferentes disoluciones de los aceites esenciales al 5%, 35%, 75% y al 100% de moringa y altamisa

Se empezó con la concentración de aceites esenciales al 5%, mediante la disolución de 1.75 μL de aceite esencial en un tubo que contenía 33.25 μL de dimetilsulfóxido (DMSO), para la siguiente concentración de 35% se diluyó 12.25 μL en 22.75 μL de DMSO, para la concentración del 75% se diluyó 26.25 μL de AE en 8.75 μL de DMSO y al final el del 100%.



Ilustración 9 Disoluciones de los AEs en diferentes concentraciones.

Fuente: Autor

3.6.3 Preparación de los discos y placas para la inoculación

Se retiraron los discos de sensibilidad de Amoxicilina-clavulánico del congelador para el antibiograma, debido a que estos deben estar a temperatura ambiente con el objetivo de evitar la humedad que puede afectar la concentración de los agentes antimicrobianos (García, R., et al., 2000).

Se colocó el medio de cultivo Agar Mueller-Hinton previamente preparado en las placas Petri, teniendo en cuenta que la profundidad idónea es de 4 mm, para evitar el

exceso de humedad se dejó las tapas entreabiertas por un lapso de 10 min a 20 °C, todo esto se realizó en la cámara de flujo para evitar contaminación.

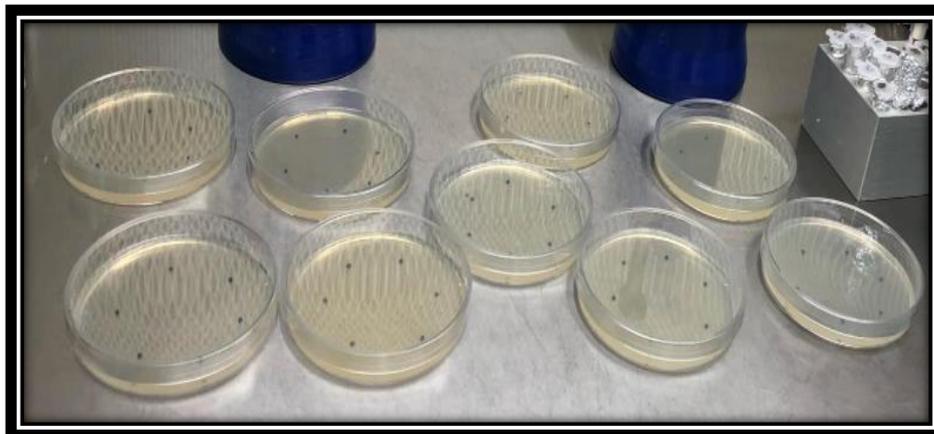


Ilustración 10 Placas lista para la incubación.

Fuente: Autor

3.6.4 Inoculación de las placas

Antes de que transcurrieran 15 minutos de haberse estandarizado el inóculo, se introdujo el hisopo estéril embebiéndolo completamente con la suspensión, luego se estrió con este en forma paralela por toda la superficie de la placa del agar Mueller-Hilton tres veces, rotando la misma unos 60° cada vez, llegando de borde a borde, se deja secar por 5 minutos antes de depositar los discos. Este proceso se realiza con el fin de obtener un crecimiento confluyente, sin dejar ninguna zona libre y evitar dificultades posteriores al realizar la lectura (Coedova, M., & Loayza, R. 2014 y Tacoro, R., Seija, V., & Vignoli, R. s. f.).

3.6.5 Distribución de los discos

Se distribuyó los discos a una distancia de 15 mm del borde de la placa, situándolos de forma que no haya superposición de los halos de inhibición, estos se colocaron con una pinza estéril comenzando con el de control positivo (disco de sensibilidad), después los discos de control negativo (agua estéril y DMSO),

posteriormente se procedió a situar los discos embebidos con las diferentes disoluciones del aceite esencial, luego de quedar en el agar se presionó levemente para que queden adheridos al mismo. Se sellaron las placas, y se procedió a incubar por 24 horas a 37 °C.

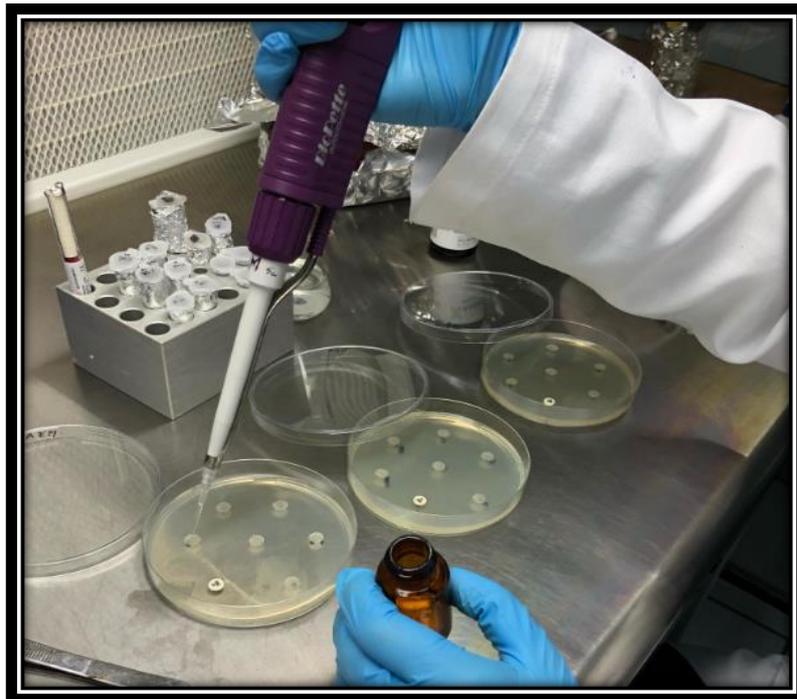


Ilustración 11 Colocación de los discos.

Fuente: Autor

3.6.6 Medición de los halos

Luego de la incubación se procedió a medir el diámetro de los halos de inhibición.

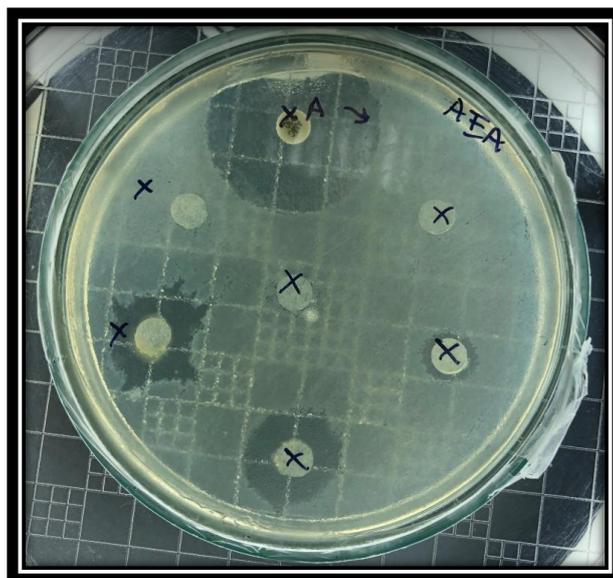


Ilustración 12 Placa con halos de inhibición.

Fuente: Autor

Tabla 2 Diámetro crítico para *K. pneumoniae* en CMI.

<i>Antibiótico</i>	<i>Contenido del disco (µg)</i>	<i>Estándar interpretativo</i>		
		<i>Diámetro (mm)</i>		
		<i>S</i>	<i>I</i>	<i>R</i>
<i>Amoxicilina-ácido clavulánico</i>	20/10	≥ 18	14 – 17	≤ 13

Nota: Las letras poseen la siguiente interpretación con respecto al estándar del diámetro: S (sensibles), I (Intermedio) y R (resistencia).

Fuente: (Andrews & Howe, 2011; «Table 1 Antibiotics and critical diameters», s. f.)

3.7 Concentración mínima inhibitoria de los AEs por medio del método microdilución en el caldo.

3.7.1 Preparación del inóculo

Se preparó la suspensión bacteriana en una solución salina al 0.9% de una concentración 1.5×10^4 ufc/mL (la suspensión se preparó a partir de una 0,5 McFarland).

3.7.2 Preparación del control positivo

Como control positivo se utilizó el antibiótico comercial amoxicilina/ácido clavulánico (concentración 875 mg/125 mg), cada comprimido contiene en total 1000 mg de los agentes antes mencionados, este se suspendió en 20 mL de suero fisiológico al 0,9%, el concentrado resultante es de 50 mg/mL.

Para la investigación se requiere una concentración de 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para llegar a esta concentración se utilizó la siguiente fórmula:

$$C1V1 = C2V2$$

Donde:

C1: Concentración inicial

V1: Volumen inicial

C2: Concentración final

V2: Volumen final

3.7.3 Microdilución

Para este método se emplearon placas de 96 pocillos con fondo plano, la misma que está compuesta por 12 filas y 9 columnas. En la preparación se usó la doble dilución para obtener las concentraciones deseadas. El inóculo se estandarizó al patrón de 0.5 McFarland, el inóculo final que se usó es de 1.5×10^4 o 1.5×10^5 UFC/pocillo.

Una vez terminada la microplaca se incubó a 37 °C de 18 a 24 horas.

Luego de haber transcurrido las 24 horas de incubación se adiciona una solución de resazurina, se incuba por 2 horas para la revelación del CMI que indica cual es la mínima cantidad de antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en condiciones normalizadas. Se determina el CMI observando el viraje de color que presenta la resazurina en el control positivo con los demás pocillos que contienen el antimicrobiano.

CAPITULO 4

4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.1 Obtención de aceite esencial

Los aceites esenciales de moringa y altamisa obtenidos por medio del método de arrastre por vapor se adquirieron completamente puros, es decir, no se evidenciaron cuerpos extraños en los mismos.

4.1.2 Análisis de las características fisicoquímicas de los AEs

Los análisis de las características fisicoquímicas se pueden apreciar en la siguiente tabla:

Tabla 3 Resultado de los análisis fisicoquímicos de los AEs.

Análisis		Resultados	
		Altamisa	Moringa
Organolépticos	Olor	Fuerte	Suave
	Color	Amarillo claro	Amarillo claro
	Apariencia	Líquido	Líquido
Físicos	Densidad a 20 °C	1.112 g/mL	0.8404 g/mL
	Miscibilidad en etanol	Soluble	Soluble
	Punto de congelación	40 min	50 min
	Viscosidad	0.479 p	2.171 p
Químicos	pH	5.3	6.1

Fuente: Autor

Los aceites esenciales de ambas especies se diferencian en casi todos los parámetros evaluados, como organolépticos, físicos y químicos, el AEM en cuanto al

olor que posee es suave mientras que el AEA, tiene un olor fuerte, la densidad a 20 °C de ambos aceites estudiados tiene una diferencia de 0.2716 g/mL, en cuanto a la viscosidad como se puede observar en la tabla 5 posee una gran discrepancia, siendo así el AEM con mayor viscosidad.

En los análisis químicos se puede apreciar que el AEA posee un pH de 5.3 mientras que el AEM tiene 6.1 concluyendo que el aceite de altamisa es más ácido que el de moringa.

Análisis cromatográfico de los aceites esenciales

El análisis mediante cromatografía de gases se realizó con el fin de conocer los componentes principales de los aceites esenciales extraídos.

Los principales componentes del aceite de moringa y de la altamisa se pueden evidenciar en la siguiente tabla:

Tabla 4 Principales componentes de los AEs de altamisa y moringa.

AEs	Componentes principales
AEA	Germacreno D-Dup2 28.04 Curcumeno<gamma-> Benceno, 1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metil- 25.36 Cariofileno (E-) 7.43 Mirceno
AEM	23.49 Copaeno<alpha-> 9,12-Octadecadienoico acido (Z,Z)--Dup1 Humuleno 25.36 Cariofileno (E-)

Fuente: Autor

Los componentes principales de los aceites esenciales evaluados según varios estudios muchos de estos, funcionan como antimicrobiano, antifúngico dándole propiedades extraordinarias para combatir patógenos que causan molestias a los seres humanos.

4.1.3 ANÁLISIS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS REALIZADAS A LA BACTERIA *Klebsiella pneumoniae*

Se realizaron por triplicado cada una de las pruebas los resultados se pueden observar en el anexo 3.

Las pruebas de citrato, ureasa, lactasa y Voges Proskauer para la caracterización de la cepa de *K. pneumoniae* resultaron positivas, lo cual concuerda con los estudios e investigaciones realizados por Bailón et al. (2003) "Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias", Lopardo et al., (s.f.) Bacterias de importancia clínica", Padilla, M., (2012) "Klebsiella pneumoniae: aislamiento identificación y resistencia a los antimicrobianos hospital "jaime mensoza", Rodríguez y Criollo (2013) "Presencia de klebsiella pneumoniae, enterobacter aerogenes (enterobacteriaceae) y *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo (micrococcaceae) en la orofaringe de individuos jóvenes sanos.

En cuanto a las pruebas de motilidad, oxidasa y rojo de metilo proporcionaron resultados negativos lo cual concuerda con investigaciones realizadas por Gurrolla (2014) "Pruebas bioquímicas para enterobacterias", Cortes (2014) "Pruebas bioquímicas para enterobacterias", Betancourt (s.f.) "Evaluación del reactivo de kovac modificado", Algorta y Schelotto (s.f.) "Principales grupos de bacilos gramnegativos no exigentes"

La bacteria *K. pneumoniae* es un bacilo Gram negativo coincidiendo con la investigación realizada por Argüez de Paz., Rodríguez y Rojas (2015) *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de betalactamasas en pacientes con infección del tracto urinario y Gonzáles al et., (2013) Caracterización de cepas de *klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasa de espectro extendido aisladas en dos unidades de cuidados intensivos y Sarasti, P., (2018) Evaluación de la actividad antimicrobiana mediante la extracción de la fracción activa presente en las hojas de la especie vegetal *Moringa oleífera* frente a microorganismos patógenos.

4.4 Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de moringa y altamisa mediante pruebas de sensibilidad por discos (Kirby Bauer)

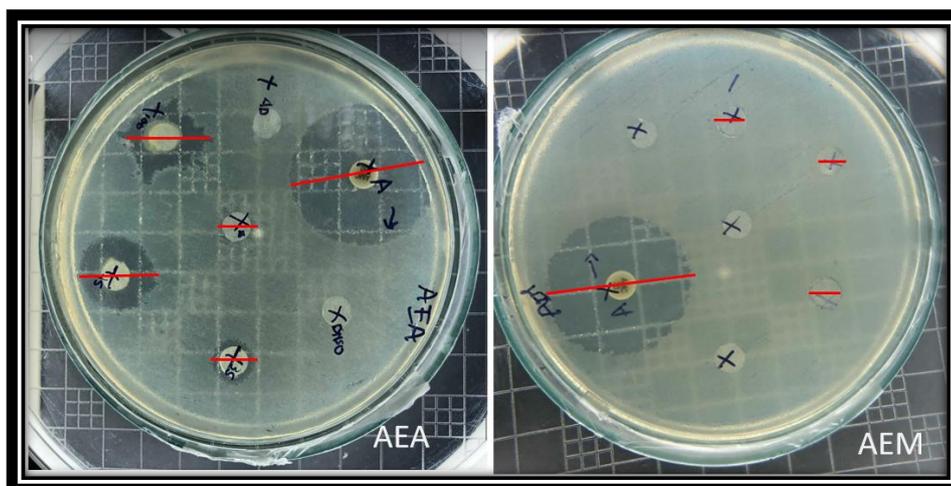


Ilustración 13 Medición de los halos de inhibición formados por el efecto antimicrobiano del AEM y AEA.

Fuente: Autor

Para la interpretación de los halos de inhibición obtenidos se tomó como referencia a Navarro, Miró, y Mirelis, (2010), quienes dan a conocer los criterios para evaluar la sensibilidad de las enterobacterias frente a los antimicrobianos:

1. Sensible (S): ≥ 18
2. Intermedio (I): $14 - 17$
3. Resistente (R): ≤ 13

Los diámetros de los halos de inhibición que se obtuvieron por el método de Kirby-Bauer, o de difusión en disco, a diferentes concentraciones de los AEs se pueden apreciar en la siguiente tabla:

Tabla 5 Diámetros en mm de los halos de inhibición alcanzados por las distintas concentraciones de los AEs.

	Concentración	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Promedio	Control -	Control +
Aceite	5%	6	6	6	6	6	30
esencial	35%	6	6	6	6	6	30
de	75%	6	6	6	6	6	30
moringa	100%	7	7	7	7	6	30
Aceite	5%	9.5	8	9	8.8	6	30
esencia	35%	11	10.5	10	10.5	6	30
de	75%	17.5	16	18	17.2	6	30
altamisa	100%	22.5	21	18.5	20.7	6	30

Fuente: Autor

Se puede evidenciar en la tabla 5, que el AEM no presentan halos de inhibición significativos a ninguna concentración, y según Navarro, Miró, y Mirelis, (2010) el halo que sea ≤ 13 mm demuestra resistencia, es decir, no exhibe actividad antimicrobiana el aceite de moringa contra la bacteria *K. pneumoniae*. Mientras que

el aceite de altamisa si presenta efecto antimicrobiano a concentraciones del 75% y 100%, siendo sensible, y a concentraciones del 5% y 35% se evidencia resistencia ya que los halos son ≤ 13 mm.

Promedio de los diámetros de los halos de inhibición en mm de los AEs

En el gráfico 1 se considera el promedio de los diámetros de halos de inhibición por los AEs considerando que el AEA es el que posee mayor efecto antimicrobiano a las distintas concentraciones frente a la *K. pneumoniae* que el AEM.

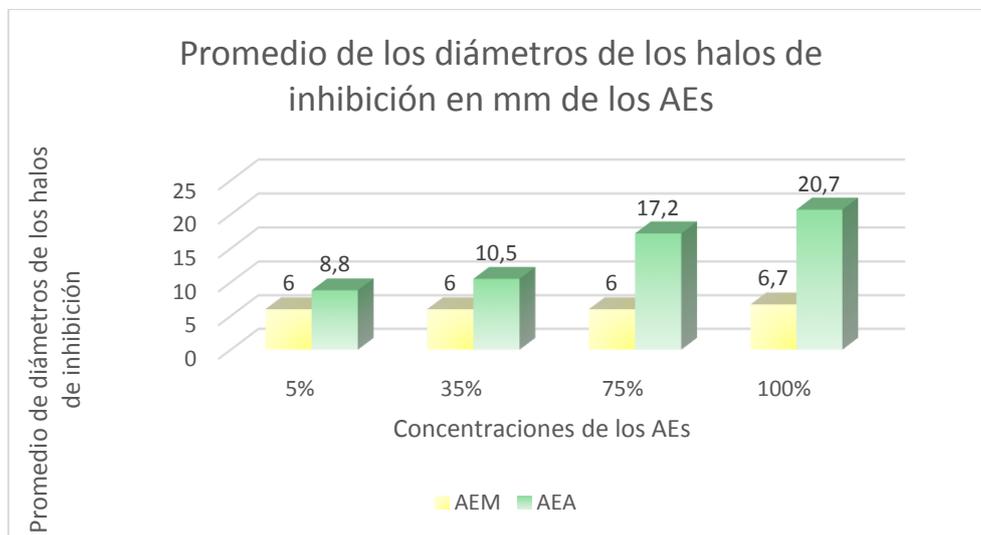


Gráfico 1 Promedio de halos inhibición.

Fuente: Autor

Para determinar con mayor precisión la actividad antimicrobiana que ejercen los AEs sobre la bacteria *K. pneumoniae*, se calculó el porcentaje de inhibición cada uno de ellos utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{diámetro del halo de inhibición}}{\text{diámetro del halo de control}} \times 100$$

Los porcentajes de inhibición obtenidos de los AEs se aprecia en la tabla 6.

Tabla 6 Porcentaje de inhibición.

	Concentración	Diámetro del halo de inhibición (mm)	Diámetro del halo de control (mm)	Porcentaje de inhibición (%)
Aceite esencial de moringa	5%	6	30	20
	35%	6	30	20
	75%	6	30	20
	100%	7	30	23.33
Aceite esencia de altamisa	5%	8.8	30	29.33
	35%	10.5	30	35
	75%	17.2	30	53.33
	100%	20.7	30	69

Fuente: Autor

En la tabla 7 se puede observar el porcentaje de inhibición de los aceites evaluados, claramente se evidencia que el aceite esencial de altamisa posee el 69% de inhibición a una concentración 100 %, mientras que el de moringa tiene un porcentaje menor al 50% a la concentración a la misma.

Comparación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales

Se realizó la prueba de normalidad (Gráfico 2) con el fin de determinar un método estadístico para comparar el efecto antimicrobiano de los distintos tratamientos y establecer su efectividad contra *K. pneumoniae*, mediante el programa Minitab 18.

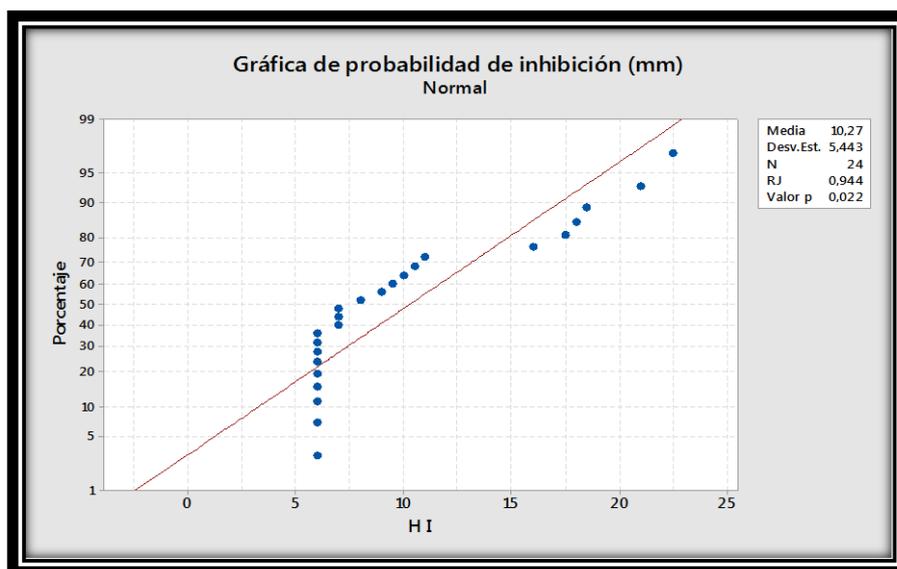


Gráfico 2 Gráfica de normalidad

Fuente: Autor

En el gráfico 2 se puede observar que la prueba de normalidad arroja como resultado del valor p 0.022 es decir, es menor que el valor de significancia 0.05, concluyendo que los datos de la muestra no provienen de una población con distribución normal, por lo tanto, existe una evidencia estadística de que los halos de inhibición generados por los AEs frente a *K. pneumoniae* difieren significativamente. Para la determinación de la efectividad antimicrobiana de los tratamientos se utiliza el método estadístico Kruskal-Wallis debido a que la población no es normal.

Tabla 7 Hipótesis para la prueba de Kruskal-Wallis.

Hipótesis nula	H ₀ : Todas las medianas son iguales
Hipótesis alternativa	H ₁ : Al menos una mediana es diferente

Fuente: Autor

Prueba de Kruskal-Wallis.

En la tabla 8 se puede observar la diferencia que existen en la mediana, y las medias de la actividad antimicrobiana de los AEs, por lo tanto, en cuanto al valor z negativo indica que el rango promedio de un grupo es menor que el rango promedio general, mientras que el positivo indica que el rango promedio de un grupo es mayor que el rango promedio general.

Tabla 8 Estadísticas descriptivas del método de Kruskal-Wallis.

Placa	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
placa 1 AEA 100%	1	22,5	24,0	1,66
placa 1 AEA 35%	1	11,0	18,0	0,79
placa 1 AEA 5%	1	9,5	15,0	0,36
placa 1 AEA 75%	1	17,5	20,0	1,08
placa 1 AEM 100%	1	7,0	11,0	-0,22
placa 1 AEM 35%	1	6,0	5,0	-1,08
placa 1 AEM 5%	1	6,0	5,0	-1,08
placa 1 AEM 75%	1	6,0	5,0	-1,08
placa 2 AEA 100%	1	21,0	23,0	1,52
placa 2 AEA 35%	1	10,5	17,0	0,65
placa 2 AEA 5%	1	8,0	13,0	0,07
placa 2 AEA 75%	1	16,0	19,0	0,94
placa 2 AEM 100%	1	7,0	11,0	-0,22
placa 2 AEM 35%	1	6,0	5,0	-1,08
placa 2 AEM 5%	1	6,0	5,0	-1,08
placa 2 AEM 75%	1	6,0	5,0	-1,08
placa 3 AEA 100%	1	18,5	22,0	1,37
placa 3 AEA 35%	1	10,0	16,0	0,51
placa 3 AEA 5%	1	9,0	14,0	0,22
placa 3 AEA 75%	1	18,0	21,0	1,23
placa 3 AEM 100%	1	7,0	11,0	-0,22
placa 3 AEM 35%	1	6,0	5,0	-1,08
placa 3 AEM 5%	1	6,0	5,0	-1,08
placa 3 AEM 75%	1	6,0	5,0	-1,08
General	24		12,5	

Fuente: Autor

En la tabla 9 se puede presenciar que ambos valores de p son mayores que el nivel de significancia de 0.05, por que se acepta la hipótesis nula estableciendo que las medianas de la población para estos grupos son todas iguales, concluyendo que los AEs evaluados poseen el mismo comportamiento antimicrobiano frente a *K. pneumoniae*.

Tabla 9 Resultado de método estadístico Kruskal-Wallis.

Método	GL	Valor H	Valor p
No ajustado para empates	23	21.76	0.535
Ajustado para empates	23	23.00	0.461

Fuente: Autor

4.5 Determinación de CMI de los aceites esenciales de moringa y altamisa mediante micro dilución en caldo

Para la evaluación del CMI de los aceites esenciales analizados se empleó una microplaca de 96 pocillos, la misma que se dispuso de la siguiente forma: en las tres primeras columnas (1 – 3) se colocó el inóculo bacteriano con el AEM, (4 – 5) inóculo bacteriano con el medio, (6 – 8) inóculo bacteriano con el AEA, (9 – 10) solo medio y (11 – 12) inóculo bacteriano con antibiótico. A las 24 horas de incubación se observa turbidez en los pocillos en donde se refleja el crecimiento bacteriano (Ilustración 14).

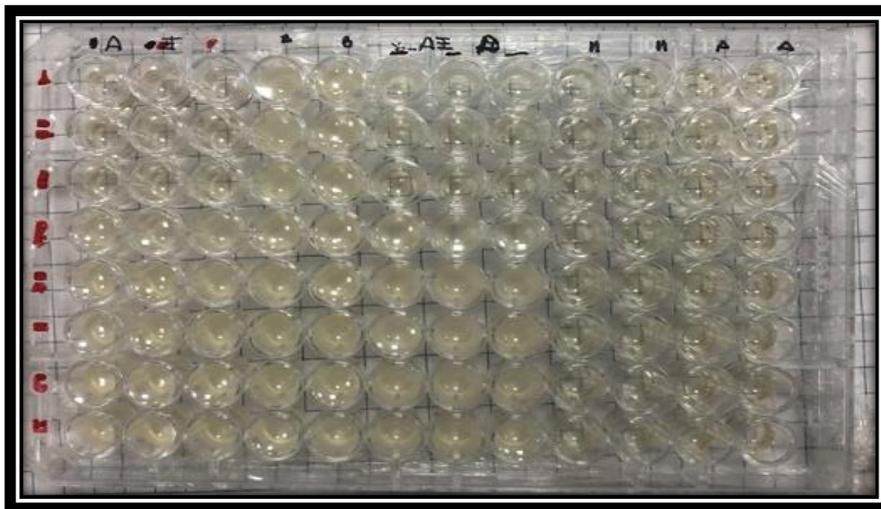


Ilustración 14 Microplaca preparada incubada durante 24 horas.

Fuente: Autor

4.5.1 Adición de la resazurina

Al adicionar la resazurina se observa una coloración azul, a las cero horas de incubación, posteriormente se incubó de 1 a 2 horas para la revelación, este tipo de indicador de viabilidad celular permite la estimación de manera indirecta del número de células viables presentes después de aplicar un tratamiento (Ilustración 15).

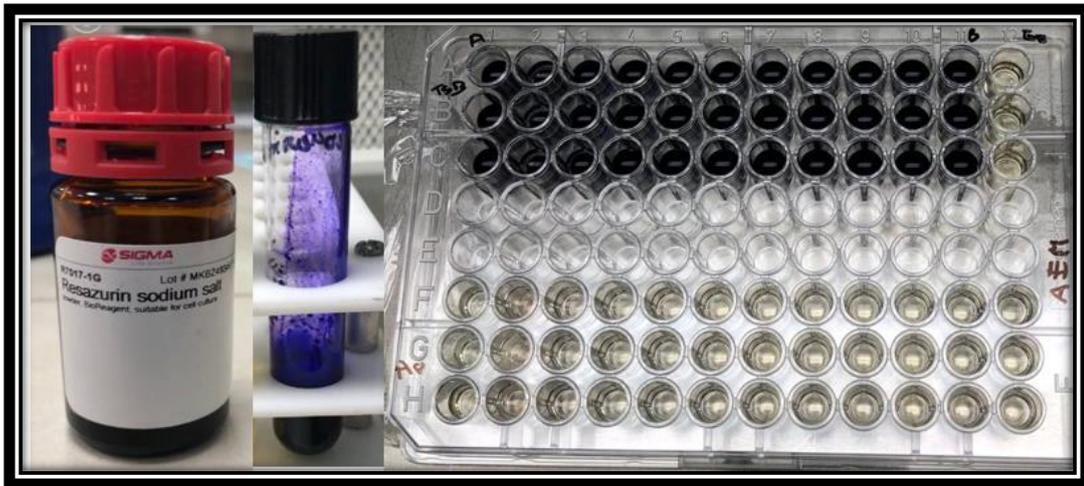


Ilustración 15 Resazurina y coloración de esta a las cero horas de incubación

Fuente: Autor

4.5.2 Determinación de la viabilidad celular en cada pocillo

Con la coloración que presenta cada pocillo, se puede estimar las células viables (color rosa) y no viables (color azul), el color rosa se presenta debido a que la resazurina es reducida a resofurina por las oxidoreductasas que se encuentran principalmente en las mitocondrias (Ilustración 16).

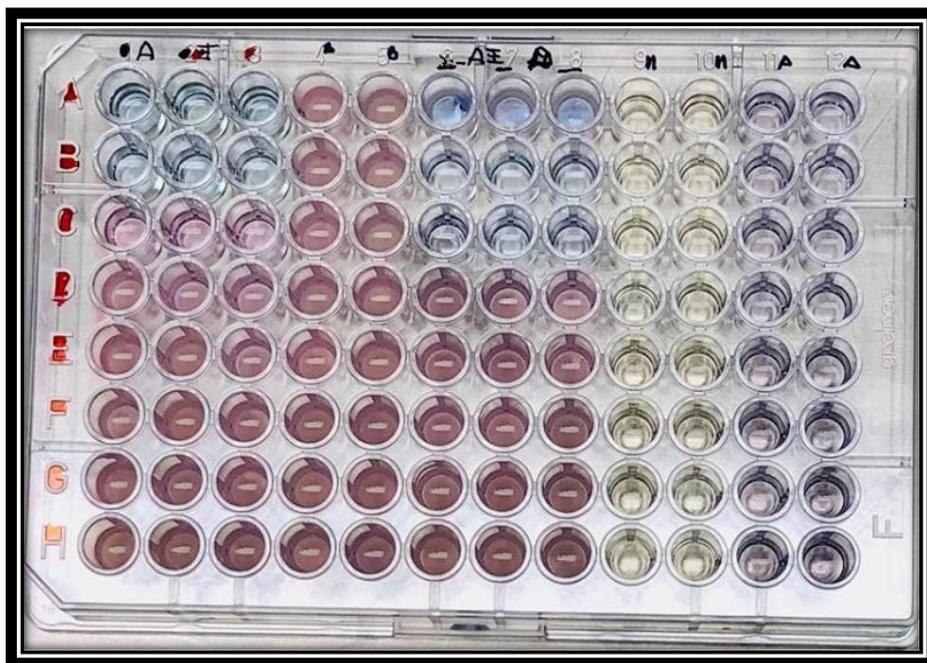


Ilustración 16 Coloración de los pocillos a las 2 horas de incubación con la resazurina

Fuente: Autor

La evaluación de la CMI de los aceites esenciales tanto de moringa como de altamisa generaron los siguientes resultados, el AEM al 3% y el AEA al 1.5%, concluyendo que a estas concentraciones poseen un efecto antimicrobiano sobre la *K. pneumoniae* ATCC 70693.

Tabla 10 Evaluación de la CMI alcanzada por los tratamientos.

TRATAMIENTOS	PUNTOS DE CORTE CMI
AEM	3 %
AEA	1.5%
ANTIBIÓTICO	100%
INOCULO	0%

Fuente: Autor

4.5.3 Determinación del efecto bacteriostático o bactericida que ejercen los aceites esenciales de moringa y altamisa sobre *K. pneumoniae*

Para reportar como bacteriostático o bactericida un antimicrobiano se debe conocer que el efecto bacteriostático bloquea el crecimiento y multiplicación celular, mientras que el bactericida produce la muerte del microorganismo. Se cultivó en una placa con el medio agar nutritivo, tomando muestras de la microplaca de los siguientes pocillos para el AEM, B, C1, B2, C2, y B3, C3; mientras que para el de altamisa se tomó del C6, D6, C7, D7 y C8, D8.

En la Ilustración 24 se puede observar que el aceite esencial de moringa es bactericida y a su vez bacteriostático, mientras que el aceite esencial de altamisa resultó bacteriostático, tabla 10.

Tabla 11 Resultados obtenidos de los aceites esenciales evaluados para comprobar si son bacteriostáticos o bactericidas.

Muestra tomada	Resultado
B1 AEM	Bactericida
B2 AEM	Bactericida
B3 AEM	Bactericida
C1 AEM	Bacteriostático
C2 AEM	Bacteriostático
C3 AEM	Bacteriostático
C6 AEA	Bacteriostático
C7 AEA	Bacteriostático
C8 AEA	Bacteriostático
D6 AEA	Bacteriostático
D7 AEA	Bacteriostático
D8 AEA	Bacteriostático

Fuente: Autor

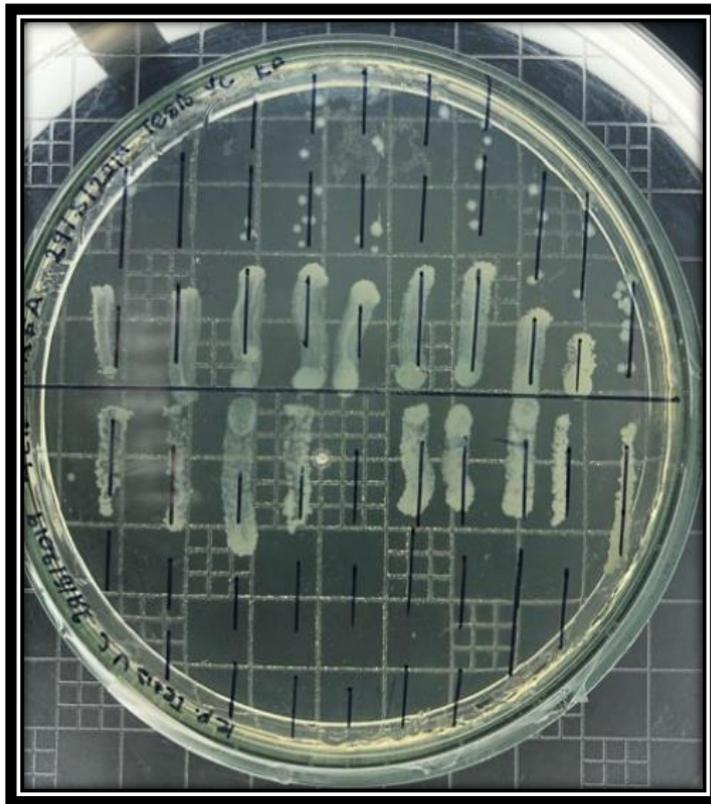


Ilustración 17 Crecimiento bacteriano (bactericida sin crecimiento bacteriano y bacteriostático crecimiento bacteriano).

Fuente: Autor

CAPITULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Al evaluar los parámetros de calidad de los aceites extraídos, se determinó que el aceite esencial de moringa cumple con los estándares de calidad garantizando su pureza, en cuanto al aceite de altamisa no existen puntos críticos de control, por lo que no se garantiza pureza total.

Las pruebas bioquímicas que se aplicaron para la verificación de la cepa bacteriana concuerdan con estudios realizados, ratificando que la cepa es de *K. pneumoniae*.

Al efectuar la prueba de discos para la determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales a diferentes concentraciones frente a *K. pneumoniae*, se concluye que el AEA tiene mayor poder inhibitorio con promedio de 20.7 mm al 100%, en cuanto al AEM el promedio es de 7 mm a la misma concentración que el aceite esencial de altamisa.

Al determinar el CMI de los aceites esenciales por micro dilución en caldo, se evidenció que el promedio del CMI para el AEM es al 3 %, mientras que para el AEA es al 1.5 %.

Al determinar el efecto bactericida y bacteriostático de los aceites estudiados, se concluyó que el AEA actúa como bacteriostático, es decir, bloquea el crecimiento y multiplicación de la bacteria, mientras que el aceite de moringa actúa como bactericida produciendo la muerte a las células bacterianas.

Al realizar el análisis cromatográfico de los aceites esenciales, se demuestra que los componentes de estos, les da la peculiaridad de ser bacteriostáticos y/o bactericidas para ciertas bacterias, los componentes principales del AEA son:

Germacreno D-Dup2, 28.04 Curcumeno<gamma>, Benzeno, 1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metil-, 25.36 Cariofileno(E-) y 7.43 Mirceno, mientras que el AEM posee 9,12-Octadecadienoico ácido (Z,Z)--Dup1, Humuleno y 25.36 Cariofileno(E-).

5.1 Recomendaciones

Realizar estudios sobre los pretratamientos que se deben aplicar a los vegetales para la extracción de los aceites esenciales, y que método de extracción posee mayor rendimiento.

Extraer aceites esenciales de las diferentes partes de las plantas, y comparar su rendimiento para reducir tiempo y costos, en posteriores extracciones.

Aplicar los aceites esenciales estudiados en varios patógenos causantes de diferentes enfermedades, para poder determinar su CMI y la preparación de posibles formulaciones.

BIBLIOGRAFÍA

Alarcón, M., et al. (2017). Moringa oleifera: potenciales usos en odontología. Centro de Biotecnología Aplicada (CBA), Departamento de Biología, Facyt-Universidad de Carabobo.

Albaladejo-Meroño, Q. (1999). El Aceite Esencial de limón producido en España. Contribución a su evaluación por Organismos Internacionales.

Albarracín-Montolla., & Gallo-Palma. (2003). Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando Piper aduncum (cordoncillo) procedente de la zona cafetera.

Ambrosia arborescens. (s. f.). Recuperado 30 de noviembre de 2018, de <https://bit.ly/2ksI6KA>.

Andrews, J. M., & Howe, R. A. (2011). BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 10). Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 66(12), 2726-2757. <https://bit.ly/2kutoTd>.

Arcas, E. (2018, abril 11). Formas de uso de las plantas medicinales. Recuperado 5 de marzo de 2019, de En Buenas Manos website: <https://bit.ly/2IROhrQ>

Argote Vega, F. E., Suarez Montenegro, Z. J., Tobar Delgado, M. E., Perez Alvarez, J. A., Hurtado Benavidez, A. M., & Delgado Ospina, J. (2017). Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en Staphylococcus aureus y Escherichia coli. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 15(Edición Especial 2), 52. <https://bit.ly/2xoK9Tg>.

Astudillo, A. (2003). Fitoterapicos antibacterianos y antifungicos. Revista de la Facultad de Ciencias Químicas – Universidad de Cuenca/Facultad de Ciencias Químicas. No 2, 39-50.

Bagley, S. T. (1985). Habitat association of *Klebsiella* species. *Infection Control: IC*, 6(2), 52-58.

Bailón, H., & Sacsquispe, R. (2013). Caracterización molecular de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE causantes de infección intrahospitalaria en el servicio de neonatología de un hospital de Lima, Perú. *Revista Médica Herediana*, 24(2), 101-108.

Bandwolf, & Salcedo., (s. f.). Introducción a la industria de los aceites esenciales extraídos de las plantas medicinales y aromáticas.

Base de agar urea | Seguridad Alimentaria | Neogen. (s. f.). Recuperado 21 de marzo de 2019, de <https://bit.ly/2IYF8Oq>.

Casado-Villaverde, I. (2018). Optimización de la extracción de aceites esenciales por destilación en corriente de vapor.

Córdova, M., & Loayza, R. (2014). Protocolo de control de calidad de la eficacia antibacteriana de los discos antibióticos para pruebas de susceptibilidad.

Cuervo, S., et al. (2014). Comportamiento de casos de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas en pacientes con cáncer de un hospital de tercer nivel de Bogotá, D.C. *Biomédica*, 34 (1), 170-180.

Doménech-Asensi, g., et al. (2017). *Moringa oleifera*: Revisión sobre aplicaciones y usos en alimentos.

El origen de la bacteria KPC. (2011). Recuperado 7 de agosto de 2018, de <https://bit.ly/2PTBJdx>.

Escalona Cruz, L. J., Tase Aguilar, A., Estrada Martínez, A., & Almaguer Mojena, M. L. (2015). Uso tradicional de plantas medicinales por el adulto mayor en la

comunidad serrana de Corralillo Arriba. Guisa, Granma. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(4), 0-0.

Fahey, J. (2005). Moringa oleifera: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. *J. Trees for Life*. 1:5.

Flores, C. (s. f.). Las plantas, el poder de lo natural. Recuperado 4 de marzo de 2019, de www.expreso.ec website: <https://bit.ly/2k2UDUU>

Foidl et al., (s. f.). Utilización del marango (*Moringa oleifera*). Recuperado 29 de noviembre de 2018, de <https://bit.ly/2lV0oV6>.

Foidl, N., Makkar, H.P.S. & Becker, K. (2001). The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses. In: *The miracle tree: The multiple attributes of Moringa*. (Ed. J. Lowell Fuglie). CTA Publication. Wageningen, The Netherlands.

Fonnegra R., Botero H. (2006). *Plantas Mágico-Religiosas: Historias, Mitos y Leyendas*. Colección Autores Antioqueños No. 141. Secretaría de Educación para la Cultura de Antioquia, Dirección de Fomento a la Cultura, Imprenta Departamental, Medellín.

Gallegos-Zurita, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales de la Facultad de Medicina*, 77(4), 327-332.

García, R., et al. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos.

Gil, M. (2019a, enero 3). Agar MacConkey: fundamento, preparación y usos. Recuperado 21 de marzo de 2019, de Lifer website: <https://bit.ly/2k4rIzS>.

Gil, M. (2019b, marzo 5). Caldo soya tripticaseína: fundamento, preparación y usos. Recuperado 21 de marzo de 2019, de Lifer website: <https://bit.ly/2lE6GZ1>.

Gómez, C. F. L. (2018, septiembre 18). *Klebsiella pneumoniae*: características, morfología y enfermedades. Recuperado 3 de marzo de 2019, de Lifeder website: <https://bit.ly/2H1pyuK>.

González, A. C., Nieves, B., Solórzano, M., Cruz, J., Puig, J., & Moreno, M. (2013). Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasa de espectro extendido aisladas en dos unidades de cuidados intensivos. *Revista chilena de infectología*, 30(4), 374-380. <https://bit.ly/2lysZiS>.

González. (junio de 2013). Scielo. Obtenido de Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae*: <https://bit.ly/2pkbvp9>.

Herrera, M. L. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 34, 33-41.

Hinojosa Benavides & Moreno Vigo. (2013). Evaluación de marco (*Ambrosia arborescens*) en el tratamiento de garrapatas (*Ixodes ricinus*) en cuyes (*Cavia cobayo*).

Índice de Acidez. (s. f.). Recuperado 23 de marzo de 2019, de <https://bit.ly/2jXeRPK>.

Izquieta, P. (s. f.). *Klebsiella pneumoniae*, la bacteria más resistente en hospitales del país. Recuperado 7 de agosto de 2018, de <https://bit.ly/2czEWjm>.

Jeronimo, K. (2013, abril 16). MICROBIOLOGIA Y PARACITOLOGIA : *Klebsiella Pneumoniae*. Recuperado 20 de marzo de 2019, de MICROBIOLOGIA Y PARACITOLOGIA website: <https://bit.ly/2lYBxQn>.

Klebsiella pneumonia - EcuRed. (s. f.). Recuperado 20 de marzo de 2019, de <https://bit.ly/2kfA5bX>.

Klebsiella pneumoniae: la preocupante bacteria resistente a todos los antibióticos. (2017). Recuperado 7 de agosto de 2018, de <https://bit.ly/2Nl1rM>.

La moringa en Ecuador | La Revista | EL UNIVERSO. (s. f.). Recuperado 27 de abril de 2019, de <https://bit.ly/2lCs11A>.

Los Aceites Esenciales. (s. f.).

Machín, M. P., & Rodríguez, F. J. M. (2011). Consideraciones farmacológicas sobre principios activos en plantas medicinales con actividad diurética. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*, 6(2), 35-40.

Soto Vasquez, M. R., (15:27:39 UTC). *Control de Calidad de Aceites Vegetales por Q.F. Marilú Roxana Soto V...* Educación. Recuperado de <https://bit.ly/2lZKIjy>.

Martín, C., Martín, G., García, A., Fernández, T., Hernández, E., & Puls, J. (2013). Potenciales aplicaciones de *Moringa oleifera*. Una revisión crítica. *Pastos y Forrajes*, 36(2), 137-149.

Medios diferenciales. (s. f.). Recuperado 20 de marzo de 2019, de Laboratorio microbiología website: <https://bit.ly/2jZmd5j>.

Método de difusión con discos. (2012). Estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos según EUCAST. Versión 2.1.

Método de difusión en agar según Kirby Bauer. (s.f.). Recuperado 7 de agosto de 2018, de <https://bit.ly/2nMwYHu>.

Microbitos, G. (2015, abril 20). *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. ozanae*. morfología, medio de cultivo, enfermedades y más. Recuperado 7 de agosto de 2018, de microbitos blog website: <https://bit.ly/2lg8HGR>

Moradigaravand, D., Martin, V., Peacock, S. J., & Parkhill, J. (2017). Evolution and Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United Kingdom and Ireland. *MBio*, 8(1). <https://bit.ly/2ksJsoE>.

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Tenover, M. C. (2017). *Microbiología médica*. Elsevier Health Sciences.

Nature, S. (2014). Extracción de aceites esenciales por destilación.

Navarro, F., Miró, E., & Mirelis, B. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(9), 638-645. <https://bit.ly/2m0xSlf>.

Navia-Barzola, K. J. (2014). “Caracterización morfológica y conservación de la variabilidad de plantas medicinales colectadas en las provincias de Sucumbíos, Orellana, Napo y Zamora Chinchipe”.

Nereyda, E., & Saucedo, R. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. 7, 19.

Padilla Chumacero. (2012). *Klebsiella pneumoniae*: aislamiento, identificación y resistencia a los antimicrobianos hospitalarios «Jaime Mendoza». C.N.S. Sucre. *Archivos Bolivianos de Medicina*, 30.

Parrales, A., Vera, M. R., & Tobar, W. P. (s. f.). *GUAYAQUIL – ECUADOR AÑO 2012*. 54.

Permatree. (2016, junio 9). *Ambrosia arborescens* planta medicinal de Ecuador. Recuperado 30 de noviembre de 2018, de PermaTree website: <https://bit.ly/2k2uzt5>.

Philippe, F., (2014). Lista de plantas medicinales comunes en la subregión andina.

Plantas medicinales - EcuRed. (s. f.). Recuperado 5 de marzo de 2019, de <https://bit.ly/2ktfl0m>.

Plaza, M., & Ricalde, M. (2015). Establecer parámetros de control de calidad físico-químicos del aceite esencial del *Schinus molle* l. obtenido por arrastre de vapor. Volumen 11, Numero 12 693-696.

Polin Raygoza, Laura Alicia, Muro Reyes, Alberto, & Díaz García, Luis Humberto. (2014). Aceites esenciales modificadores de perfiles de fermentación ruminal y mitigación de metano en rumiantes: Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 5(1), 25-47.

Prueba bioquímica de Rojo de metilo y Voges Proskauer. (s. f.). Recuperado 8 de agosto de 2018, de <https://bit.ly/2ki7TVX>

Puerta, et al. (2015). Cálculo de la densidad en distintos tipos de aceites.

Ramachandran, D., Peter. K. V. & Gopalakrishnan, P.K. (1980). Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable. *Economic Botany*. 34:276.

Ramírez, L. S., (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal.

Ramírez-Alfaro, C., & Villalobos-Vindas, J. (2016). Análisis de las bacteremias por *Klebsiella pneumoniae* en pacientes del Hospital México. *Acta Médica Costarricense*, 58(2). Recuperado de <https://bit.ly/2O09hci>.

Rashid, U., Anwar, F., Moser, B.R. & Knothe, G. (2008). *Moringa oleifera* oil: a possible source of biodiesel. *Biores. Technol.* 99:8175.

Recuperado en 08 de agosto de 2018, de <https://bit.ly/2plWK5j>.

Reddy, D.H.K., Ramana, D.K.V., Sessaiah, K. & Reddy, A.V.R. (2011). Biosorption of Ni (II) from aqueous phase by *M. oleifera* bark, a low cost biosorbent. *Desalination*. 268:150.

Reyes-Juraso, F, Palou, E, & Lopez-Malo, A. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Temas selectos de ingeniería de alimentos* 8 – 1: 68 – 78.

Rodero, L., Córdoba, S., Vivot, W., Campo, M., Corfield, P., Olgúin, C., ... Whonet, R. (2006). Método de difusión con discos para la determinación de sensibilidad a fluconazol en aislamientos de *Candida* spp. *Revista argentina de microbiología*, 38(3), 155-163.

Rodero, L., Córdoba, S., Vivot, W., Campo, M., Corfield, P., Olgúin, C. Whonet, R. (2006). Método de difusión con discos para la determinación de sensibilidad a fluconazol en aislamientos de *Candida* spp. *Revista argentina de microbiología*, 38(3), 155-163.

Rovetto, G., Moreno, N., Bolívar, V., Calvo, S., Suárez, G., Justiniano, C., Caballero, O. (2010). APLICACIONES MEDICINALES DEL TOMILLO. *Universidad, Ciencia y Sociedad*, 16.

Santisteban Larrinaga, Y., Carmona Cartaya, Y., Pérez Faria, Y. de la C., Díaz Novoa, L., García Giro, S., Kobayashi, N., & Quiñones Pérez, D. (2014). Infecciones por los géneros *Klebsiella* y *Acinetobacter* en hospitales pediátricos cubanos y resistencia antibiótica. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 66(3), 400-414.

Sherwin, & Olson. (junio de 2012). Taxonomía *Moringa oleifera*. Obtenido de EcuRed: <https://bit.ly/2xxTPtR>.

SIM Medio - Laboratorios Britania. (s. f.). Recuperado 21 de marzo de 2019, de <https://bit.ly/2kjin3dx>

Tacoro, R., Seija, V., & Vignoli, R. (s. f.). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica.

Telégrafo. (2017). Bacteria se disemina en las terapias intensivas. Recuperado 7 de agosto de 2018, de <https://bit.ly/2kuw7vV>.

Tramil. (2017). Tramil. Obtenido de Programa de investigación aplicada a la medicina popular del Caribe: <https://bit.ly/2QJI9Nf>.

Unknown. (2016, junio 7). Microbiología: Sesión 5 Práctica 7: Preparación escala de McFarland. Recuperado 14 de abril de 2019, de Microbiología website: <https://bit.ly/2krA2d3>.

Vilela et al., (2011). Metabolismo secundario de plantas leñosas de zonas áridas: mecanismos de producción, funciones y posibilidades de aprovechamiento. *Ecología austral*, 21(3), 317-327. Recuperado en 07 de agosto de 2018, de <https://bit.ly/2PQ1xH5>.

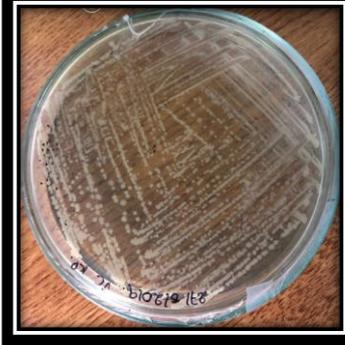
Zapata-González, F., & Cardona-Castro, N. (2012) Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos. *Rev CES Med* 2012; 26(1): 71-83.

ANEXOS

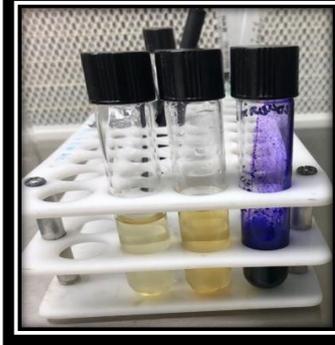
ANEXO 1

Materiales y métodos realizados: Bacterias viables de *K. pneumoniae* (a), preparación de los inóculos bacterianos y la solución de resazurina (b), colocación de

la resazurina en la microplaca (c), resazurina (d), inóculo bacteriano más resazurina, se puede estimar las células viables (color rosa) y no viables (color azul), (e).



(a)



(b)



(c)



(d)

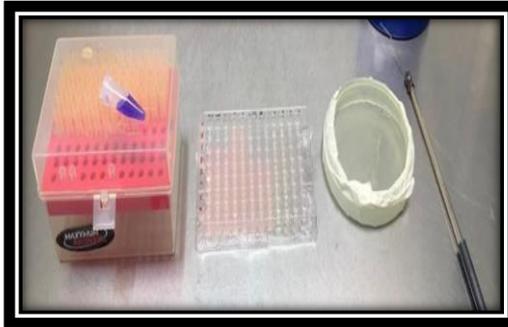


(e)

Fuente: Autor

ANEXO 2

Materiales y métodos: Materiales para realizar la prueba a los AEs de su efecto bacteriostática o bactericida (a), materiales para la preparación de la microplaca (b), inóculo bacteriano (c), microplaca preparada (d).

**(a)****(b)****(c)****(d)**

Fuente: Autor

ANEXO 3

Medios de cultivo.

<p>TSI</p> <p>Color: rojo ladrillo</p> <p>Inhibidores: no tiene</p> <p>Indicador: rojo fenol («Medios diferenciales», s. f.).</p> <p>Viraje de color: por fermentación de azúcares, se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo fenol, el cual vira al color amarillo (Britania., s.f.).</p> <p>Siembra: Punción profunda con asa y luego estrías en la parte de arriba («Medios diferenciales», s. f.).</p> <p>Uso: En este medio se busca determinar la capacidad de la bacteria para degradar los azúcares, formación de gas y sulfuros de hidrógeno.</p>	<p>Citrato de Simmons</p> <p>Color: verde</p> <p>Inhibidores: no tiene</p> <p>Indicador: Azul bromocresol («Medios diferenciales», s. f.).</p> <p>Viraje de color: el indicativo de la producción de citrato permeasa es el viraje de color de verde a azul.</p> <p>Siembra: estriar la superficie del medio de cultivo.</p> <p>Uso: Este medio nos permite comprobar la capacidad de la bacteria de utilizar el citrato como única fuente carbono.</p>
<p>Sulfuro-Indol-Motilidad (SIM)</p> <p>Color: Crema</p> <p>Inhibidores: no tiene</p> <p>Indicador: no tiene</p> <p>Viraje de color: puede presentar un</p>	<p>Agar urea</p> <p>Color: amarillo</p> <p>Inhibidores: no tiene</p> <p>Indicador: rojo de fenol</p> <p>Viraje de color: por la producción de</p>

<p>ennegrecimiento por la producción de SH₂ o de color rojo en la prueba del indol.</p> <p>Siembra: se realiza por punción profunda utilizando la aguja de inoculación recta («SIM Medio - Laboratorios Britania», s. f.).</p> <p>Uso: se utiliza para comprobar la motilidad, formación de sulfuros de hidrógeno y la producción de indol por parte de la bacteria.</p>	<p>la enzima ureasa las bacterias hidrolizan la urea, liberando amoníaco y dióxido de carbono los cuales alcaliniza le medio virando el color amarillo al rosado-rojizo.</p> <p>Siembra: se estría la superficie.</p> <p>Uso: se utiliza para identificar bacterias que hidrolizan urea («Base de agar urea Seguridad Alimentaria Neogen», s. f.).</p>
<p>Agar Mueller-Hinton</p> <p>Color: ámbar claro</p> <p>Inhibidores: no tiene</p> <p>Indicador: no tiene</p> <p>Viraje de color: no se da viraje de color</p> <p>Siembra: se realiza un hisopado en toda la superficie.</p> <p>Uso: se utiliza para la realización de la prueba de sensibilidad a los antibiogramas.</p>	<p>MacConkey</p> <p>Color: rojizo purpura</p> <p>Inhibidores: sales biliares y el cristal violeta.</p> <p>Indicador: rojo neutro</p> <p>Viraje de color: debido a la fermentación pH alrededor de la colonia, lo que produce un viraje de color del indicador del pH, la absorción en la colonia y la precipitación de las sales biliares.</p> <p>Siembra: se estría directamente el inóculo en la superficie.</p> <p>Uso: se usa para aislar bacilos Gram</p>

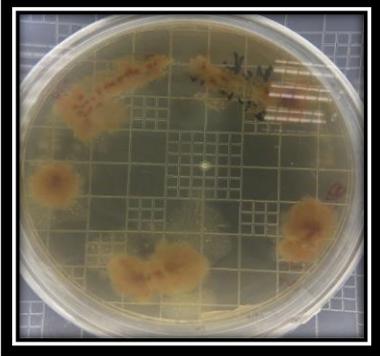
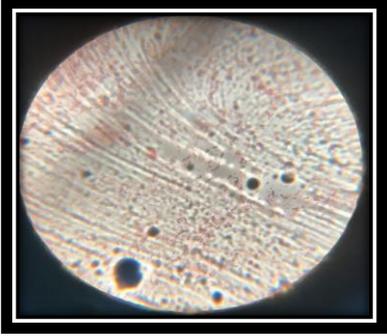
	negativos, también permite distinguir en bacilos fermentadores y no fermentadores de lactosa (Gil, 2019a).
<p>Caldo de soja tríplico</p> <p>Color: ámbar claro</p> <p>Inhibidores: no tiene</p> <p>Indicador: no tiene</p> <p>Viraje de color: no tiene</p> <p>Siembra: inocular directamente el material de estudio.</p> <p>Uso: es uno de los medios de cultivo líquido más usados, puede reproducir bacterias exigentes de gran importancia y hongos. Se utiliza a nivel investigativo en diversos protocolos, en susceptión bacteriana entre otros (Gil, 2019b).</p>	<p>Rojo de metilo y Voges Proskauer</p> <p>Color: ámbar claro</p> <p>Inhibidores: no tiene</p> <p>Indicador: rojo de metilo</p> <p>Viraje de color: al aplicar hidróxido de potasio a los cultivos de microorganismo en medio de glucosa se observa una coloración rojiza, la cual se debe a la oxidación del acetilmetil carbinol a diacetilo el cual reacciona con la peptona del medio.</p> <p>Siembra: se realiza por inoculación directa.</p> <p>Uso: se usa para la clasificación de enterobacterias y determinar la capacidad de un microorganismo de fermentar la glucosa («Prueba bioquímica de Rojo de metilo y voges proskauer», s. f.).</p>

Fuente: Autor

ANEXO 4

Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a la bacteria *Klebsiella pneumoniae*.

Prueba	Fotografía	Prueba	
Prueba de citrato	 <p><i>Ilustración 18</i> Prueba de citrato positiva. Fuente: Autor</p>	Prueba de motilidad	 <p><i>Ilustración 19</i> Prueba de motilidad negativa. Fuente: Autor</p>
Prueba de ureasa	 <p><i>Ilustración 20</i> Prueba de ureasa positiva. Fuente: Autor</p>	Prueba de oxidasa	 <p><i>Ilustración 21</i> Prueba de oxidasa negativa. Fuente: Autor</p>

<p>Prueba de lactosa</p>	 <p>Ilustración 22 Prueba de lactosa positiva.</p> <p>Fuente: Autor</p>	<p>Prueba de catalasa</p>	 <p>Ilustración 23 Prueba de catalasa positiva.</p> <p>Fuente: Autor</p>
<p>Prueba de rojo de metilo Prueba de Voges Proskauer</p>	 <p>Ilustración 24 Prueba rojo de metilo negativa y prueba de Voges Proskauer positiva.</p>	<p>Tinción de Gram</p>	 <p>Ilustración 25 Tinción de Gram donde se puede observar bacilos Gram negativos.</p>

Fuente: Autor

ANEXO 5

Tipos de medios de cultivos.

Tipo de medio	Características	Ejemplos y objetivo
Medios no selectivos enriquecidos	Están diseñados para permitir el crecimiento de la mayoría de los gérmenes que no necesitan condiciones exigentes (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2017).	Agar sangre: recuperación de bacterias y hongos. Agar Mueller-Hinton: medio para estudio de susceptibilidad bacteriana (Murray et al., 2017).
Medios selectivos	Son medios sólidos que contienen sustancias que inhiben el crecimiento de ciertas bacterias, pero permite el de otras («Clasificación de Medios de Cultivo», s. f.), es decir son diseñados para recuperar gérmenes específicos que pueden estar inmersos en una mezcla de microorganismos (Murray et al., 2017).	Agar MacConkey: selectivo para bacterias gramnegativas. Agar sal manitol: selectivo para estafilococos (Murray et al., 2017).
Medios diferenciales	Son empleados para detectar reacciones bioquímicas, con carácter diferencial de grupos, géneros o especies microbianas,	Triple Sugar Iron (TSI): reacciones bioquímicas específicas para enterobacterias.

	mediante el viraje de color del indicador presente en el medio, demostrando algunas de sus características («Medios diferenciales», s. f.).	Citrato de Simmons: reacciones bioquímicas diferenciales para enterobacterias («Medios diferenciales», s. f.).
Medios especializados	Son aquellos medios que se usan detectar gérmenes específicos, los mismos que pueden ser exigentes o que se presentan mezclados con muchos otros (Murray et al., 2017).	Caldo de cultivo Lim: recuperación de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> . Agar Regan Lowe: recuperación de <i>Bordetella pertusis</i> (Murray et al., 2017).

Fuente: Autor