



ANEXO 1

FORMATO PARA LA PRESENTACIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN CON EL
FINANCIAMIENTO DEL FEDU

1. Título del proyecto

EFFECTO IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Moringa oleifera* (MORINGA) frente a cepas de *Escherichia coli* enteropatógeno

2. Área de Investigación

Área de investigación	Línea de Investigación	Disciplina OCDE
PROCESOS QUIMICOS	CIENCIAS NATURALES	CIENCIAS NATURALES

3. Duración del proyecto (meses)

12 MESES

4. Tipo de proyecto

<u>Individual</u>	<input type="radio"/>
Multidisciplinario	<input checked="" type="radio"/>
<u>Director de tesis pregrado</u>	<input type="radio"/>

4. Datos de los integrantes del proyecto

Apellidos y Nombres	Higinio Alberto Zúñiga Sánchez Medina Rojas Roxana del Carmen Isabel Eveling Castillo Coaquira
Escuela Profesional	INGENIERIA QUIMICA BIOLOGIA
Celular	995504519 986218864
Correo Electrónico	hazunigas@unap.edu.pe rmedina@unap.edu.pe eveling.castillo@gmail.com

- I. Resumen del Proyecto de Tesis (Debe ser suficientemente informativo, presentando - igual que un trabajo científico- una descripción de los principales puntos que se abordarán, objetivos, metodología y resultados que se esperan).



En el presente estudio se evaluará la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Moringa oleifera* (MORINGA), planta nativa de la selva de Puno a la cual se le atribuyen innumerables propiedades curativas, sobre cepas de *Escherichia coli* entero patógena, El aceite esencial se obtendrá por la técnica de arrastre de vapor con un equipo especializado que se encuentra en la Facultad de Ingeniería Química de la UNA Puno, las cepas puras de *Escherichia coli* entero patógena se obtendrán de cultivos liofilizados proporcionados por la empresa SIMED. La actividad antimicrobiana para el aceite esencial se verificará mediante el método de difusión en disco a las 24 hora, también se determinará la Concentración Mínima Inhibitoria, luego se realizará la comparación in vitro con el antibiótico amoxicilina – ácido clavulánico. Con los resultados obtenidos se procederá con el análisis estadístico e interpretación de los resultados. Representando este estudio una posible alternativa de tratamiento frente a infecciones causadas por *Escherichia coli* entero patógena.

II. Palabras claves (Keywords) (Colocadas en orden de importancia. Máx. palabras: cinco)

Moringa oleífera, aceite esencial, *Escherichia coli* enteropatógena, amoxicilina – ácido clavulánico

III. Justificación del proyecto (Describa el problema y su relevancia como objeto de investigación. Es importante una clara definición y delimitación del problema que abordará la investigación, ya que temas cuya definición es difusa o amplísima son difíciles de evaluar y desarrollar)

La medicina tradicional en la actualidad y ante la resistencia a los antibióticos que se da a denotar en todos los países del mundo, representa una alternativa en el sector salud, ofreciendo formas de contrarrestar enfermedades con productos que nos ofrece la naturaleza (Vargas-Sánchez et al., 2019), esta tendencia se fundamenta en el análisis y estudio de las plantas medicinales aun no estudiadas de zonas alejadas como la selva de Puno, de las cuales se conoce que poseen en sus propiedades diversos principios activos, los mismos que pueden variar en concentraciones por diversos factores, así mismo, la efectividad medicinal depende del tiempo y calidad de la planta al momento de la cosecha y la forma de extracción del aceite esencial, estos procedimientos influyen en la conservación de los principios activos de las plantas, por otro lado la tecnología nos permite determinar el principio activo de las mismas (Fuchs, 2015). Debemos considerar también que con el paso de los años se han revalorado ciencias como la fitoquímica, que hace posible la identificación y aislamiento de los principios activos de las distintas especies de plantas aun no estudiadas (Illanes, 2020). Por tanto, en los últimos años, surge el uso de los aceites esenciales como alternativa medicinal, lo cual está avanzado a nivel mundial siendo alternativa real, palpable y aplicable (Huaracha, 2019). Las diferentes infecciones bacterianas afectan a todos los grupos etarios a nivel regional, nacional y mundial, habiendo grupos más vulnerables, (Baca, 2017). Diversas patologías están relacionadas con *Escherichia coli* enteropatógena, convirtiéndola en una bacteria de gran interés para el campo médico durante los últimos años (Baca, 2017). Considerando la problemática de las diversas infecciones causadas por *Escherichia coli* y sus causantes, nos permitimos plantear como alternativa de tratamiento la medicina tradicional, específicamente con el uso del aceite esencial de *Moringa oleifera* (Moringa) como agente antimicrobiano, pudiendo representar la solución para infecciones causadas por E. coli enteropatógena.



IV. Antecedentes del proyecto (Incluya el estado actual del conocimiento en el ámbito nacional e internacional. La revisión bibliográfica debe incluir en lo posible artículos científicos actuales, para evidenciar el conocimiento existente y el aporte de la Tesis propuesta. Esto es importante para el futuro artículo que resultará como producto de este trabajo)

Cuadrado et al. (2009), estos investigadores caracterizaron 52 cepas de rizobios de acuerdo a sus propiedades de crecimiento, obtuvieron como resultado que el 63.5% fueron de cepas de lento crecimiento, mientras que el 36.5%, de rápido crecimiento, de acuerdo con sus patrones de asimilación de nutrientes como los carbohidratos, se identificaron a los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium* como potenciales bioinoculantes y bactericidas, así mismo, Pérez et al. (2008), identificaron y caracterizaron cepas de *Rhizobium* aislando 19 cepas de *Rhizobium* a partir de los nódulos de las fabáceas *Canavalia ensiformis*, *Stylosanthes guianensis*, *Centrosema molle*, *Pueraria phaseoloides* y *Macroptilium atropurpureum*, dichos aislados pertenecieron a los géneros *Bradyrhizobium* y *Rhizobium* y/o *Sinorhizobium*, de igual manera, Tang (2004), estudió el efecto de la inoculación con *Rhizobium* sp sobre *Leucaena leucocephala*, mostrando resultados positivos, presentando abundante nodulación, predominante en la raíz principal y de coloración interna roja.

Montoya, 2019, en su investigación estudió el efecto antibacteriano del extracto acuoso de hojas del *Bixa orellana* “Achiote”, frente a *Proteus mirabilis* ATCC 14028, mediante un estudio de tipo básico, con un diseño no experimental. La población estuvo conformada por todas las colonias de 68 *Proteus mirabilis* ATCC 14028. Obteniendo como resultado que si existe un efecto antibacteriano 69 frente a *P. mirabilis* con un valor de 14.30mm, el IC al 95% obtuvo como límite superior de 15.31 70 y el inferior con 13.29, encontrando una significancia, pero no mayor al efecto antibacteriano de la 71 cefalexina que mostró halos de inhibición con un valor promedio de 16.6mm, considerándose más 72 eficaz

Mostajo et al. (2021) al preparar un extracto acuoso al 5% de la parte aérea de la planta (tallo, hojas y flores) de *Calceolaria scapiflora* y de pepa de *Persea americana* var. Fuerte, el tamizaje fitoquímico de ambos extractos arrojó la presencia de lactonas sesquiterpénicas, compuestos fenólicos, triterpenos y flavonoides. Siendo estos principios activos efectivos frente a agentes patógenos, en especial bacterias Gram positivas.

Ñontol & Portal (2020) con el objetivo de determinar la actividad antimicótica in vitro de extractos hidroalcohólicos de flores de tres colores (rojo, amarillo y anaranjado) de la especie *Tropaeolum majus* L. “mastuerzo” sobre *Candida albicans*, concluyeron que el extracto hidroalcohólico de la flor roja del mastuerzo a una concentración del 40% inhibió el crecimiento de *C. albicans* obtenida de secreciones vaginales e infecciones urinarias, llegando a formar halos de inhibición de promedio de 25 mm. Demostrando con ello la efectividad del extracto frente a estos agentes patógenos.

Quispe (2020) obtuvo que la CMI del extracto etanólico y el aceite esencial de cúrcuma sobre *Candida albicans* siendo este el 35%, con halos de inhibición promedio de 20.33 mm, además se notó un efecto fungicida con una concentración del 78.01%, se presentaron halos de inhibición en promedio de 26.06 mm con el antibiótico fluconazol; el extracto al 100% origina un promedio de 25.19 mm de inhibición, siendo este último el más efectivo.

V. Hipótesis del trabajo (Es el aporte proyectado de la investigación en la solución del problema)

El aceite esencial de Moringa oleífera (Moringa) tiene efecto bactericida sobre cepas de *Escherichia coli* enteropatógena.

VI. Objetivo general

Determinar el efecto antibacteriano in vitro y la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de Moringa oleífera (Moringa) sobre cepas de *Escherichia coli* enteropatógena.

VII. Objetivos específicos

- Determinar el efecto antibacteriano de Moringa oleífera (moringa) sobre cepas de *Escherichia coli* enteropatógena.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria que muestra *Escherichia coli* enteropatógena frente al aceite esencial de Moringa oleífera (Moringa)

VIII. Metodología de investigación (Describir el(los) método(s) científico(s) que se empleará(n) para alcanzar los objetivos específicos, en forma coherente a la hipótesis de la investigación. Sustentar, con base bibliográfica, la pertinencia del(los) método(s) en términos de la representatividad de la muestra y de los resultados que se esperan alcanzar. Incluir los análisis estadísticos a utilizar).

a. 1. Extracción del aceite esencial de *Moringa oleífera* (moringa):

1. Extracción de aceite esencial:

- Llenar el balón generador de vapor hasta la mitad con agua corriente e instalar un tubo largo de vidrio (este servirá como sello de seguridad para la generación de vapor).
- El balón donde se realiza la extracción se llena con material a extraer en pequeños pedazos de igual hasta $\frac{3}{4}$ de su altura, midiendo la masa de material adicionada. Anotar dicho valor.
- Realizar el montaje de arrastre con vapor.
- Los balones, tanto el generador de vapor (1) como en el que se realiza la extracción deben de estar soportados sobre una malla de asbesto o refractaria sobre un aro con nuez, o un trípode.
- No olvidar conectar el condensador recto al sistema de agua para asegurar su enfriamiento, con la entrada de agua fresca en la parte inferior, y la salida por la superior, recuerde que debe de mantener un flujo de agua de tal manera que el condensador se mantenga frío.
-



- Al finalizar el condensador se puede adaptar un tubo en U a modo de tubo florentino para realizar la separación del aceite extraído o recogerlo en un Erlenmeyer pequeño y separarlo posteriormente en un embudo de decantación.
- Se debe de verificar que el sistema se encuentra sellado de manera correcta para evitar la pérdida de volátiles y que el condensador se encuentre lo suficientemente frío para poder retener las sustancias de interés.

Proceso de extracción

- Iniciar el proceso de extracción aplicando calor al balón generador de vapor, este se suministra a través de un mechero a gas o una manta de calefacción, si se va a realizar con plancha es necesario cambiar este balón por uno de fondo plano para mejorar la distribución de energía.
- A medida que se genera vapor en este balón, este se va a conducir a través del tubo de vidrio 3, calentándolo, hasta el balón de extracción, recuerde vigilar que el sistema se va calentando progresivamente. Si después de un tiempo prudencial no se calienta o no llega el vapor hasta el balón de destilación es necesario aumentar el calor dado al balón de vapor.
- Para evitar la condensación excesiva del vapor en la línea o en el balón de extracción, se debe aislar empleando algún material con baja conductividad térmica.
- Por otro lado, si en el balón de extracción se comienza a condensar el vapor de agua y se inunda, se puede colocar otro mechero para calentar este, cuidando de no quemar el material vegetal.
- El vapor que sale del balón de extracción se conduce a través del tubo de vidrio hasta el condensador, donde este cambia de fase, se debe de observar una buena condensación, manipulando el flujo de agua de refrigeración, para evitar el escape de compuestos volátiles de interés.
- A medida que se realiza la extracción, se puede observar la separación del aceite de la fase acuosa, para determinar el punto final de la extracción se puede observar un poco del condensado en un vidrio de reloj para observar si aún se extrae aceite.
- Posteriormente se procede a la separación del aceite extraído, utilizando bien sea una pipeta de 1 ml o un embudo de decantación si la cantidad es suficiente. Medir su volumen con un instrumento adecuado (probeta pequeña, pipeta graduada, etc.) y su masa.

2. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA:

- La actividad antimicrobiana se determinará por el método de micro dilución según el NCCLS (NCCLS, 2000) para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).
- Se prepararán inóculos de las cepas microbianas ajustadas a 0.5 de la escala de Mc. Farland, a partir de crecimiento bacteriano en placas con Agar Triptona Soja y de levaduras en medio Sabouraud e incubadas a 37 °C, durante 18-24 horas.
- Se realizarán diluciones dobles de los extractos, desde 100 mg/ml hasta 0.78 mg/ml.
- Se determinará la CMI como la concentración más baja del extracto capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.
- Se empleará como control negativo la incubación con solución de etanol al 70% (v/v)

Determinación de pruebas estadísticas

Para el análisis y comparación de las determinaciones analíticas se utilizará el programa estadístico. STATGRAPHICS Centurion XVI 2010 e InfoStat, versión 2015



Referencias (Listar las citas bibliográficas con el estilo adecuado a su especialidad)

- Baca, C. (2017). Efecto inhibitorio del aceite esencial “muña” *Minthostachys mollis* sobre el género *Proteus*, causantes de infecciones del tracto urinario.
http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/4777/Baca_Melo_Cynhia_Madeine.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Cuadrado B., Rubio G. & Santos W. 2009. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de fríjol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.* Vol. 38 (1): 78 – 104.
- Fuchs, R. (2015). Physical Activity and Health. In *International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences: Second Edition* (pp. 87–90). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097086-8.14115-7>
- Huaracha, O. (2019). Efecto Antimicótico In Vitro Del Aceite Esencial De *Cinnamomum zeylanicum* “CANELA” sobre *Candida albicans*. In Tesis. Universidad Nacional Del Altiplano
- Illanes, A. N. (2020). Efecto antimicrobiano del aceite de *Rosmarinus officinalis* “romero” frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Universidad Nacional Del Altiplano.
- Montoya, O. J. (2019). Efecto Antibacteriano Del Extracto Acuoso De *Bixa Orellana* L. Comparada 162 Con Cefalexina, Sobre *Proteus mirabilis* ATCC 14028 ESTUDIO IN VITRO. Universidad Cesar 163 Vallejo.
- Mostajo, M., De La Torre F. & Tito R. (2021). Metabolitos secundarios y actividad bactericida de *Calceolaria scapiflora* (Calceolariaceae) y Semillas de *Persea americana* (Lauraceae). *Revista Cantua*. Vol. 17 <https://doi.org/10.51343/cantu.v17i0.758>.
- Ñontol, L. & Portal S. (2020). Actividad antimicótica in vitro del extracto hidroalcohólico de los tres colores de flor de *Tropeolum majus* L. “Mastuerzo” en cepas de *Candida albicans*. Tesis de Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo. Cajamarca – Perú. 93 p.
<http://repositorio.upagu.edu.pe/bitstream/handle/UPAGU/1423/FYB-029-2020.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
- Vargas-Sánchez, K., Garay-Jaramillo, E., & González-Reyes, R. E. (2019). j. In *Nutrients* (Vol. 11, Issue 12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu11122907>
- Quispe, K. (2020). Efecto antimicótico in vitro del extracto de la cúrcuma (*Curcuma longa*) frente a la cepa de *Candida albicans*. Tesis de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú. 67 p.
http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/14315/Quispe_Mamani_Karin_Fa_403_biola.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Uso de los resultados y contribuciones del proyecto (Señalar el posible uso de los resultados y la contribución de los mismos)

PROPIEDAD Y USO DE LOS RESULTADOS

Los resultados serán utilizados para fines académicos y de investigación, como base para establecer el efecto antibacteriano y la concentración mínima inhibitoria de *Moringa oleífera* (*Moringa*).

La importancia de realizar este proyecto, se basa en que los resultados contribuirán con la salud pública al brindar una alternativa frente al uso de antibióticos.

IX. Impactos esperados

i. Impactos en Ciencia y Tecnología

En lo científico, permitirá establecer una alternativa para el uso de los antibióticos.
En lo tecnológico, permitirá buscar el uso del principio activo de la planta medicinal.

ii. Impactos económicos

En lo económico será muy eficiente ya que, si se determina el efecto antibacteriano, será de uso económico y fácil accesibilidad para toda la población afectada por infecciones causadas por *Escherichia coli* entero patógena.

iii. Impactos sociales

El impacto a la población será positivo pues brindará una alternativa confiable y económica para el tratamiento de infecciones causadas por *Escherichia coli* entero patógena y talvez más adelante el uso del aceite esencial puede ampliarse a otras especies bacterianas.

iv. Impactos ambientales

Los resultados de esta investigación permitirán preservar el medio ambiente (flora y fauna); pues se evitará el uso de excipientes sintéticos.



Esta investigación no causara ningún impacto ambiental pues es exclusivamente de tipo académico – científico.

- X. Recursos necesarios (Infraestructura, equipos y principales tecnologías en uso relacionadas con la temática del proyecto, señale medios y recursos para realizar el proyecto)

Infraestructura

Laboratorio de Control de Calidad de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Altiplano- Puno

Laboratorios de análisis del sur de la ciudad de Arequipa.

Laboratorio de Microbiología de la FCCBB de la UNA Puno.

Materiales y equipos

- Material vegetal: hojas de *Moringa oleifera* (Moringa).
- Cepas liofilizadas de *Escherichia coli* entero patógena
- Equipo de destilación por arrastre de vapor.
- Placas Petri
- Escala de Mc Farland
- Mechero Bunsen
- Asas kolle
- Medios de cultivo
- Agua destilada
- Frascos de vidrio con tapa rosca

- XI. Localización del proyecto (indicar donde se llevará a cabo el proyecto)

Población muestra

Se tomarán muestras de hojas de Moringa oleífera (Moringa) (10kg), de los principales mercados de abastos de la ciudad de Puno, considerando que esta planta medicinal llega de la zona selva de Puno.

Se obtendrán cepas liofilizadas de *Escherichia coli* entero patógena.

Ámbito de estudio

El presente trabajo de investigación se realizará en el departamento de Puno-Perú precisamente en la Universidad Nacional del Altiplano, las pruebas experimentales se llevarán a cabo en laboratorios de la Facultad de Ingeniería Química de dicha universidad mediante condiciones ambientales de la Región en cuestión y en el Laboratorio de Microbiología de la FCCBB de la Una Puno.

- XII. Cronograma de actividades

Actividad	Meses											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Búsqueda de información.	X	X	X									
Recolección de muestras			X	X								
Preparación de las pruebas experimentales					X	X						
Ejecución de las pruebas experimentales						X	X	X	X			
Caracterización del tanino									X	X		
Evaluación de resultados y análisis estadístico									X	X	X	
Presentación de informes (avances)			X			X						X
Presentación del informe final												X

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

XVI. Presupuesto

Descripción	Unidad de medida	Costo Unitario (S/.)	Cantidad	Costo total (S/.)
Reactivos e insumos de laboratorio	Unidad			
Agua destilada	Litros	5	5	25.00
Aceite esencial de Moringa	MI	30	30	50.00
Cepas liofilizadas de E. coli entero patógena	Unidad	400	1	400.00
Medios de cultivo	Gr	400	3	1200.00
Balón de gas con contenido	Unidad	120	1	120.00
Escala de Mac Farland	Unidad	200	1	200.00
Materiales de uso y protección personal	Unidades			
Escobilla de limpieza	Unidades	5,00	02	10,00
Lentes de seguridad	Unidades	4,00	6	24,00
Guantes de latex	Caja	3	60	180,00
Mandil de seguridad	Unidades	25,00	10	250,00
Gorro de bioseguridad	Unidades	3,00	20	60,00
Tachos para desechos	Unidades	40,00	2	80,00
Materiales de oficina	Unidades			
Útiles de escritorio	Unidades	5,00	04	20,00
Computo	Servicio	200,00	08	1600,00
Internet	Servicio	120,00	01	120,00
Tratamiento estadístico	Unidad	2000,00	1	2000,00
Redacción del informe final	Unidad	3000,00	1	3000,00
Varios	Unidad	2000,00	3	6000,00
TOTAL				15341.00