



Universidad de Carabobo
Facultad Ciencias de la Salud
Escuela de Bioanálisis
Departamento de Investigación y Desarrollo Profesional
Trabajo de Investigación



Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de callo de *Moringa oleífera Lam.*, en *Klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE). ATCC 700603

Autores:

Br. Vilma Estrada

Br. Nahexys Pérez

Tutor:

Prof. Dr. Rafael Fernández

Asesor:

Dra. Santina Coccione

Valencia, Abril 2022

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Quien suscribe, Dr. Rafael Fernandez Da Silva, portador de la cédula de identidad No. V-9.959.898, por medio de la presente certifico que he tenido conocimiento y asesore el Trabajo de Investigación titulado: “**Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de callo de *Moringa oleífera* Lam., en *Klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE). ATCC 700603)**”, desde su inicio hasta su culminación. El mismo fue realizado por las bachilleras Vilma Estrada y Nahexys Pérez, portadores de la cédula de identidad **No. V-32.949.750, V-25.122.904**, respectivamente. Consideramos que el presente estudio reúne los requisitos suficientes para ser sometido a evaluación.

Dr. Rafael Fernandez
C.I: **9.959.898**



ACTA DE APROBACIÓN

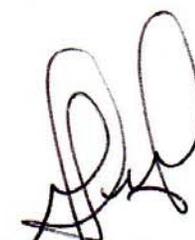
Quienes suscriben, miembros del Jurado designado por la Coordinación de la Asignatura Trabajo de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud – Sede Carabobo, para evaluar el trabajo titulado **“Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de callo de Moringa oleífera Lam., en Klebsiella pneumoniae productora de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE) ATCC 700603** Realizado por las estudiantes: Vilma Estrada, Nahexys Perez titulares de la Cédula de Identidad No. V-32.949.750 y V-25,122.904, respectivamente; y tutorado por el Profesor **Rafael Fernández**, titular de la Cédula de Identidad No. V- 9.959. 898. Hacemos de su conocimiento que hemos actuado como jurado evaluador del informe escrito, presentación y defensa del citado proyecto. Consideramos que reúne los requisitos de mérito para su **APROBACIÓN**.

En fe de lo cual se levanta esta Acta, en Valencia a los Veinticuatro días del mes de abril del año dos mil veintidós.


Prof. Santina Coccione
C.I: 10.063.311
Jurado Principal


Prof. Nairalith Ramos
C.I:11.271.318
Jurado




Prof. Gladriel Padrón
C.I:
12.368.844

DEDICATORIA

A mis padres (Alicia y Carlos); mis principales apoyos a lo largo de toda la carrera, por estar siempre pendientes de mí, por escucharme siempre y por no dejarme rendir. Sin ellos no hubiera podido desarrollar el presente trabajo de grado.

A mi hermana Francia Helena, por estar a mi lado en cada uno de los retos que tuve, por sus consejos y correcciones siempre oportunos.

A mí hijo Carlos Alberto, una motivación para no rendirme y poder llegar a ser un ejemplo para él.

A todos los que de una u otra forma participaron en lo que soy hoy.

Vilma Estrada.

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño a mi amada Madre Yolimar Siolo por su amor, sacrificio, entrega, apoyo, por impulsarme cada día a seguir adelante para lograr lo que quiero. A mi padre Jean Pérez, por su amor, cariño apoyo y por creer en mí. A mi hija Sophia Suárez por su amor, paciencia y apoyo al entender que los días de ausencia eran para poder lograr mi meta. A mi esposo Freddy Suárez por su apoyo y amor, por cada día estar a mi lado luchando para lograr el objetivo. También va dedicada a cada una de las personas que me apoyaron para que esto fuera posible, los amo a todos. Muchas gracias.

Nahexys Pérez

AGRADECIMIENTOS

Primero damos gracias a Dios por darnos la sabiduría, paciencia, herramientas y personas necesarias para la realización de esta tesis. Un agradecimiento especial a nuestro Querido y respetado tutor Doctor Rafael Fernández Da Silva por su dedicación, orientación, y compromiso para llevar a cabo nuestro proyecto. Un gracias a cada uno de nuestros profesores por formar parte de nuestro aprendizaje; queremos extender un agradecimiento especial a la Profesora y Doctora Santina Coccione, nuestra asesora metodológica por todo su apoyo, orientación y paciencia para la realización de esta tesis. Gracias a Marcelo Molinatti por su apoyo y valioso aporte en la parte estadística; un agradecimiento especial a nuestra compañera Doris Reyes por el aporte de sus conocimientos para el procesamiento experimental de esta investigación. Finalmente, gracias a todos los que aportaron su granito de arena para que esta tesis se llevara a cabo.

INDICE GENERAL

	Pág.
INDICE DE TABLAS.....	vi
INDICE DE GRAFICAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	3
MATERIALES Y METODOS.....	4
RESULTADOS	6
DISCUSION.....	9
CONCLUSIONES.....	10
RECOMENDACIONES	11
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	12

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de la interacción del extracto etanólico del callo de semillas de *Moringa Oleífera Lam* con *Klebsiella pneumoniae* BLEE ATCC 700603 para determinar el efecto antibacteriano a diferentes concentraciones en 1,2,3,4,5 y 6 horas.....Pág. 8

Tabla 2. Resultados de la interacción del extracto etanólico de callo de semillas de *Moringa oleífera Lam.*, con la *Klebsiella pneumoniae* BLEE ATCC 700603, para determinar el efecto antibacteriano a diferentes concentraciones incubados a 37°C por 24 horas en medio Líquido y Sólido.....Pág. 9

INDICE DE GRAFICAS

Grafica 1. Resultados de la interacción del extracto etanólico del callo de semillas de *Moringa Oleífera Lam* con *Klebsiella pneumoniae* BLEE ATCC 700603 para determinar el efecto antibacteriano a diferentes concentraciones en 1,2,3,4,5 y 6 horas.....Pag.8

Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de callo de *Moringa oleífera* Lam., en *Klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE). ATCC 700603

Autores: Vilma Estrada y Nahexys Pérez

Tutor: Dr. Rafael Fernández Da Silva

Asesor metodológico: Dra. Santina Coccione

Línea de investigación: CBA

Financiado por: Los autores y el Tutor

Realizado en: FACYT- Biología, U.C

RESUMEN

La *Moringa oleífera* Lam., es un árbol multipropósito versátil de origen indio, conocido ancestralmente por sus diversos usos medicinales, nutricionales y antioxidantes, así como por sus propiedades antimicrobianas, concatenadas a ciertos componentes fotoquímicos. Actualmente, los microorganismos multiresistentes, son de gran interés clínico, debido a que es un problema de salud pública a nivel mundial, siendo las enterobacterias productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) las que representan un reto en la práctica médica, al dejar pocas alternativas terapéuticas. Se evaluó la actividad antibacteriana del extracto etanólico de callo de *Moringa oleífera* Lam., en *Klebsiella pneumoniae* (BLEE), utilizando el método de microdilución en placa; donde se evidencia que en concentraciones de 30 y 35% hay una disminución en el crecimiento bacteriano luego de 6 horas de realizado el ensayo.

INTRODUCCION

En la actualidad la multiresistencia de los microorganismos bacterianos, es un problema de salud pública a nivel mundial, generando gran interés desde el punto de vista clínico, en particular con las enterobacterias productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) las que representan un reto en la práctica médica, al dejar pocas alternativas terapéuticas, siendo objeto en la búsqueda de estrategias farmacéuticas alternativas naturales, que permita combatir las infecciones ocasionadas por las cepas BLEE. ⁽¹⁾

En este sentido, que las beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas capaces de hidrolizar un amplio espectro de medicamentos del tipo penicilinas, cefalosporinas de amplio espectro y monobactámicos, cuyos genes codificantes se localizan en plásmidos que son potencial y rápidamente transferibles de cepa a cepa entre especies bacterianas, cuya prevalencia hospitalaria es común con *Klebsiella pneumoniae*, generando alto riesgo de mortalidad en los pacientes de la UCI. ^(2, 3, 4)

De tal manera, desde 1980 se incrementó el interés en estudiar nuevos agentes antimicrobianos de fuentes naturales utilizadas desde tiempos ancestrales, cuyos efectos curativos coadyuvarían en países en vía de desarrollo dado a sus propiedades terapéuticas. ⁽⁵⁾

Entre las numerosas y diversas plantas de uso medicinal, a través de distintos extractos, con propiedades bactericidas, se tiene al árbol llamado comúnmente moringa, cuyo nombre científico es *Moringa oleífera Lam* (Familia Moringaceae), nativo de la región occidental de la India, cuyo cultivo se ha extendido por Pakistán, Asia Menor, África y Arabia y la región del caribe de América. Esta planta se le cataloga de milagrosa, ya que se le atribuyen importantes propiedades nutricionales y medicinales en todos sus componentes vegetativos (tallo, hojas y raíces) y reproductivos (flores y frutos) ^(6,7); al ser rica en potasio, calcio, fosforo, hierro, vitamina A y D y aminoácidos esenciales, así como

de metabolitos secundarios como glucosinolatos e isotiocianatos, que son moléculas responsables de las propiedades antimicrobianas. ⁽⁸⁾

El efecto antimicrobiano de la *Moringa oleífera* se debe a los metabolitos secundarios que fácilmente pueden obtenerse a través del uso de solventes orgánicos, tales como cetonas, éteres o alcoholes, tal como se ha constatado en diversos estudios acerca de las propiedades antimicrobianas efectivas de extractos foliares, de semillas, de corteza y de flores de la misma. ⁽⁹⁾

Así diversos estudios *in vitro* han confirmado la actividad antibacteriana de fitoquímicos presentes en los extractos de *Moringa oleífera* sobre bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas. Con extractos de semillas se muestra actividad bactericida contra algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ⁽¹⁰⁾. Igualmente, al comparar la actividad antimicrobiana de extractos foliares de esta planta con otras especies vegetales (*Xanthosoma maffia*, *pasiflora edulis*) se demostró su mayor efectividad al inhibir el crecimiento de diversas cepas bacterianas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Providencia stuartii*. ⁽¹¹⁾

Finalmente, dado lo descrito previamente, esta investigación consistió en evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico del callo de *Moringa oleífera* Lam., en *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) ATCC 700603 ⁽¹²⁾, a fin de generar el desarrollo de futuros estudios que faciliten el establecimiento de medicamentos de origen natural vegetal con esta emblemática especie vegetal, que permitan vencer la multiresistencia microbiana.

Se trata de una investigación de tipo cuasi experimental, donde no se tiene control total sobre el criterio empleado para asignar participantes a grupos; analiza cambios a través del tiempo dentro de alguna población en general para medirle su evolución por periodos.

De ahí, que este proyecto consistirá en la utilización del extracto de callo de *Moringa oleífera* y una bacteria productora de BLEE, para evaluar y analizar el efecto antimicrobiano a diferentes concentraciones a tiempos establecidos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de callo de *Moringa oleífera* Lam., en *Klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE). ATCC 700603

Objetivos Específicos

- Obtener extractos etanólicos en diferentes concentraciones de callo de *Moringa oleífera*.
- Determinar la concentración óptima del extracto etanólico de callo de *Moringa oleífera* Lam., con efecto antimicrobiano en *Klebsiella pneumoniae* (BLEE) ATCC 700603).
- Evaluar el tiempo óptimo del extracto etanólico de callo de *Moringa oleífera* Lam., para determinar el efecto antimicrobiano en *Klebsiella pneumoniae* (BLEE) ATCC 700603).
- Analizar el efecto antimicrobiano del callo de *Moringa oleífera* en *Klebsiella pneumoniae* (BLEE) ATCC 700603).

MATERIALES Y METODOS

El presente estudio de tipo cuasi experimental se realizó en el Centro de Biotecnología Aplicada (CBA), del Departamento de Biología, de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (Facyt) de la Universidad de Carabobo para su desarrollo se cumplió el siguiente procedimiento.

Material Vegetal

Las semillas inmaduras extraídas de las vainas de *Moringa oleífera Lam*, fueron los explantes que se utilizaron en este trabajo, las cuales se colectaron de un Árbol juvenil ubicado en el parque de la urbanización Sansur (Mun. San Diego-Edo Carabobo) e identificadas por un botánico. A partir de las semillas, se indujo la formación de callo no embriogénico.

Preparación del extracto etanólico, de los callos de *Moringa oleífera Lam*

El callo no embriogénico de 4 semanas de iniciado, se secó a 45°C en una estufa por 48 horas, para luego realizarse la pulverización del mismo en una licuadora previamente esterilizada y desinfectada. Seguidamente, se realizó una extracción con etanol al 75% con 0.5 g de polvo del callo, en tubos cónicos de 5 ml, obteniendo una concentración final de 10 % p/v. Para promover la interacción del solvente con el polvo de callo, dicha mezcla se mantuvo durante 48 h en agitación continua a 65 rpm. Luego se centrifugo a 10.000 rpm durante 10 min a fin de separar la fase líquida de la biomasa correspondiente. La fase líquida se trasvaso a un tubo Eppendorf, que fue incubado a 70°C para la evaporación del solvente, la muestra obtenida se resuspendió en DMSO al 0.25% y se refrigero hasta su uso, siguiendo el protocolo general establecido por Reyes y Fernández, para evaluar el efecto antimicrobiano⁽¹³⁾.

Cepa del microorganismo

Se utilizó la cepa de *Klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE) ATCC 700603, adquirida en el Centro Venezolano de Colección de Microorganismos (CVCM) de la Facultad de Ciencias de la UCV en la ciudad de Caracas. La cepa BLEE se reactivó en un medio líquido de caldo nutritivo, para luego ser incubadas en estufa a 37°C durante 24 horas en condiciones normales de gases. Seguidamente se realizó una coloración de Gram para constatar la pureza del cultivo, para luego cultivarse en el medio selectivo Mc Conkey, para aislar colonias y finalmente preparar una suspensión bacteriana al 0,5% McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml).

Determinación de la actividad antimicrobiana por el método de micro dilución

A partir del extracto etanólico de callo no embriogénico, se ensayaron diferentes concentraciones (5%,10%,15%,20%,25%,30 y 35%) con la cepa de *Klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE) ATCC 700603.

Se reactivó la cepa BLEE en un caldo nutriente estéril, incubando en el mismo durante 24 horas a 37°C. Transcurrido el tiempo indicado se elaboró el inóculo equivalente al patrón de 0.5 de la escala de McFarland (representa 1.5×10^8 UFC/ml) midiendo en espectrofotómetro a 540 nm. ⁽¹⁴⁾

Para el ensayo por triplicado, se utilizó una microplaca estéril (Protocolo de esterilización: abierta bajo luz UV durante 4 horas) de 96 pocillos, con capacidad de 375 µL c/u. Inicialmente se colocó 240µL de caldo nutriente en cada pocillo, con un inóculo bacteriano de 80µL en cada pocillo, con diferentes volúmenes de los extractos preparados para obtener las concentraciones (5%,10%,15%,20%,25%,30% y 35%). Adicionalmente se tomó como control positivo, caldo bacteriano con caldo nutriente y como control negativo, el extracto de callo con caldo nutriente. Posteriormente se selló la microplaca y se colocó en una estufa a 37°C por 1,2,3,4,5 y 6 horas. ⁽¹⁵⁾

Transcurrido el tiempo de incubación antes señalado, se tomó 100µL, que fueron plaqueados por triplicado, empleándose la técnica de siembra en superficie con espátula de Digrafski, con la finalidad de poder observar si era viable el crecimiento de la bacteria en estudio y así poder evidenciar la efectividad de las diferentes concentraciones ensayadas. Igualmente se inoculó 10µL en un tubo de ensayo que contenía 2ml de caldo nutriente virgen por cada concentración, para evidenciar el posible crecimiento de la bacteria, mediante la turbidez (Prueba cualitativa). También se realizaron los controles positivos y negativos correspondientes a las pruebas. Se dejó incubar por 24 horas a 37°C. Luego se observaron las colonias en cada una de las placas y se observó la turbidez en los diferentes tubos, registrándose de la siguiente manera: negativo (cristalino), (ligeramente turbio), + (turbio) ++.⁽¹⁶⁾

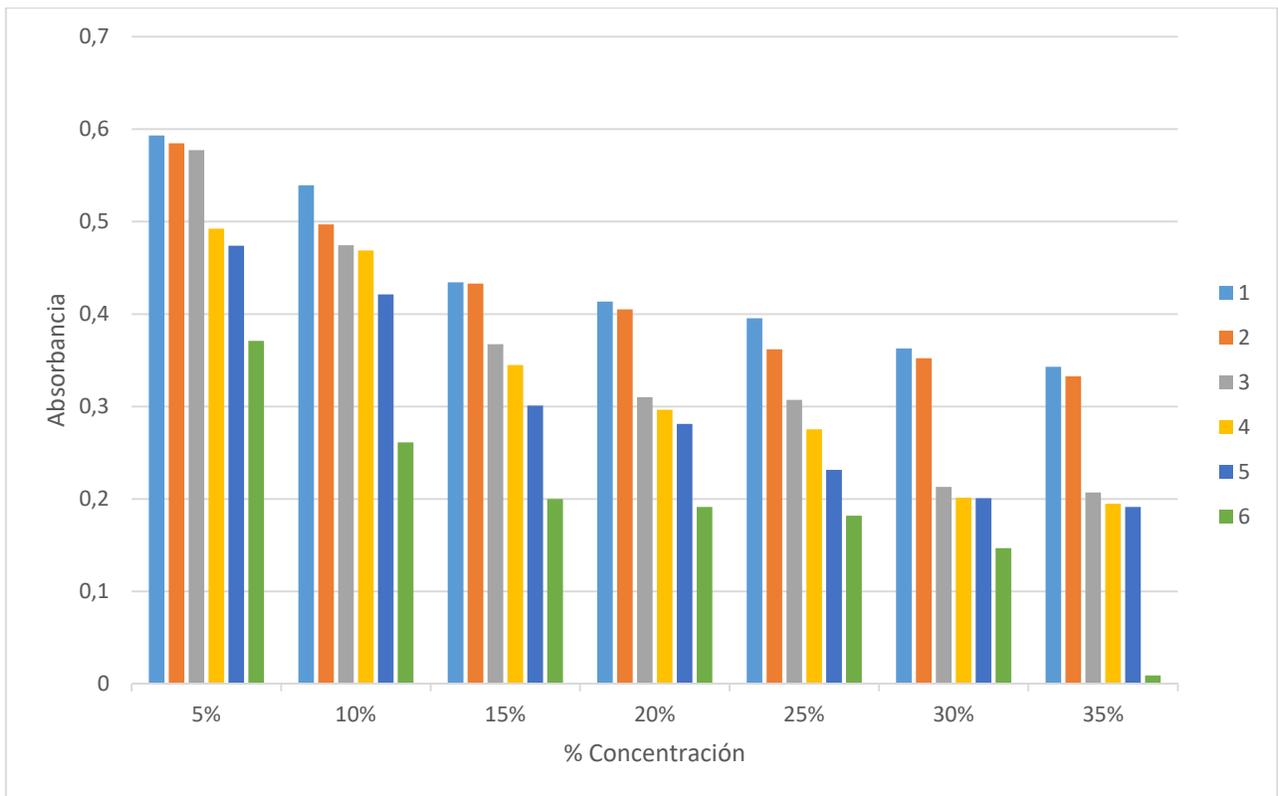
Resultados

En este trabajo de investigación se logró evidenciar como disminuyó el crecimiento de la bacteria en estudio; donde se observó que a mayor concentración del extracto etanólico de *Moringa oleífera Lam*, la bacteria tenía un menor crecimiento. Esto se evaluó por un periodo de tiempo (1,2,3,4,5 y 6 horas); en otras palabras, en los hallazgos, se observa una disminución en el crecimiento bacteriano que es dependiente de la concentración, así como del tiempo (Ver tabla 1 y Gráfica 1).

Además, se pudo constatar que mediante la implementación de otras técnicas; como siembra en placa y tubos con caldo nutriente, que a mayor concentración del extracto decreció la presencia de la bacteria (Ver tabla 2).

Concentraciones	1 hora	2 horas	3 horas	4 horas	5 horas	6 horas
5%	0,5931	0,5847	0,5773	0,4923	0,4739	0,3710
10%	0,5394	0,4969	0,4745	0,4688	0,4213	0,2612
15%	0,4344	0,4329	0,3674	0,3449	0,3010	0,2000
20%	0,4136	0,4051	0,3100	0,2965	0,2811	0,1914
25%	0,3954	0,3619	0,3072	0,2754	0,2315	0,1818
30%	0,3627	0,3522	0,2131	0,2013	0,2008	0,1468
35%	0,3429	0,3326	0,2070	0,1948	0,1913	0,0090

Tabla N° 1 Resultados de la interacción del extracto etanólico del callo de semillas de *Moringa Oleífera Lam* con *Klebsiella pneumoniae* BLEE ATCC 700603 para determinar el efecto antibacteriano a diferentes concentraciones en 1,2,3,4,5 y 6 horas.



Gráfica No. 1 Resultados de la interacción del extracto etanólico del callo de semillas de *Moringa Oleífera Lam* con *Klebsiella pneumoniae* BLEE ATCC 700603 para determinar el efecto antibacteriano a diferentes concentraciones en 1,2,3,4,5 y 6 horas.

Tabla 2: Resultados de la interacción del extracto etanólico de callo de semillas de *Moringa oleífera Lam.*, con la *Klebsiella pneumoniae* BLEE ATCC 700603, para determinar el efecto antibacteriano a diferentes concentraciones incubados a 37°C por 24 horas en medio Líquido y Sólido.

Concentraciones %	Placas a 24 horas	Placas a 24 horas	Placas a 24 horas	Medio líquido
5	AC	AC	AC	Muy turbio
10	AC	AC	AC	Turbio
15	MC	MC	MC	Turbio
20	MC	MC	MC	Turbio
25	EC	EC	EC	Turbio
30	EC	EC	EC	Lig. Turbio
35	EC	EC	EC	Lig. Turbio
Control positivo	AC	AC	AC	Muy turbio
Control negativo	S/C	S/C	S/C	S/T

Leyenda: Abundante crecimiento(AC), Moderado crecimiento (MC), Escaso crecimiento(EC) Sin crecimiento (S/C), Sin turbidez (ST)

DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación son similares a los mencionados por Cárdenas en el 2019; al evaluar la actividad antimicrobiana del extracto de *Moringa oleífera* Lam frente a las bacterias Gram negativas, en el cual hubo inhibición del crecimiento con discos impregnados con solución a concentraciones de 0.5%, 1.0 y 2% (m/v) aumentando el diámetro al aumentar la concentración del extracto en el disco. Así en la presente investigación se obtuvo un efecto antimicrobiano con el extracto con la cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603⁽¹⁸⁾.

Actualmente, recientes estudios como los descritos por Moreno et al en 2019, han demostrado la actividad antimicrobiana de los extractos de semillas de *Moringa*; los cuales flocculan bacterias Gram positivas y Gram negativas como *Escherichia coli*, *Shigella*, *Bacillus cereus* y *Salmonella typhi*; patógenos habituales de las aguas turbias en donde concentraciones de 5 mg/ml del extracto se obtuvo 99.2% a 100% de inhibición⁽¹⁹⁾

Complementando lo anterior, Majali et al en 2015, determinaron la concentración mínima inhibitoria de un extracto etanólico de semilla de *Moringa oleífera* contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* resultando 13.9 y 7 mg/dl respectivamente⁽²⁰⁾

En otro estudio, realizado por Rodríguez en el 2018 se demostró la actividad antimicrobiana de la semilla sobre bacterias patógenas tanto Gram positivas como negativas atribuido a propiedades bacteriostáticas que le da el isotiocianato de bencilo que tiene acción bactericida sobre especies patógenas⁽²¹⁾; lo cual es comparable con nuestro trabajo con el extracto etanólico del callo de *Moringa oleífera*; el cual tiene un efecto inhibitorio en relación al tiempo de incubación y concentración del extracto⁽²¹⁾

CONCLUSIONES

A medida que va pasando el tiempo en ausencia de interacción entre la bacteria y el extracto; la concentración bacteriana se incrementara.

Por lo que se determinó que, a mayor tiempo de incubación bacteriana en presencia de los extractos, el crecimiento bacteriano disminuyó e igualmente depende de la concentración de estos.

De manera que, a mayor concentración del extracto, la tasa de crecimiento bacteriano disminuye independientemente del tiempo considerado.

Por otro lado, las concentraciones de 30% y 35% demostraron ser más eficientes en la disminución del crecimiento bacteriano luego de 6 horas de realizado el ensayo

Este resultado puede ser de gran utilidad en la salud pública debido al uso de productos de origen natural con propiedades antimicrobianas disminuirá los costos, favoreciendo a las poblaciones de menos recursos para el tratamiento de enfermedades generadas por especies microbianas patógenas.

RECOMENDACIONES

Profundizar el estudio de las propiedades antimicrobianas de todas las partes de la planta de *Moringa oleífera* y sobre su efecto en otros microorganismos patógenos.

Estandarizar métodos para una mejor obtención de los extractos.

Aislar y separar la(s) sustancia(s) que le atribuye la actividad antimicrobiana a esta especie vegetal, para así obtener medicamentos que sean efectivos contra microorganismos que afectan la salud.

Hacer estudios de toxicidad de los distintos extractos de esta planta, para conocer si hay un riesgo en la salud humana.

Continuar la investigación con esta especie vegetal, a fin de lograr en un futuro cercano, la formulación de productos farmacéuticos que contribuyan a disminuir la alta resistencia bacteriana a los antibióticos existentes.

Referencias bibliográficas:

1. Reynolds, N., Simons, M., Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. *Rev. Perú. Mes. Ex. Salud pública* [online]; 2015; 32(1):140.
2. Organización Mundial de la Salud. Las infecciones por bacterias resistentes suponen un coste anual de 1.500 millones de euros a los sistemas sanitarios europeos. (2016) Disponible en: <http://www.msd.es/sobre-nosotros/noticias-2016-09-08.xhtml#>
3. Arce, Z., Flores, R., Rivera-Jacinto, M., Rodríguez-Ulloa, C., Serquen, L., Betalactamasas de espectro extendido tipo TEM y CTX-M en *Klebsiella* spp y *Escherichia coli* Aisladas de superficies de ambientes hospitalarios. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*; 2016; 33(2): 375.
4. Gutiérrez-Fernández, J., Hoyos-Mallecot, Y., Jiménez-Guerra, G., Navarro-Mari, J., Rodríguez-Granger, J., Método rápido para la detección de la sensibilidad a cefotixima en enterobacterias. *Revista Argentina de Microbiología*; 2016; 48(4):323-323.
5. Castañeda, V., 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. Tesis de pregrado. Universidad Politécnica Salesiana. Cuenca-Ecuador; 2019;9-10.
6. Simons M., Reynolds N., Rocha Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. *Rev. Perú. Mes. Ex. Salud pública*; 2015; 32(1):140.
7. Salcedo, M, “Efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de Moringa (*Moringa oleífera*) en concentraciones de 25 %, 50%, 75% y 100% sobre Streptococcus mutans. Tesis de pregrado. Estudio *in vitro*” Facultad de Odontología. Universidad Central del Ecuador. Quito Ecuador; 2017; 15.
8. Azuero, A., Jaramillo, C., San Martín, D. & D’Armas, H. (2016). Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. *Revista Ciencia UNEMI*; 2016; 9(20):12
9. Abdellated, E.; About-Enein, K.; D afalla, H.; El-sheny, H.; Khalafalla, M.; Dedifferentiation of leaf explants and antileukemia activity of an ethanolic extract of cell cultures of Moringa oleifera. *African Journal of Biotechnology*; 2011; 10(14): 2746-2750.
10. Gacharná, N. & Mora, J. El árbol milagroso: La *Moringa oleífera*. *Biodiversidad – Colombia*; 2015; 50- 57.

11. Cantillo, T., García, D., Martínez, E., Micro biota asociada a lotes importados de semillas de Moringa (*Moringa oleífera*). *Fitosanidad*; 2013; 17(3):125-126.
12. Reyes, D., Fernández, R., Actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto foliar de zabila (*Aloe vera* L.) en microorganismos de interés clínico. *Revista Salus*; 2014; 18(3): 27-31.
13. Reyes, D., Fernández, R., Efecto biocida *in vitro* del extracto foliar de *Azadirachta indica* en *Staphylococcus* sp y *Pseudomonas* sp. *Revista Salus*; 2013; 17(3):34-41.
14. Sánchez, C., Delgado, S., Validación del método de microdilución para la actividad antimicrobiana de extractos de plantas (Ortiga, ajeno, malva olorosa). Tesis de pregrado. Universidad de Cuenca. España. 2010. p. 65
15. Miller, G., Cunningham, A., Iwase, Y., Lautensesack, N., Sattay, W., A Laboratory Activity Demonstrating the Antibacterial Effects of Extracts from Two Plant Species, *Moringa oleífera* and *Allium sativum* (Garlic). *J. Microbiol Biol Educ.*, 2017, 18(3):1-7.
16. Alarcón, M., Fernández, R., Reyes, D., *Moringa oleífera*: potenciales usos en odontología. *Revista Salus*; 2017; 21(2):30-32.
17. Álvarez, C. Propiedades farmacológicas de Moringa oleífera. Tesis de Grado. Universidad de Sevilla. 2019. p 16
18. Cárdenas, A., Desarrollo y Evaluación *in vitro* de andamios libre de colágeno y compuestos fitoquímicos. Tesis de Grado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada Baja California. México. 2019. p 44.
19. Majali, I., Oran, S., Khleifat, K., Qaralleh, H., Rayyan, W., Althunibat, O., Assessment of the antibacterial effects of Moringa peregrina extracts. *African J. Microbio. Res.*, 2015; 9(51):2410-2414.
20. Rodríguez, K., Comparación del efecto antimicrobiano *in vitro* del aceite esencial de las semillas de Moringa oleífera Lam frente a Gentamicina y Nitrofurantoina sobre *Escherichia coli* ATCC 35218. Tesis de grado. Universidad Nacional Jorge Besadre Grohmann –TACNA. Tacna Perú. 2018. p. 54
21. Moreno, S., Valqui, D., Efecto del Extracto etanólico de Moringa oleífera sobre la supervivencia de *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 *in vitro*. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 2019. p. 13