

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

INFORME DE INVESTIGACIÓN SOBRE:

"EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA Y ANTI BIOFILM DE ACEITES ESENCIALES EN *KLEBSIELLA SP*."

Requisito previo para optar por el Título de Licenciada en Laboratorio Clínico

Autora: Morales Maliza, Karen Natasha

Tutora: PhD. Proaño Pérez, María Elizabeth

Ambato – Ecuador

Junio, 2026

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutora del Trabajo de Investigación sobre el tema: **"EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA Y ANTI BIOFILM DE ACEITES ESENCIALES EN *KLEBSIELLA SP.*"** del Srta. Morales Maliza, Karen Natasha estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico, considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometida a la evaluación del jurado examinador designado por el H. Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias de la Salud

Ambato, junio 2026

LA TUTORA

Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
MARIA ELIZABETH
PROAÑO PEREZ

……..

PhD. Proaño Pérez, María Elizabeth

AUTORIA DE TRABAJO DE GRADO

Los criterios emitidos en el Trabajo de investigación sobre **"EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA Y ANTI BIOFILM DE ACEITES ESENCIALES EN *KLEBSIELLA SP*."** como también las ideas, análisis, conclusiones y propuesta siendo de exclusiva responsabilidad de mi persona, como autora de este trabajo de grado.

Ambato, junio 2026

LA AUTORA

Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
KAREN NATASHA
MORALES MALIZA

…….

Morales Maliza, Karen Natasha

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este proyecto de investigación o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación

Cedo los derechos patrimoniales de mi tesis con fines de difusión pública; además apruebo la reproducción de este proyecto de investigación, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autora.

Ambato, junio 2026

LA AUTORA

Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
KAREN NATASHA
MORALES MALIZA

…….

Morales Maliza, Karen Natasha

APROBACIÓN DEL JURADO EXAMINADOR

Los miembros del Tribunal Examinador aprueban el Informe de Investigación sobre el tema **"EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA Y ANTI BIOFILM DE ACEITES ESENCIALES EN *KLEBSIELLA SP.*"** de Morales Maliza, Karen Natasha estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico

Ambato, junio 2026

Para constancia firman

…….. **…….**

PRESIDENTE 1er VOCAL

…….

2do VOCAL

DEDICATORIA

"Trabajar duro es importante, pero hay algo que importa más: creer en ti mismo" – J.K. Rowling

El presente trabajo de investigación quiero dedicarlo, en primer lugar, a mis padres. A mi madre, Carina Maliza, la mujer, que sin importar que tan cansada estuviera, siempre me ofreció su apoyo incondicional, su cariño y su infinita paciencia. A mi padre, Carlos Morales, quien, a pesar de sus múltiples ocupaciones, siempre encontró el tiempo para velar por mí y demostrarme que, aunque en ocasiones pareciera estar sola, él siempre estaría para sostenerme de una u otra manera. Este logro es tan suyo como mío, pues sin su sacrificio nada de esto habría sido posible; es la recompensa de todo su esfuerzo como padres.

A mi hermano, Gerson, quien, a pesar de su carácter fuerte, siempre estuvo presente cuando más lo necesité. Saber que podía contar con él como mi contacto de emergencia me dio tranquilidad durante este proceso. Gracias por convertirte en mi chofer personal para ayudarme a culminar esta carrera y por aquellos pequeños detalles que se transformaron en momentos de alegría en medio del caos universitario.

A mis tíos Kevin, Ruth, Juan, María y David, quienes se sintieron orgullosos de cada pequeño logro alcanzado durante mi formación profesional y creyeron en mi potencial incluso cuando yo misma dudaba de mis capacidades. Gracias por brindarme su apoyo, ya fuera mucho o poco, y por acompañarme en los momentos más difíciles. A mi mamá Chelita, por su cariño incondicional y por estar siempre presente, aun en la distancia, celebrando cada uno de mis logros con orgullo y amor, convirtiéndose en mi fan número uno. A mi ángel, mi mamá Elsita, aunque no pudo verme culminar esta etapa, gracias por acompañarme siempre desde el amor y el recuerdo.

Finalmente, a los amigos que formé durante esta etapa, especialmente a Erika, quien compartió conmigo no solo conocimientos e ideas, sino también su amistad y cariño a lo largo de este proceso. Asimismo, a Melanie, Damaris, Fernanda, Estefania y Brayan, gracias por acompañarme en momentos de alegría, estrés y miedo; sin su compañía, este camino habría sido mucho más difícil.

Morales Maliza, Karen Natasha

AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a Dios por darme la fuerza, la sabiduría y la vida para culminar esta hermosa etapa de mi vida. Agradezco al PhD. Alberto Bustillos, director del proyecto de investigación titulado "Evaluación de la actividad antimicrobiana y antibiofilm de aceites esenciales microencapsulados", con Resolución Nro. UTA-CONIN2024-0025-R; y a la PhD. Elizabeth Proaño, directora subrogante, por permitirme formar parte del proyecto de investigación. Además, agradezco al Bq. F. Mg. Víctor Guangasig y al Lcdo. Msc. Mario Vilcacundo (FCS), así como al PhD. Orestes López (FCIAL), quienes participaron como investigadores del proyecto y me brindaron su apoyo durante todo el proceso investigativo.

Expreso un especial agradecimiento a mi tutora, Lcda. PhD. Elizabeth Proaño, por acompañarme durante el desarrollo de esta investigación, por su paciencia, dedicación y apoyo constante en cada dificultad presentada durante la fase experimental. Gracias por motivarnos a continuar incluso en los momentos más complejos y por enseñarnos que la investigación científica es un campo apasionante y lleno de aprendizaje.

Asimismo, agradezco a la Lcda. Mg. Johanna Pérez por sus consejos, apoyo y paciencia durante esta etapa. Su acompañamiento y disposición para escucharme fueron fundamentales al inicio de esta investigación.

Finalmente, expreso un agradecimiento especial a quien fue como un segundo tutor durante el desarrollo de esta investigación, el Lcdo. Jefferson Acurio. Gracias por compartir sus conocimientos con generosidad, por su paciencia y por estar siempre dispuesto a responder cada inquietud, sin importar cuan sencilla pareciera. Su apoyo y enseñanza fueron fundamentales a lo largo de este proceso.

Morales Maliza, Karen Natasha

ÍNDICE GENERAL

APROBACIÓN DEL TUTOR ii
AUTORIA DE TRABAJO DE GRADO iii
DERECHOS DE AUTOR iv
APROBACIÓN DEL JURADO EXAMINADOR v
Dedicatoria vi
Agradecimientos vii
ÍNDICE DE TABLAS x
ÍNDICE DE GRÁFICOS xii
ÍNDICE DE ANEXOS xiii
RESUMEN xv
SUMMARY xvi
INTRODUCCIÓN 1
Justificación 3
CAPÍTULO I 5
1.1 Antecedentes de investigación 5
1.3 Objetivos 9
1.3.1 Objetivo General: 9
CAPÍTULO II 10
METODOLOGÍA 10
2.1 Materiales 10
2.1.1 Medios de cultivo 10
2.1.2 Instrumentos 10
2.1.3. Cepa de referencia 10
2.2. Reactivos 11
2.3. Equipos 11
2.4. Métodos 12
2.4.1 Tipo de investigación 12

2.4.2 Población y muestra 12
2.4.3 Criterios de inclusión y exclusión 12
2.4.4 Hipótesis de investigación 12
2.4.5 Variable de estudio 12
2.4.6 Procedimiento para el análisis de laboratorio 13
2.4.6.1 Microencapsulación 13
2.4.6.2 Obtención de cepa y actividad antimicrobiana 13
2.4.6.3. Técnica de Kirby-Bauer modificado 14
2.4.6.4. Viabilidad con resazurina al 0.01% 15
2.4.6.5. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) 16
2.4.6,6. Formación de biopelícula 16
2.4.6.7. Tinción de biopelícula 17
2.4.6.8. Determinación de la actividad anti biopelícula 17
2.4.6.9. Extracción de ADN 18
CAPITULO III 24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 24
3.1 Análisis de resultados 24
3.1.1. Control de calidad del microencapsulado 24
3.1.2. Resultados de la prueba de susceptibilidad aplicando la técnica de Kirby Bauer modificada 25
3.1.3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) 27
3.1.4. Formación de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* 35
3.1.5. Identificación génica del gen *mrkA* 43
3.1.6. Selección de concentraciones del aceite esencial microencapsulado para la amplificación del gen *mrkA* 44
3.1.7. Amplificación del gen *mrkA* en *Klebsiella pneumoniae* BAA - 1705 y BAA – 1706 tratada con aceite esencial microencapsulado 45
3.2 Discusión 47

3.3 Verificación de la hipótesis 52
3.3.1 Hipótesis 52
3.3.2 Análisis 52
CAPITULO IV 61
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 61
4.1 Conclusiones 61
4.2. Recomendaciones 62
Referencias Bibliográficas 63
ANEXOS 67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reacción de retro transcripción 21
Tabla 2. Componentes de la master mix para PCR 22
Tabla 3. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales microencapsulados de Eucalyptus globulus y Rosmarinus officinalis frente a *Klebsiella pneumoniae* BAA-1705 y BAA-1706 26
Tabla 4. Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial microencapsulado de eucalipto frente a *Klebsiella pneumoniae* 1705 27
Tabla 5. Concentración Mínima Bactericida del aceite esencial microencapsulado de eucalipto frente a *Klebsiella pneumoniae* 1705 28
Tabla 6. Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial microencapsulado de romero frente a *Klebsiella pneumoniae* 1705 29
Tabla 7. Concentración Mínima Bactericida del aceite esencial microencapsulado de romero frente a *Klebsiella pneumoniae* 1705 30
Tabla 8. Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial microencapsulado de eucalipto frente a *Klebsiella pneumoniae* 1706 31
Tabla 9. Concentración Mínima Bactericida del aceite esencial microencapsulado de eucalipto frente a *Klebsiella pneumoniae* 1706 32

Tabla 10. Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial microencapsulado de romero frente a *Klebsiella pneumoniae* 1706 33

Tabla 11. Concentración Mínima Bactericida del aceite esencial microencapsulado de romero frente a *Klebsiella pneumoniae* 1706 34

Tabla 12. Criterios de clasificación para la formación de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* cepa 1705 35

Tabla 13. Criterios de cepas bacterianas según la capacidad de formación de biopelícula 35

Tabla 14. Criterios de clasificación para la formación de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* cepa 1706 36

Tabla 15. Criterios de cepas bacterianas según la capacidad de formación de biopelícula 36

Tabla 16. Porcentaje de inhibición de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* 1705 frente al aceite esencial microencapsulado de eucalipto 36

Tabla 17. Porcentaje de inhibición de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* 1705 frente al aceite esencial microencapsulado de romero 38

Tabla 18. Porcentaje de inhibición de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* 1706 frente al aceite esencial microencapsulado de eucalipto 40

Tabla 19. Porcentaje de inhibición de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* 1706 frente al aceite esencial microencapsulado de romero 42

Tabla 20. Concentraciones del aceite esencial microencapsulado utilizadas para la amplificación del gen *mrkA* en *Klebsiella pneumoniae* BAA – 1705 y BAA – 1706. 45

Tabla 21. Validación de hipótesis del aceite esencial microencapsulado de eucalipto frente a *Klebsiella pneumoniae* 1705 52

Tabla 22. Validación de hipótesis del aceite esencial microencapsulado de romero frente a *Klebsiella pneumoniae* 1705 53

Tabla 23. Validación de hipótesis del aceite esencial microencapsulado de eucalipto frente a *Klebsiella pneumoniae* 1706 54

Tabla 24. Validación de hipótesis del aceite esencial microencapsulado de romero frente a *Klebsiella pneumoniae* 1706 55

Tabla 25. *Klebsiella pneumoniae* 1705 — Eucalipto (ANOVA y Bonferroni) 56

Tabla 26. *Klebsiella pneumoniae* 1705 — Romero (ANOVA y Bonferroni) 57

Tabla 27. *Klebsiella pneumoniae* 1706 — Eucalipto (ANOVA y Bonferroni) 58

Tabla 28. *Klebsiella pneumoniae* 1706 — Romero (ANOVA y Bonferroni) 59

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Figura 1. Microencapsulación. 13

Figura 2. Obtención de cepa y actividad antimicrobiana. 13

Figura 3. Técnica de Kirby Bauer modificado 14

Figura 4. Espectro de bandas de infrarrojo de eucalipto (*Eucalyptus globulus*). A. Aceite esencial puro de *Eucalyptus globulus*; B. Aceite esencial microencapsulado de *Eucalyptus globulus*; C. Superpuestos de la mezcla polimérica, aceite esencial puro y microencapsulado. 24

Figura 5. Actividad antibacteriana por difusión en agar de los aceites esenciales microencapsulados frente a *Klebsiella pneumoniae* BAA-1705 y BAA-1706. 26

Figura 6. Análisis de viabilidad e inhibición de *Klebsiella pneumoniae* 1705 frente al aceite esencial microencapsulado de eucalipto según la concentración evaluada. 28

Figura 7. Análisis de viabilidad e inhibición de *Klebsiella pneumoniae* 1705 frente al aceite esencial microencapsulado de romero según la concentración evaluada 30

Figura 8. Análisis de viabilidad e inhibición de *Klebsiella pneumoniae* 1706 frente al aceite esencial microencapsulado de eucalipto según la concentración evaluada 32

Figura 9. Análisis de viabilidad e inhibición de *Klebsiella pneumoniae* 1706 frente al aceite esencial microencapsulado de romero según la concentración evaluada. 34

Figura 10. Inhibición de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* 1705 frente al aceite esencial microencapsulado de eucalipto 37

Figura 11. Inhibición de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* 1705 frente al aceite esencial microencapsulado de romero 39

Figura 12. Inhibición de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* 1706 frente al aceite esencial microencapsulado de eucalipto 41

Figura 13. Inhibición de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* 1706 frente al aceite esencial microencapsulado de romero 42

Figura 14. Identificación del gen mrkA en *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1705 y ATCC 1706. 44

Figura 15. Amplificación del gen *K. pneumoniae* y el gen *mrkA* en *Klebsiella pneumoniae* BAA - 1705 tratada con aceite esencial microencapsulado. 45

Figura 16. Amplificación del gen *K. pneumoniae* y el gen *mrkA* en *Klebsiella pneumoniae* BAA - 1706 tratada con aceite esencial microencapsulado. 46

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Procedimiento de viabilidad con resazurina al 0.01 % 67

Anexo 2. Diseño experimental para la evaluación de la actividad anti – biopelícula de aceites esenciales 67

Anexo 3. Difusión en pocillo de AE *Eucalyptus globulus* de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705 68

Anexo 4. Difusión en pocillo de AE *Rosmarinus officinalis* de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705 68

Anexo 5. Difusión en pocillo de AE *Eucalyptus globulus* de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1706 69

Anexo 6. Difusión en pocillo de AE *Rosmarinus officinalis* de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1706 69

Anexo 7. Viabilidad con resazurina al 0,01% de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705 70

Anexo 8. Viabilidad con resazurina al 0,01% de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1706 70

Anexo 9. Concentración Mínima Bactericida de AE *Eucalyptus globulus* de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705 71

Anexo 10. Concentración Mínima Bactericida de AE *Rosmarinus officinalis* de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705 72

Anexo 11. Concentración Mínima Bactericida de AE *Eucalyptus globulus* de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1706 74

Anexo 12. Concentración Mínima Bactericida de AE *Rosmarinus officinalis* de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1706 75

Anexo 13. Resolución 77

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

"EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA Y ANTI BIOFILM DE ACEITES ESENCIALES EN *KLEBSIELLA SP*."

Autora: Morales Maliza, Karen Natasha
Tutora: PhD. Proaño Pérez, María Elizabeth
Fecha: Junio, 2026

RESUMEN

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) constituye una de las principales amenazas para la salud pública, especialmente en bacterias como *K. pneumoniae*, debido a su elevada capacidad para desarrollar mecanismos de resistencia y formar biopelículas, lo que dificulta el tratamiento de infecciones asociadas.

Ante en esta problemática, la presente investigación como objetivo general, evaluó la actividad antimicrobiana y antibiofilm de los aceites esenciales de *E. globulus* (eucalipto) y *R. officinalis* (romero) frente a cepas de *K. pneumoniae* BAA – 1705 y BAA – 1706. La investigación tuvo un enfoque cuantitativo y experimental, se emplearon técnicas microbiológicas y moleculares, Kirby – Bauer modificado, ensayo de resazurina para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM), la Concentración Mínima Bactericida (CMB), tinción con cristal violeta para cuantificación de biopelícula y Reacción en la Cadena Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT -PCR) para la expresión del gen *mrkA*.

Al aplicar la metodología ya mencionada se obtuvo que, el aceite de eucalipto presento una CIM de 25 mg/mL y CMB de 50 mg/mL frente a las cepas BAA – 1705 y BAA – 1706, mientras romero presentó una CIM de 12,5 mg/mL y CMB 25 mg/mL en BAA – 1705, y una CIM de 25 mg/mL y CMB de 50 mg/mL en BAA – 1706. Por otro lado, en actividad antibiofilm, el romero presento mayor eficacia, alcanzando inhibiciones de 78,13 % en BAA – 1705 y ausencia de amplificación del gen *mrkA* a 50 mg/mL en ambas cepas.

En conclusión, el aceite esencial de *R. officinalis* presenta actividad antimicrobiana y antibiofilm frente a *K. pneumoniae.*

PALABRAS CLAVES: ACEITE ESENCIAL, *EUCALYPTUS GLOBULUS, ROSMARINUS OFFICINALIS, KLEBSIELLA PNEUMONIAE,* BIOPELÍCULA, ANTIBACTERIANO.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

"EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA Y ANTI BIOFILM DE ACEITES ESENCIALES EN *KLEBSIELLA SP*."

Autora: Morales Maliza, Karen Natasha
Tutora: PhD. Proaño Pérez, María Elizabeth
Fecha: Junio, 2026

SUMMARY

Antimicrobial resistance (AMR) is one of the main threats to public health, especially in bacteria such as *K. pneumoniae*, due to its high capacity to develop resistance mechanisms and form biofilms, which hinders the treatment of associated infections.

Given this problem, the present research, as its general objective, evaluated the antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oils of *E. globulus* (eucalyptus) and *R. officinalis* (rosemary) against *K. pneumoniae* strains BAA-1705 and BAA-1706. The research had a quantitative and experimental approach, employing microbiological and molecular techniques, including modified Kirby-Bauer, resazurin assay to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC), crystal violet staining for biofilm quantification, and Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for *mrkA* gene expression.

Applying the aforementioned methodology, it was found that eucalyptus oil exhibited an MIC of 25 mg/mL and MBC of 50 mg/mL against strains BAA-1705 and BAA-1706, while rosemary showed an MIC of 12.5 mg/mL and MBC of 25 mg/mL against BAA-1705, and an MIC of 25 mg/mL and MBC of 50 mg/mL against BAA-1706. Furthermore, in terms of antibiofilm activity, rosemary demonstrated greater efficacy, achieving 78.13% inhibition in BAA-1705 and no amplification of the *mrkA* gene at 50 mg/mL in both strains.

In conclusion, *R. officinalis* essential oil exhibits antimicrobial and antibiofilm activity against *K. pneumoniae*.

KEYWORDS: ESSENTIAL OIL, *EUCALYPTUS GLOBULUS*, *ROSMARINUS OFFICINALIS*, *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, BIOFILM, ANTIBACTERIAL.

INTRODUCCIÓN

Klebsiella pneumoniae es un patógeno oportunista de gran importancia clínica debido a su capacidad para desarrollar resistencia a múltiples antimicrobianos y formar biopelículas. En el presente estudio se evaluó la actividad antimicrobiana y antibiofilm de los aceites esenciales microencapsulados de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) y *Rosmarinus officinalis* (romero) frente a las cepas *Klebsiella pneumoniae* BAA-1705 y BAA-1706. El propósito fue determinar su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano mediante la técnica de Kirby-Bauer modificada, establecer la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) mediante el ensayo de resazurina, evaluar la inhibición de la biopelícula mediante tinción con cristal violeta y analizar la expresión del gen *mrkA* mediante RT-PCR.

La resistencia antimicrobiana constituye una de las principales amenazas para la salud pública mundial. En este contexto, *K. pneumoniae* ha sido catalogada como un patógeno prioritario debido a su elevada prevalencia en infecciones hospitalarias y a la creciente aparición de cepas resistentes a carbapenémicos. Además, posee la capacidad de formar biopelículas, estructuras complejas que favorecen la persistencia bacteriana y aumentan su resistencia frente a antimicrobianos y mecanismos de defensa del huésped.

Los aceites esenciales constituyen una alternativa prometedora frente a la resistencia bacteriana debido a la presencia de metabolitos secundarios como terpenos, fenoles y compuestos aromáticos con actividad biológica. Los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Rosmarinus officinalis* contienen principalmente 1,8-cineol, α-pineno, alcanfor y otros monoterpenos que han demostrado propiedades antimicrobianas y antibiofilm frente a diversos microorganismos patógenos. Estudios previos han evidenciado que estos compuestos pueden alterar la integridad de la membrana celular bacteriana, inhibir el crecimiento microbiano y disminuir la formación de biopelículas.

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales microencapsulados se empleó la técnica de Kirby-Bauer modificada mediante difusión en pocillos, metodología ampliamente utilizada para determinar la susceptibilidad bacteriana frente a compuestos naturales. Asimismo, la determinación de la CMI y CMB se

realizó mediante el ensayo de resazurina, basado en la actividad metabólica de las bacterias viables, permitiendo establecer las concentraciones capaces de inhibir o eliminar el crecimiento bacteriano.

La formación de biopelículas se evaluó mediante el método colorimétrico de cristal violeta, técnica que permite cuantificar la biomasa adherida y determinar el porcentaje de inhibición generado por los tratamientos. Finalmente, la identificación y análisis del gen *mrkA* se realizó mediante RT-PCR, con el fin de evaluar el posible efecto de los aceites esenciales sobre uno de los principales factores genéticos asociados a la formación de biopelículas en *K. pneumoniae*.

Debido al incremento de cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* y a la limitada disponibilidad de alternativas terapéuticas eficaces, resulta necesario investigar compuestos naturales con potencial antimicrobiano y antibiofilm. Por ello, el presente estudio aporta evidencia sobre el efecto de los aceites esenciales de eucalipto y romero como posibles alternativas complementarias para el control de este importante patógeno de interés clínico.

Justificación

La Resistencia Antimicrobiana (RAM) se ha consolidado como una de las mayores amenazas a la salud pública mundial. Según reportes recientes de vigilancia epidemiológica, entre 2018 y 2023 se registró un incremento del 40% en las combinaciones de patógenos y antibióticos resistentes monitoreados, con aumentos anuales que oscilan entre el 5% y el 15%. Esta problemática resulta especialmente alarmante en bacterias Gram negativas como *Klebsiella pneumoniae*, cuya multirresistencia limita considerablemente las opciones terapéuticas disponibles (1).

En este contexto, la Organización Mundial de la Salud (OMS), en su Lista de Patógenos Bacterianos Prioritarios 2024, clasificó a *K. pneumoniae* dentro del nivel de prioridad critica. Su relevancia no solo radica en su perfil de resistencia, sino también en su capacidad para expresar genes de virulencia como *mrkA*, asociado a la formación de biopelículas que favorecen su persistencia tanto en el huésped como en el ambiente hospitalario (2).

A nivel regional, Latinoamérica enfrenta una situación epidemiológica preocupante, investigaciones recientes reportan que la prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos en Sudamérica supera el 37 %, con tasas de mortalidad de hasta el 34 % en pacientes críticos (3). En Ecuador, la resistencia a antibióticos de última línea ha alcanzado aproximadamente el 40 %, agravada por la aparición de cepas hipervirulentas reportadas por la Organización Panamericana de la Salud (4)(5).

Frente a esta problemática, surge la necesidad de investigar nuevas alternativas terapéuticas basadas en compuestos naturales, como los aceites (6). A diferencia de algunos fármacos sintéticos, los metabolitos secundarios presentes en estos compuestos, entre ellos terpenos y fenoles, poseen múltiples mecanismos de acción que disminuyen la probabilidad de generar resistencia bacteriana (7).

El estudio se desarrolló utilizando aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Rosmarinus officinalis*, seleccionados debido a su contenido de 1,8 – cineol y otros monoterpenos con potencial actividad antimicrobiana. Asimismo, se emplearon las cepas de referencia *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705 y 1706. La factibilidad del estudio estuvo respaldada por el uso de metodologías estandarizadas y reproducibles, como la técnica de Kirby - Bauer modificada, el ensayo de resazurina que evaluó la

viabilidad metabólica, la tinción de cristal violeta para la cuantificación de biopelículas y técnicas moleculares para la expresión del gen *mrkA*. (8–11). Por lo expuesto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana y antibiofilm de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Rosmarinus officinalis* frente a *Klebsiella pneumoniae.*

CAPITULO I

1.1 Antecedentes de investigación

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) constituye una de las principales amenazas para la salud pública y el desarrollo mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) la ha clasificado entre las diez principales amenazas sanitarias más importantes a las que se enfrenta la humanidad, debido al incremento sostenido de microorganismos resistentes que comprometen la eficacia de los tratamientos convencionales (12). En este contexto, *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos representa un desafío clínico relevante, especialmente en las unidades de cuidados intensivos (UCI), donde su prevalencia en Latinoamérica se estima en aproximadamente 37,48%, evidenciando una elevada heterogeneidad entre los patógenos analizados en la región (3).

Las infecciones causadas por *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas presentan una elevada letalidad, reportándose tasas de mortalidad de hasta el 64 % en casos de bacteriemia. Esta problemática no se limita a países desarrollados, ya que Latinoamérica registra una mayor prevalencia de esta bacteria en infecciones asociadas a las UCI, situación agravada por las limitadas alternativas terapéuticas disponibles frente a cepas multirresistentes (3).

El estudio realizado por Elaissi et al. (2012), se propusieron analizar la composición química y las propiedades biológicas de los aceites esenciales de ocho especies de *Eucalyptus* recolectadas en Tunez. El diseño metodológico consistió en la extracción de aceites mediante hidrodestilación y su posterior análisis por cromatografía de gases, evaluando la actividad antibacteriana a través de los métodos de difusión en disco y microdilución en caldo se incluyeron 13 cepas de *Klebsiella pneumoniae*. Los resultados más relevantes indicaron que *K. pneumoniae* fue uno de los patógenos más resistentes a la mayoría de los aceites probados, registrando diámetros de inhibición limitados que oscilaron entre 6,6 ± 1.1 mm (con *E. leucoxylon*) y 10.8 ± 1.2 mm (con *E. odorata*). Los investigadores concluyeron que la eficacia antimicrobiana no reside exclusivamente en el componente mayoritario 1,8 – cineol, sino en la sinergia con compuestos minoritarios, por ende, el tema de la presente investigación busca introducir el romero para un análisis de biopelículas y de crecimiento bacteriano para llenar o superar las limitaciones reportadas de la fuente ya mencionada. (13)

Un estudio realizado por Gama et al. (2024), se propusieron investigar si la producción de vinagre de madera mediante la copirólisis de eucalipto con hierbas aromáticas lograban incorporar compuestos bioactivos y potenciar su capacidad antimicrobiana. El diseño metodológico consistió en la pirolisis de madera de eucalipto sola y en combinación con diversas hierbas, incluyendo el romero (*Rosmarinus officinalis*), analizando los productos resultantes mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC/MS) y realizando ensayos de microdilución en placa para determinar Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) frente a diversos patógenos incluyendo a *Klebsiella pneumoniae*. Los resultados más relevantes evidenciaron que las hierbas aromáticas fueron más eficaces que el vinagre de eucalipto solo, no obstante, frente a *K. pneumoniae*, tanto el eucalipto solo como sus combinaciones presentaron una CIM constante de 3,125 %. Los investigadores concluyeron que la eficacia biológica de estos extractos no se debió a un solo componente aislado, sino a la sinergia del conjunto de compuestos fenólicos. (10)

Iseppi et al. (2020) desarrollaron una investigación con el objetivo de analizar la capacidad antibacteriana de cuatro aceites esenciales, entre ellos el de *Eucalyptus globulus*, para prevenir el desarrollo y propagación de bacterias Gram – negativas productoras de BLEE y carbapenemasas. El método consistió en un estudio experimental con 18 aislados de *Klebsiella pneumoniae*, donde se emplearon técnicas de difusión en disco y microdilución para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), además de PCR para la identificación de genes de resistencia. Los resultados clave indicaron que el aceite de *E. globulus* mostro una actividad muy baja contra todas las cepas evaluadas, con zonas de inhibición de apenas 0 a 10 mm. Los autores concluyeron que, dada su escasa potencia antimicrobiana frente a las células planctónicas de los patógenos multirresistentes, este aceite no fue considerado para las pruebas posteriores de actividad antibiofilm. (14)

En la investigación de Moo et al. (2021) examinaron el potencial del monoterpeno 1,8 – cineol, también conocido como eucaliptol, para combatir la resistencia de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas. Utilizando técnicas como el ensayo de micro dilución con resazurina y análisis de tiempo – muerte, los autores determinaron que el compuesto posee un efecto bactericida a una concentración de 28,83 mg/mL logrando una eliminación completa del patógeno en un periodo de dos horas. Este

estudio se vincula con la presente investigación sobre la evaluación de aceites esenciales en *Klebsiella sp*., ya que proporciona una base científica detallada sobre el modo de acción de uno de sus componentes mayoritarios, validando su potencial como agente alternativo frete a patógenos multirresistentes. (15)

En el estudio realizado por Ștefănescu et al. (2025) se analizó la eficacia del aceite esencial de romero contra el patógeno oportunista *Klebsiella pneumoniae*, destacando un perfil químico caracterizado por la dominancia de 1,8 – cineol (eucaliptol), α-pineno y alcanfor, componentes que representan entre el 70 % y el 90 % de su composición total. Mediante el método de micro dilución en caldo, se determinó que el aceite de romero posee una CMI y una CMB del 3,125 % específicamente contra *K. pneumoniae*. Además, en las pruebas de actividad antibiofilm, el romero demostró una inhibición moderada (entre el 40 % y el 74 %) de la biopelícula de esta bacteria cuando se utilizó a una concentración del 50 %, aunque dicha capacidad inhibitoria fue reducida en concentraciones menores. Los autores concluyeron que los aceites esenciales ricos en monoterpenos oxigenados y compuestos fenólicos poseen un potencial significativo como agentes bioactivos para prevenir infecciones asociadas a biopelículas. (16)

Pozharani et al. (2026) desarrollaron una investigación con el objetivo de optimizar nanoemulsiones de tres especies de eucalipto y potenciar su actividad contra patógenos clínico. El método consistió en un diseño experimental se evaluó la actividad antimicrobiana (CIM) y antibiofilm (técnica de cristal violeta) frente a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. Los resultados clave indicaron que las formulaciones de *E. citridora* y *E. radiata* redujeron significativamente la CIM frente a *K. pneumoniae*; específicamente, el aceite de *E. citridora* mejoró su eficacia de 37.5 mg/mL a 4.68 mg/mL, mientras que el de *E. radiata* paso de 18.75 mg/mL a 9.37 mg/mL. Sin embargo, no se registró una inhibición significativa de la formación de biopelícula en *K. pneumoniae*. Este estudio se vincula con la presente investigación sobre *Klebsiella sp.* al proporcionar evidencia sobre el perfil fitoquímico del *E. globulus* y demostrar que, a pesar de las mejoras en la actividad bactericida mediante nanotecnología, la biopelícula de este patógeno muestra una resistencia superior frente a estos aceites esenciales. (11)

Kabotso et al. (2024) investigaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*), tanto de forma individual como en combinación con antibióticos convencionales, y evaluar su capacidad para inhibir la formación de biopelículas. El método consistió en un diseño experimental donde se utilizó técnicas de microdilución en caldo para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Mínima Bactericida (CBM) frente a una muestra de diversos patógenos, incluyendo la cepa *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13440. Además, se emplearon ensayos colorimétricos con TTC en microplacas de 96 pocillos para cuantificar la inhibición de pre – biofilm y de biopelículas ya formadas. Los resultados clave demostraron que el componente mayoritario del aceite fue el eucaliptol (42.68%) y que, específicamente para *K. pneumoniae*, se obtuvo una CIM y CBM de 6,25 mg/mL confirmando un efecto bactericida. (17)

El estudio de Abozahra et al. (2020) tuvo el objetivo de investigar el efecto antimicrobiano y antibiofilm de formulaciones nanotecnológicas de aceites esenciales de romero y jengibre contra aislados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a la colistina. El método consistió en un diseño experimental con una muestra de 30 aislados bacterianos, empleando técnicas de microdilución en caldo para determinar Concentración Mínima Inhibitoria (CIM), el método de placa de microtitulación con cristal violeta para evaluar la formación de biopelícula y la técnica de RT – qPCR para cuantificar la expresión del gen *mrkD.* Los resultados clave mostraron que el aceite de romero puro tuvo una CIM de 1250 ug/mL. En cuanto a la actividad antibiofilm las nanopartículas de romero lograron una inhibición de entre el 95% y 98% en concentraciones sub – inhibitorias y consiguieron una inhibición del 100 % en la expresión del gen *mrkD* al utilizar la mitad de la CIM. (8)

La investigación de Ameur et al. (2024) tuvo como objetivo de evaluar la eficacia antimicrobiana de diversas combinaciones de aceites esenciales de *Eucalyptus* frente a cepas bacterianas responsables de infecciones del oído y analizar la relación entre su composición química y su actividad biológica. El método consistió en un diseño experimental donde se extrajeron aceites de ocho especies de *Eucalyptus* tunecinas, evaluando su actividad contra una muestra de seis cepas bacterianas, incluyendo un aislado clínico de *Klebsiella pneumoniae*, a través de las técnicas de difusión en disco y microdilución en caldo para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

y la Concentración Mínima Bactericida (CBM). Los resultados clave destacaron que el 1,8 – cineol fue el componente mayoritario y que ciertas mezclas binarias mostraron un sinergismo total contra *K. pneumoniae*; específicamente, la combinación de *E. punctata* y *E. wandoo* alcanzo una CIM de 0.4 mg/ml. Los autores concluyeron que las combinaciones específicas de aceites de *Eucalyptus* potencian la acción antibacteriana y representan una alternativa terapéutica viable frente a patógenos resistentes. (18)

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General:

Evaluar la actividad antimicrobiana y antibiofilm del *Eucalyptus globulus* (eucalipto) y *Rosmarinus officinalis* (romero) frente a cepas de *Klebsiella sp.*

1.3.2 Objetivos Específicos:

- Analizar el efecto de los aceites esenciales de eucalipto y romero sobre el crecimiento bacteriano.
- Establecer la capacidad de formación e inhibición de biofilm en cepas de *Klebsiella sp.* mediante los métodos colorimétricos.
- Identificar molecularmente el gen mrkA asociado a la formación de biopelícula mediante RT-PCR.

CAPITULO II

METODOLOGIA

2.1 Materiales

2.1.1 Medios de cultivo

- Agar base Sangre HIMEDIA 500 gramos lote 0000728856
- Brain Heart Infusion
- Caldo Luria Bertani Broth Miller TITAN BIOTECH LTD. 500 gramos lote M4A6AY01
- Agar Mueller Hinton HIMEDIA 500 gramos lote E000739157
- Agar MacConkey HIMEDIA 500 gramos lote E000730773

2.1.2 Instrumentos

- Placas monopetri
- Placa bipetri
- Pipetas de 10, 100 y 1000 ul
- Puntas de pipetas de 10, 100 y 1000 ul sin filtro
- Puntas de pipetas de 10, 100 y 1000 ul con filtro
- Tubos de ensayo
- Probetas
- Pipetas multicanal
- Papel Parafilm
- Hisopos
- Microplaca multiscreen de 96 pocillos con fondo en U
- Microplaca multiscreen de 96 pocillos con fondo plano
- Gradillas de hielo
- Equipo de protección personal
- Eppendorf de 2,5 y 1,5 ml

2.1.3. Cepa de referencia

- *Klebsiella pneumoniae* BAA-1705
- *Klebsiella pneumoniae* BAA-1706

2.2. Reactivos

- Sybr Safe
- Gel agarose
- Ladder de 100 pb
- Goma arábiga
- Maldodextrina
- Dimethyl sulfoxide DMSO (0,1%)
- Resazurina al 0.01%
- Cristal violeta 0,5%
- Etanol 95%
- Agua destilada
- Ethanol 100%
- Kit de Zymo Research Quick ARN Fungal/Bacterial Miniprep
- Kit de Promega GoScript Reverse Transcription System
- Kit de Promega GoTaq qPCR Master MIX

2.3. Equipos

- Büchi mini spraydryer B-290
- ATR-FTIR, Nicolet IR 100 (Alemania)
- Lector de placas VICTORTM X3
- Cabina de flujo
- Camara de electroforesis
- Incubadora
- Balanza analítica
- Transiluminador UV
- Autoclave
- Bio-Rad PTC y T100
- Bio-Rad CFX Opus
- Vórtex
- Centrifuga
- Microcentrífuga
- Desinchek

2.4. Métodos

2.4.1 Tipo de investigación

La presente investigación es de tipo experimental, debido a que se evaluó la actividad antimicrobiana y antibiofilm de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Rosmarinus officinalis* sobre cepas de *Klebsiella sp*., mediante la manipulación de variables en condiciones controladas de laboratorio.

2.4.2 Población y muestra

No aplica.

La investigación es experimental, la población y muestra están conformadas de manera obligatoria por las bacterias *Klebsiella pneumoniae* BAA -1705 y *Klebsiella pneumoniae* BAA -170 que se van a evaluar frente a los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Rosmarinus officinalis*. La bacteria de *Klebsiella pneumoniae* BAA -1705 y *Klebsiella pneumoniae* BAA -170 han sido catalogados y aisladas por American Type Culture Collection (ATCC).

2.4.3 Criterios de inclusión y exclusión

No aplica, puesto que se trata de un estudio de carácter experimental, el cual va a emplear de manera obligatoria las cepas ya mencionadas anteriormente, por lo cual no se utiliza individuos como elementos de estudio, aunque puede existir situaciones donde se considerara criterios de exclusión, por ejemplo, el evidenciar que una de las cepas se encuentre contaminada o no sea óptima para el estudio.

2.4.4 Hipótesis de investigación

- **Hipótesis nula:** Los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Rosmarinus officinalis* no inhibe la viabilidad y formación de biopelícula generada por *Klebsiella pneumoniae.*
- **Hipótesis alternativa:** Los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Rosmarinus officinalis* si inhibe la viabilidad y formación de biopelícula generada por *Klebsiella pneumoniae.*

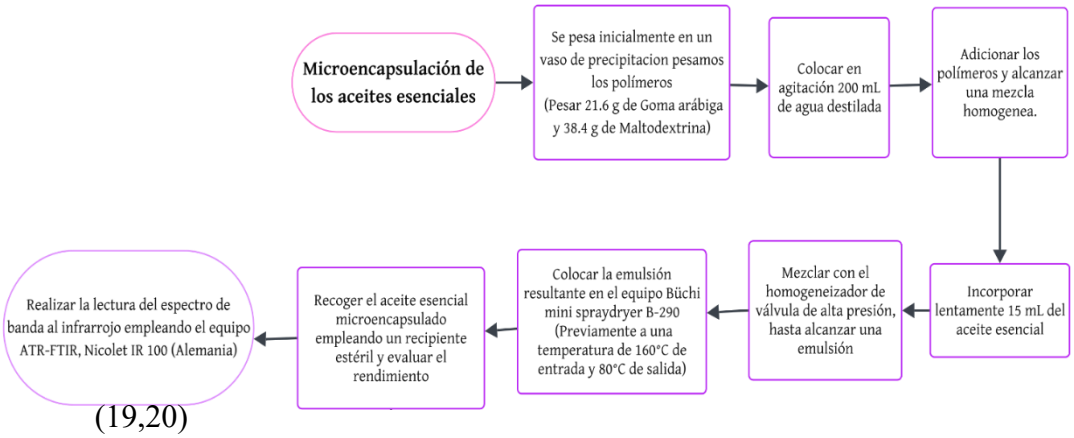
2.4.5 Variable de estudio

- **Variable dependiente:** Actividad antibacteriana, actividad antibiofilm y gen *mrkA*

- **Variable independiente:** Aceites de *Eucalyptus globulus* y *Rosmarinus officinalis*

2.4.6 Procedimiento para el análisis de laboratorio

2.4.6.1 Microencapsulación



(19,20)

Figura 1. Microencapsulación.

Elaborado por Morales Maliza, Karen Natasha

2.4.6.2 Obtención de cepa y actividad antimicrobiana

Inicialmente se recibieron los viales bacterianos, los cuales fueron inoculados en caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubados a 37 ºC durante 24 horas, posteriormente se realizó la siembra en agar MacConkey, evaluando el crecimiento característico de colonias, en caso de ausencia de crecimiento, se efectuó la verificación de la viabilidad bacteriana.

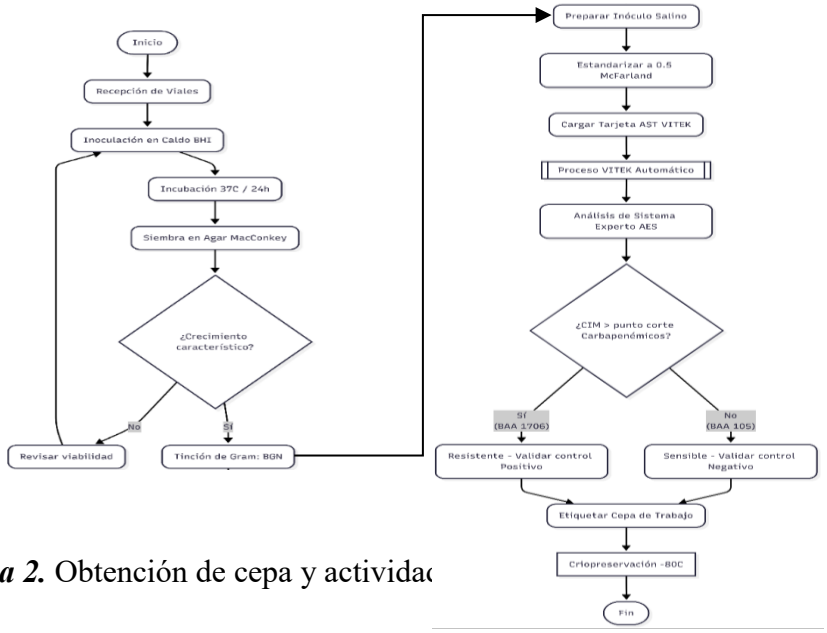


Figura 2. Obtención de cepa y activida

Elaborado por Morales Maliza, Karen Natasha

Las colonias obtenidas se llevaron al sistema automatizado VITEK 2 para la identificación y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana. Por lo cual se preparó un inóculo en solución salina estandarizada a 0,5 en la escala McFarland, el cual fue utilizado para la inoculación de tarjetas AST específicas, este sistema permitió determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) frente a carbapenémicos. (21)

2.4.6.3. Técnica de Kirby-Bauer modificado

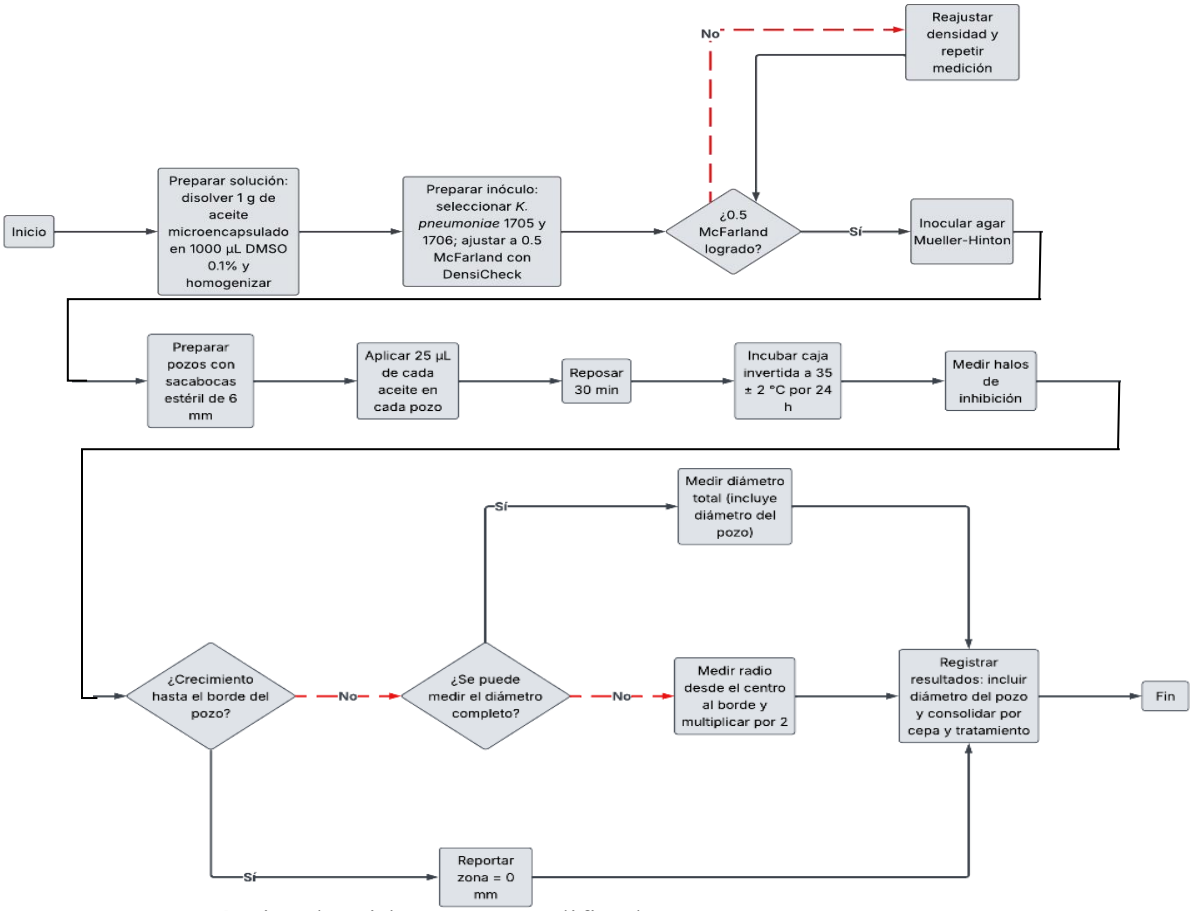


Figura 3. Técnica de Kirby Bauer modificado

Elaborado por Morales Maliza, Karen Natasha

La técnica de Kirby-Bauer modificada se utilizó para determinar la sensibilidad de la bacteria frente a los microencapsulados de *Eucalyptus globulus* y *Rosmarinus officinalis*, difusión en pocillos de agar. Inicialmente se disolvió 1 gramo de aceite microencapsulado en 1000 ul de DMSO 0.1% asegurando una mezcla uniforme mediante homogenización. Posteriormente se procede a la preparación del inóculo

microbiológico empleando las cepas de *Klebsiella pneumoniae* 1705 y 1706, cuya densidad celular se ajusta estrictamente a un estándar de 0.5 McFarland utilizando el equipo DensiCheck para garantizar la estandarización. Por consiguiente, se inocula el agar Mueller Hinton para luego realizar pozos sobre la superficie del agar con el apoyo de un sacabocas estéril de 6 mm de diámetro y en cada uno de ellos se deposita 25 ul de los aceites a evaluar, se deja reposar por 30 minutos y finalmente se incuba con la caja invertida a 35 ± 2ºC por 24 h y posteriormente se miden los halos de inhibición. (22) Se midió el diámetro total del halo, incluyendo el pozo, si el organismo crece hasta el borde del pozo, se debe reportar como una zona de 6 mm. Si la ubicación del pozo o el tamaño del halo no permiten medir el diámetro completo se mide desde el centro del pozo hasta el borde de la zona (el radio) y multiplicar por 2 para obtener el diámetro. (23)

2.4.6.4. Viabilidad con resazurina al 0.01%

Con el fin de determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) de los compuestos evaluados se optó por el ensayo de resazurina en microplaca de fondo U. Este método se fundamenta en la actividad metabólica bacteriana: la resazurina (un tinte azul no fluorescente) actúa como un indicador de óxido – reducción que al ser captado por células viables es reducido a resorufina (un compuesto rosa y fluorescente) permitiendo una discriminación visual clara entre la inhibición y el crecimiento bacteriano. (24)

El proceso comenzó con la reactivación de la cepa de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705 y 1706 en el agar MacConkey. Posteriormente se preparó una suspensión bacteriana en solución salina estéril (NaCl 0.9%), ajustando su turbidez mediante la escala McFarland al 0.5, este ajuste garantiza una densidad estandarizada de aproximadamente 1 x 10^5 CFU/mL, esencial para asegurar que los resultados de la CIM sean comparables y reproducibles. Adicionalmente cabe recalcar que se realizaron modificaciones al protocolo en base a las necesidades de la bacteria (*Klebsiella pneumoniae* BAA 1705 y 1706), con esa escala se realiza una disolución de 2:1 es decir 2000 del inóculo de la bacteria de la escala McFarland y 1000 de solución salina al 0.9 %, esta será usada en la microplaca de fondo U. (24)

Simultáneamente se prepara la solución madre, es decir el aceite esencial que se disuelve en DMSO al 0.1 %, luego se realizaron diluciones seriadas iniciando con

una concentración de 0.50 mg/mL en el primer tubo se transfirió este al segundo tubo para tener una concentración de 25 mg/mL y así sucesivamente hasta obtener una concentración final de 0,39 mg/mL. Luego se prepara la microplaca de 96 pocillos de fondo redondo en todos los pocillos se pipetea 50 ul de caldo Luria Bertani (LB), y se va a realizar una división de la placa tal como lo indica el ANEXO 1. Luego se sella con parafilm y se incuba a una temperatura de 37ºC durante 24 horas. (25–27)

Tras la incubación de media hora en agitación se añadió 20 ul de resazurina a cada pocillo para evidenciar el crecimiento bacteriano, se observará el cambio de color, si es azul indica ausencia de crecimiento bacteriano es decir inhibe y si es rosa indica crecimiento bacteriano, ya que la resazurina se transforma en rosa por la actividad metabólica. La CIM se define como la concentración más baja del aceite esencial que logra mantener el color de la resazurina. (24)

Finalmente, la placa se leyó en absorbancia de 570 nm y a 595 nm en el lector de placas VICTOR ^{TM} X3 y se realizó el siguiente cálculo:

$$Viabilidad\ celular = \frac{Absorbancia\ real - Control\ negativo}{Control\ positivo - Control\ negativo} * 100$$

2.4.6.5. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)

Para profundizar en la viabilidad y distinguir si el aceite simplemente inhibió el crecimiento o realmente mata las células, se realiza la concentración mínima bactericida (CMB), por lo cual se sembró un volumen de 100 ul de cada pocillo o muestra del ensayo previo de CIM, esta placa se incuba a 37 ºC por 24 horas para bacterias. Si después de esto no hay crecimiento en el sólido (Agar Mueller Hinton) se considera que el aceite eliminó el 99.9 % de la población original es decir efecto bactericida. (26,27)

2.4.6,6. Formación de biopelícula

El biofilm se define como un nicho donde una o más especies de microorganismos están encerrados en una matriz extracelular compuesta por polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y agua. Este proceso es un factor de virulencia a nivel poblacional regulada por la detección de quorum, un sistema de comunicación química que depende de la densidad celular. El método estándar descrito se modificó para *Klebsiella pneumoniae*, este inicia con la preparación del inóculo se debe

seleccionar una colonia bacteriana del agar selectivo en este caso Agar MacConkey, se prepara un aislamiento en un tubo de ensayo de 12 mm con solución salina estéril al 0,9 % , ajustando a la turbidez a 0,5 McFarland con ayuda del DensiCheck, luego se realiza una dilución 1:20 del inóculo inicial es decir se mezcló 100 ul de la escala 0,5 McFarland con 1900 ul de solución salina estéril al 0,9%. (11)

2.4.6.7. Tinción de biopelícula

Luego de la formación de la biopelícula de la bacteria, se procedió a quitar el exceso de caldo (decantar) pero se lo hizo absorbiendo uno por uno el caldo de cada uno de los pocillos, se procedió a lavar un total de 2 veces con agua destilada con un volumen total de 150 ul, se dejó secar a temperatura ambiente hasta no observar gotas visibles. (11)

A continuación, se adicionó 150 ul de etanol al 95% para fijar el biofilm, este se dejó por 30 minutos, luego se decantó el contenido y se agregó 200 ul de cristal violeta al 1 % y se incubó por 30 minutos, luego se desechó el contenido y se realizó 3 lavados con agua destilada con un volumen de 150 ul, se dejó secar y se adicionó el etanol al 95 % para cuantificar la biopelícula en el Víctor ^{TM} X3 mediante lectura de densidad óptica a 570 nm.

2.4.6.8. Determinación de la actividad anti biopelícula

Inicialmente, se cuantificó la biomasa de biopelícula y, con base en los valores de densidad óptica obtenidos, las cepas de *Klebsiella pneumoniae* fueron clasificadas como formadoras débiles, moderadas o fuertes. Posteriormente, se llevó a cabo el ensayo de densidad óptica con el propósito de evaluar la capacidad de disrupción de la biopelícula, siguiendo el protocolo descrito anteriormente. (11)

Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición de la biopelícula, calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\%Inhibición = \frac{100 - (\ Muestra\ OD570)}{Control\ OD\ 570 * 100}$$

Para la preparación de las soluciones, se pesó 1 g de aceite esencial microencapsulado, el cual fue disuelto en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,1%, obteniéndose una solución madre con una concentración de 100 mg/mL.

Posteriormente, se preparó caldo Brain Heart Infusion (BHI) al doble de su concentración. El inóculo bacteriano de *Klebsiella pneumoniae* fue ajustado a una turbidez equivalente a 0,5 en la escala de McFarland y posteriormente diluido en una proporción de 1:20 utilizando solución salina estéril.

Para el ensayo, en placas de micro titulación estériles se dispensó inicialmente el medio BHI, seguido de las diferentes concentraciones del tratamiento previamente preparadas, y finalmente se añadió el inóculo bacteriano diluido todo esto como se lo explica en el ANEXO 2. Las placas fueron selladas con Parafilm para evitar evaporación y se incubaron a 37 °C durante 24 horas en condiciones aerobias. Transcurrido el período de incubación, se realizó la tinción correspondiente para la cuantificación de la biopelícula, permitiendo así la evaluación de su formación en *Klebsiella pneumoniae*.

2.4.6.9. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de la cepa pura de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705 y 1706 se utilizó el protocolo de Quick – DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit de Zymo Research (número de catálogo D6005, número de lote 224196) y el cual se mantuvo almacenado a temperatura ambiente, inicialmente se pipetearon 200 ul de TBE al 1X en un tubo eppendorf, se tomó una colonia pura con un isopo y se homogenizó. La mezcla se centrifugó por 10 minutos a 6000 g, tras lo cual se descartó el sobrenadante conservando únicamente el pellet bacteriano. Posteriormente, se añadieron 750 ul de BashingBead™ Buffer en el tubo eppendorf se resuspendió esto y luego se transfiere a un ZE BashingBead™ Lysis Tube. (28)

Luego se mezcló de manera horizontal en un vórtex por 20 minutos y se centrifugó por 1 minuto a 10 000 x g, de esta mezcla se transfirió 400 ul del sobrenadante a una Zymo – Spin™ III- F Filter que está en un tubo colector y se centrifugó a 8000 x g por un minuto. Se adicionó 1 200 ul de Genomic Lysis Buffer al filtrado del tubo de recolección. Se transfirió 800 ul de la mezcla a una columna Zymo-Spin™ IICR en un tubo de recolección y se centrifugó a 10 000 x g durante un minuto, se desechó el filtrado y se repitió el proceso. (28)

Luego se añadió 200 ul de DNA Pre-Wash Buffer a la columna Zymo – Spin™ IICR en un nuevo tubo de recolección y se centrifugó a 10 000 x g durante 1

minuto. Se añadió 500 ul g – DNA Wash Buffer a la columna Zymo – Spin™ IICR y se centrifugó a 10 000 x g durante 1 minuto. Finalmente se transfirió la columna Zymo – Spin™ IICR a un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml y se añadió 50 ul de DNA elution Buffer directamente a la matriz de la columna, se centrifugó a 10 000 x g durante 30 segundos para eluir el ADN. (28)

2.4.6.9.1 Extracción y Purificación del ARN

Se debe seguir previamente el protocolo descrito en la sección 2.4.6.8. Determinación de la actividad anti-biopelícula, y considerando el ANEXO 2, cabe recalcar que no se debió continuar con el paso de la tinción de biopelícula. Se seleccionó las siguientes concentraciones para la extracción de ARN:

1. BAA 1705 Sin tratamiento
2. BAA 1705 con tratamiento de *Eucalyptus globulus* a 50 mg/mL
3. BAA 1705 con tratamiento de *Eucalyptus globulus* a 0,39 mg/mL
4. BAA 1705 con tratamiento de *Rosmarinus officinalis* a 50 mg/mL
5. BAA 1705 con tratamiento de *Rosmarinus officinalis* a 0,39 mg/mL
6. BAA 1706 Sin tratamiento
7. BAA 1706 con tratamiento de *Eucalyptus globulus* a 50 mg/mL
8. BAA 1706 con tratamiento de *Eucalyptus globulus* a 0,39 mg/mL
9. BAA 1706 con tratamiento de *Rosmarinus officinalis* a 50 mg/mL
10. BAA 1706 con tratamiento de *Rosmarinus officinalis* a 0,39 mg/mL

Luego de seleccionar las 10 muestras, a estas se les agregó 200 ul de TBE 1X, se raspó con un palillo estéril el fondo de cada uno de los pocillos donde se encontraban las respectivas concentraciones a usarse, se transfirió cada una a un tubo eppendorf y luego se centrifugó a 16 000 x g durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante dejando únicamente el pellet, luego se procedió a extraer el ARN utilizando el Quick – RNA™ Miniprep kit de Zymo Research del catálogo número R2014, del lote número 256463, se almacenó a temperatura ambiente y con fecha de caducidad de marzo 2027, se siguió el protocolo detallado en el kit siendo el siguiente: (29)

Se resuspendió el pellet celular en 800 ul de RNA Lysis Buffer y se transfirió la mezcla a un tubo ZR BashingBead Lysis, Se homogeneizó en un vórtex con movimientos horizontales durante 10 minutos. Se centrifugó el tubo durante un

minuto para sedimentar residuos, se transfirió el sobrenadante a una columna Zymo – Spin™ IIICG en un tubo de recolección y se centrifugó. (29)

Se guardó el filtrado que está en el tubo colector, pues a este se le agregó un volumen igual de etanol (95 – 100 %) (1:1) y se mezcló bien. Se transfirió la mezcla a una columna Zymo – Spin™ IICR en un tubo de recolección y se centrifugó y se desechó el filtrado. Se agregó 400 ul de RNA Prep Buffer a la columna, se centrifugó y se desechó el filtrado, se añadió 700 ul de RNA Wash Buffer a la columna se centrifugó y se desechó el filtrado. (29)

Se añadió 400 ul de RNA Wash Buffer y se centrifugó la columna por un minuto para asegurar la eliminación completa del tampón de lavado. Se transfirió con cuidado la columna a un tubo libre de nucleasas, finalmente se añadió 50 ul de agua libre de DNasa/RNasa directamente a la matriz de la columna y se centrifugó, se colocó el ARN eluído en una gradilla congelada. Para la cuantificación y determinación de la pureza del ARN extraído, se colocaron 2 ul de eluído en el NanoDrop de Thermo Scientific y se realizó la lectura, obteniendo la curva correspondiente a las absorbancias a 260 nm y 280 nm.(29)

2.4.6.9.2 Retrotranscriptasa

Con el ARN extraído y cuantificado se procedió a sintetizar ADNc utilizando el kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega) con número de lote 0000653182 y fecha de caducidad 25 de marzo 2027, se procedió con el protocolo sugerido en el kit. En primer lugar, se mezcló y se centrifugó cada uno de los componentes antes de ser usados, se combinó 4 ul de ARN experimental con 1 ul de cebador random para obtener un volumen final de 5 ul. Posteriormente, se cerró el tubo que contenía la mezcla de ARN y cebador y se lo llevó al termociclador por 5 minutos, de inmediato, la mezcla se enfrió en una gradilla con hielo durante 5 minutos y luego se centrifugó por 10 segundos para recoger la condensación, manteniendo los tubos cerrados sobre el hielo hasta agregar la mezcla de retro transcripción. Finalmente, la preparación de la reacción de retro transcripción se realizó en un tubo estéril que se encontraba sobre hielo, donde se colocaron los componentes correspondientes según el protocolo del kit para completar la reacción. (30)

Recombinante RNasa	0.5 ul
Buffer GoScript	4 ul
$MgCl_2$	2.6 ul
PCR Nucleotide Mix	1 ul
Go Script	1 ul
Agua libre de nucleasas	5.9 ul
TOTAL	15 ul

Tabla 1. Reacción de retro transcripción

Elaborado por: Morales Maliza, Karen Natasha

Finalmente se agregó 15 ul de la mezcla de retro transcripción a cada tubo de reacción, manteniéndolos siempre en hielo; posteriormente se añadieron 5 ul de la mezcla de ARN y cebador para obtener un volumen de 20 ul. A continuación, se realizó la etapa de anillamiento colocando los tubos en un bloque térmico a 25ºC durante 5 minutos, para la extensión, los tubos se incubaron en un bloque térmico a 42 ºC durante una hora. Por último, se procedió a la inactivación de la transcriptasa inversa incubando los tubos a 70 ºC durante 15 minutos, completando así la síntesis del ADNc.(30)

2.4.6.9.3 Expresión del gen *mrkA* mediante PCR

Después de sintetizar ADNc, se procedió a realizar la PCR, basado en Estrada – Barraza et al. (2011), siguiendo el protocolo establecido: (31)

Para la preparación de la mezcla de la reacción se estandarizó un volumen de 25 ul. Inicialmente se descongeló la GoTaq Master Mix y el agua libre de nucleasas, estas se descongelaron a temperatura ambiente y se les dio agitación en el vórtex por 5 segundos a baja velocidad. (31)Finalmente se preparó la master mix correspondiente según lo detallado en la (**Tabla 2**)

Componentes	Volumen
GoTaq Master Mix	12,5 µL
Forward	5 µL
Reverse	5 µL

Agua libre de nucleasas	1,5 µL
Total	24 µL

Tabla 2. Componentes de la master mix para PCR

Elaborado por: Morales Maliza, Karen Natasha

Primero, se agregó el volumen correspondiente de la mezcla sin ADN a cada tubo; posteriormente se añadió 1 ul del ADN plantilla o agua en el caso de los controles negativos para obtener un volumen final de 25 ul, se homogeneizó en el vórtex por 5 segundos y finalmente se llevaron al termociclador empleando el siguiente programa:

Una fase inicial de desnaturalización a 96 ºC por 5 minutos, seguida de 38 ciclos, iniciando con una temperatura de 96 ºC por 30 segundos, seguida por la fase de alineación a 54 ºC por 30 segundos y una fase de elongación a 72 ºC por 30 segundos; finalmente fue programada una fase de elongación final a 72 ºC por 10 minutos. (31)

- *Preparación del buffer TBE 1X y gel agarosa*

Se utilizó una solución de TBE 10X, a partir de la cual se preparó 1000 mL de solución de trabajo con una concentración de 1X, por lo que, para realizar el cálculo, se debió tomar en cuenta que se partía de una solución comercial 10X. El cálculo fue el siguiente:

$$V1 * C1 = V2 * C2$$

$$V1 = \frac{V2 * C2}{C1}$$

$$V1 = \frac{1000\ mL * 1X}{10X}$$

$$V1 = 100\ mL - - - -\ TBE\ 10X$$

$$Volumen\ agua\ destilada = 1000\ mL -\ \ 100\ ml = 900\ mL$$

Se tomó 100 mL de TBE al 10X comercial y se aforó 900 mL de agua destilada para llegar a una concentración final de TBE 1X. Se preparó el gel de agarosa a una concentración de 1,7 % para ello se realizó el siguiente cálculo:(31)

$$gramos\ de\ agarosa = \frac{VmL * 1.7\%}{100}$$

$$gramos\ de\ agarosa = \frac{30 * 1.7\%}{100}$$

$$gramos\ de\ agarosa = 0.51$$

Entonces, se pesó 0.51 gramos de gel de agarosa que se disolvieron en 30 mL de TBE 1X, esta mezcla se homogenizó en el microondas por 1 minuto hasta que estuvo completamente disuelta, luego se añadió 3 ul del intercalante SYBR Safe en el gel disuelto y se mezcló. Se colocó la solución en el molde y se ubicó el peine para formar los pocillos. Se dejó solidificar por 30 minutos, luego se retiró el peine y se llenó la cámara con el TBE 1X hasta su aforó máximo o hasta cubrir el gel.

- *Electroforesis*

Se dispensó un volumen de 5 ul por muestra y controles, del Ladder se pipeteó un volumen de 3 ul. En el primer pocillo se colocó el Ladder, en los pocillos del 2 al 5 se colocó la cepa de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705, en los pocillos del 7 al 10 se colocó la cepa de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1706 y en los pocillos 6 y 11 se colocó el control negativo (CN). Se colocó la tapa de la cámara de electroforesis y se conectaron los cables de acuerdo a las cargas correspondientes y se configuró a 100 V por 30 minutos. Al finalizar la corrida, se desconectaron los cables y se apagó la fuente de poder, se llevó el gel a la fotodocumentador ChemiDoc Bio-Rad para la identificación de los genes amplificados.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis de resultados

3.1.1. Control de calidad del microencapsulado

La microencapsulación se realizó por el método de secado de pulverización de partículas, con la finalidad de conservar los componentes químicos que posee el aceite esencial puro de Eucalipto (*Eucalyptus globulus*)

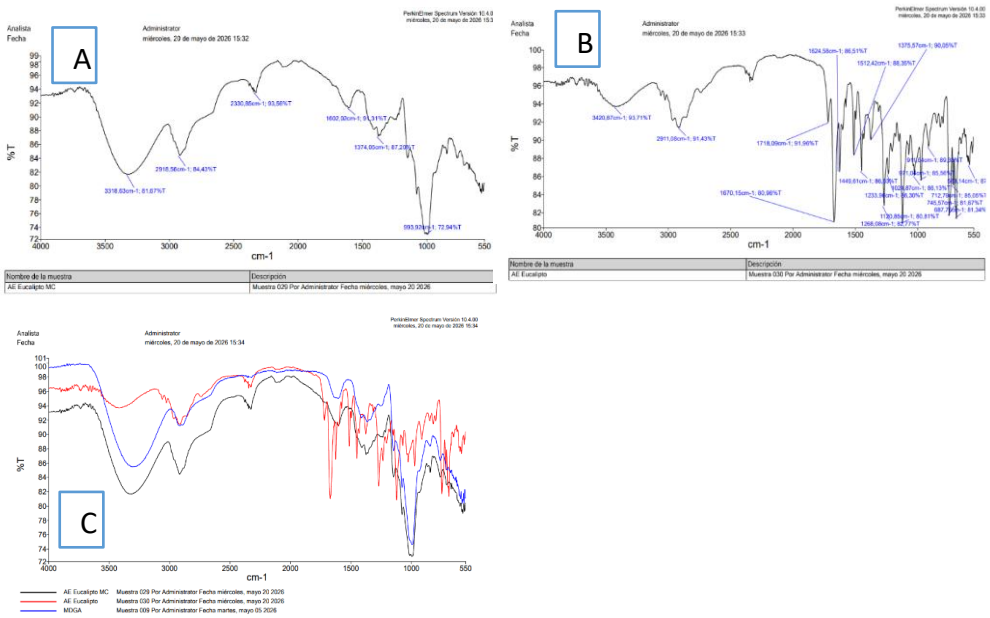


Figura 4. Espectro de bandas de infrarrojo de eucalipto (*Eucalyptus globulus*). A. Aceite esencial puro de *Eucalyptus globulus*; B. Aceite esencial microencapsulado de *Eucalyptus globulus*; C. Superpuestos de la mezcla polimérica, aceite esencial puro y microencapsulado.

Fuente: ATR-FTIR, Nicolet IR100 (Alemania)

Realizado por: Morales Maliza, Karen Natasha

En el análisis de la Figura 4 se muestra la comparación entre los espectros obtenidos mediante Reflectancia Total Atenuada – Infrarrojo por Trasformada de Fourier (ATR – FTIR).

En el literal, correspondiente al aceite esencial puro de eucalipto microencapsulado, se observa una banda de alrededor de 3318 cm^{-1}, atribuible a vibraciones de estiramiento

de grupos O – H, indicativos de alcoholes terpénicos. Las señales registradas entre 2918 y 2330 cm^{-1} corresponden a estiramientos de C – H de cadenas alifáticas, propios de la fracción terpenica del aceite. Adicionalmente, la banda en 1602 cm^{-1} hace referencia a estiramientos C = C, mientras que las absorbancias en torno a 993 cm^{-1} son características de estructuras cíclicas oxigenada como el 1,8 – cineol, compuesto mayoritario del aceite de eucalipto. La presencia conjunta de estas señales confirma que el aceite esencial se encuentra adecuadamente retenido dentro de los vehículos de encapsulación.

El literal B, corresponde al aceite esencial puro de eucalipto, la banda en 3420 cm^{-1} indican grupos O – H libres propios de alcoholes terpénicos. Las señales en 2911 cm^{-1} corresponden a estiramientos C – H alifáticos de la fracción terpenica. La absorción en 1718 cm^{-1} es indicativa de grupos carbonilo C = O, sugestiva de aldehídos o cetonas terpenicas presentes en el aceite. El conjunto de señales entre 1524 y 687 cm^{-1} refleja la riqueza terpenica y aromática característica del perfil fitoquímico de *Eucalyptus globulus*, siendo el 1,8 – cineol el compuesto mayoritario esperado para esta especie.

En el literal C, correspondiente a la superposición de las tres muestras, se observa que los espectros del aceite microencapsulado y el aceite puro de eucalipto presentan un perfil de absorción similar en sus bandas principales, lo que confirma que la composición química del aceite esencial se conserva tras el proceso de microencapsulación.

3.1.2. Resultados de la prueba de susceptibilidad aplicando la técnica de Kirby Bauer modificada

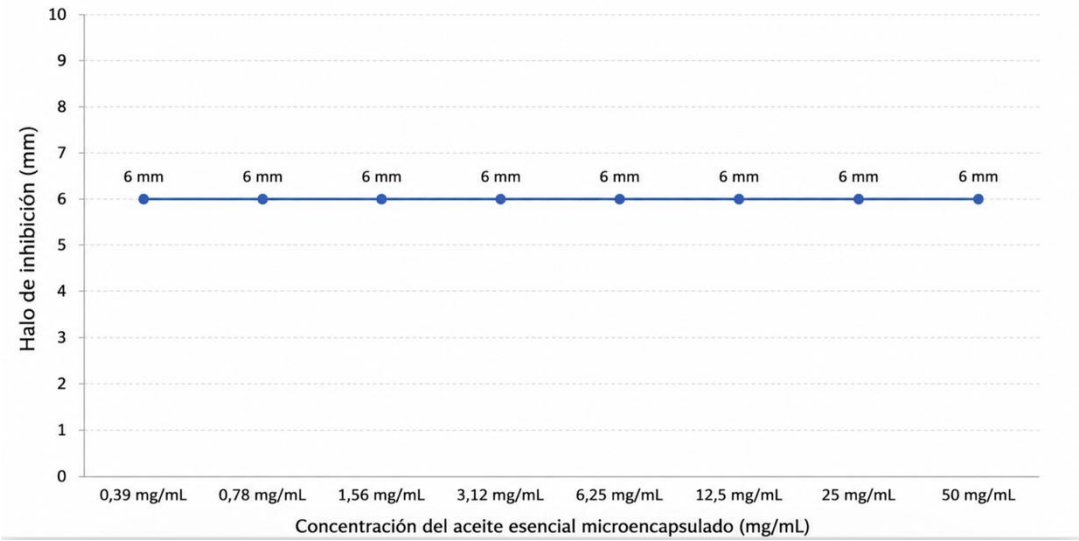
Para la prueba de susceptibilidad se utilizaron aceites esenciales microencapsulados de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) y *Rosmarinus officinalis* (romero) frente a las cepas *Klebsiella pneumoniae* BAA-1705 y *Klebsiella pneumoniae* BAA-1706 utilizando la técnica de difusión en pocillos, como se observa en el en la Tabla 3 y Figura 5.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales microencapsulados de *Eucalyptus globulus* y *Rosmarinus officinalis* frente a *Klebsiella pneumoniae* BAA-1705 y BAA-1706

Cepa bacteriana	**Aceite esencial microencapsulado**	**Halo de inhibición (mm)**
Klebsiella pneumoniae BAA-1705	*Eucalyptus globulus*	6
Klebsiella pneumoniae BAA-1705	*Rosmarinus officinalis*	6
Klebsiella pneumoniae BAA-1706	*Eucalyptus globulus*	6
Klebsiella pneumoniae BAA-1706	*Rosmarinus officinalis*	6

Elaborado por: Morales, Natasha

Figura 5. Actividad antibacteriana por difusión en agar de los aceites esenciales microencapsulados frente a *Klebsiella pneumoniae* BAA-1705 y BAA-1706.



Elaborado por: Morales, Natasha

Los resultados aportados desde esta investigación, permiten corroborar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales microencapsulados de *Eucalyptus globulus* y *Rosmarinus officinalis* frente a las cepas *Klebsiella pneumoniae* BAA-1705 y BAA-1706. Para determinar la actividad antimicrobiana se aplicó la técnica de difusión en pocillos utilizando agar Mueller Hinton, con una inoculación estandarizada a 0,5 McFarland. Los aceites esenciales microencapsulados mostraron diámetros coincidentes con el tamaño del pocillo (6 mm), sin que se pudieran observar zonas de inhibición adicionales alrededor de los mismos. Esos resultados ponen de manifiesto la ausencia de actividad antimicrobiana si se aplica la técnica de difusión en pocillos, pues las cepas estudiadas continuaron creciendo en presencia de los aceites esenciales que fueron probados.

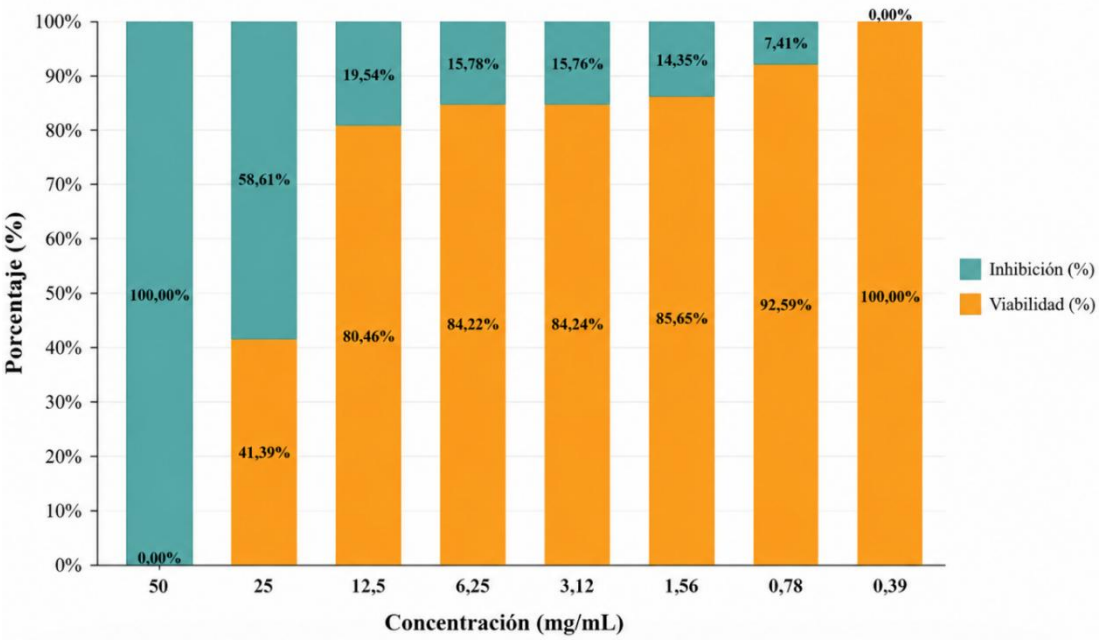
3.1.3. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Tabla 4. Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial microencapsulado de eucalipto frente a *Klebsiella pneumoniae* 1705

Concentración (mg/mL)	**Viabilidad**	**Inhibición**
50	0,00%	100,00%
25	41,39%	58,61%
12,5	80,46%	19,54%
6,25	84,22%	15,78%
3,12	84,24%	15,76%
1,56	85,65%	14,35%
0,78	92,59%	7,41%
0,39	100,00%	0,00%

Elaborado por: Morales, Natasha

Figura 6. Análisis de viabilidad e inhibición de *Klebsiella pneumoniae* 1705 frente al aceite esencial microencapsulado de eucalipto según la concentración evaluada.



Elaborado por: Morales, Natasha

Tabla 5. Concentración Mínima Bactericida del aceite esencial microencapsulado de eucalipto frente a *Klebsiella pneumoniae* 1705

Concentración (mg/mL)	**50**	**25**	**12,5**	**6,25**	**3,12**	**1,56**	**0,78**	**0,39**
Crecimiento bacteriano	-	-	+	+	+	+	+	+
Efectividad	CMB	CMI						

Elaborado por: Morales, Natasha

El aceite esencial de eucalipto microencapsulado mostró actividad frente a *Klebsiella pneumoniae* 1705 la correlación a continuación descrita se observa en la Figura 6 y Tabla 5. A la concentración de 50 mg/mL, las muestras resultaron con 0% de viabilidad bacteriana, lo que supone el 100% de inhibición. De forma inversamente proporcional al decrecimiento de la concentración del aceite esencial, se evidenció un incremento gradual de la viabilidad bacteriana. A 25 mg/mL, la actividad inhibidora sí que era importante, aunque a partir de 12,5 mg/mL se dio cuenta de la existencia de

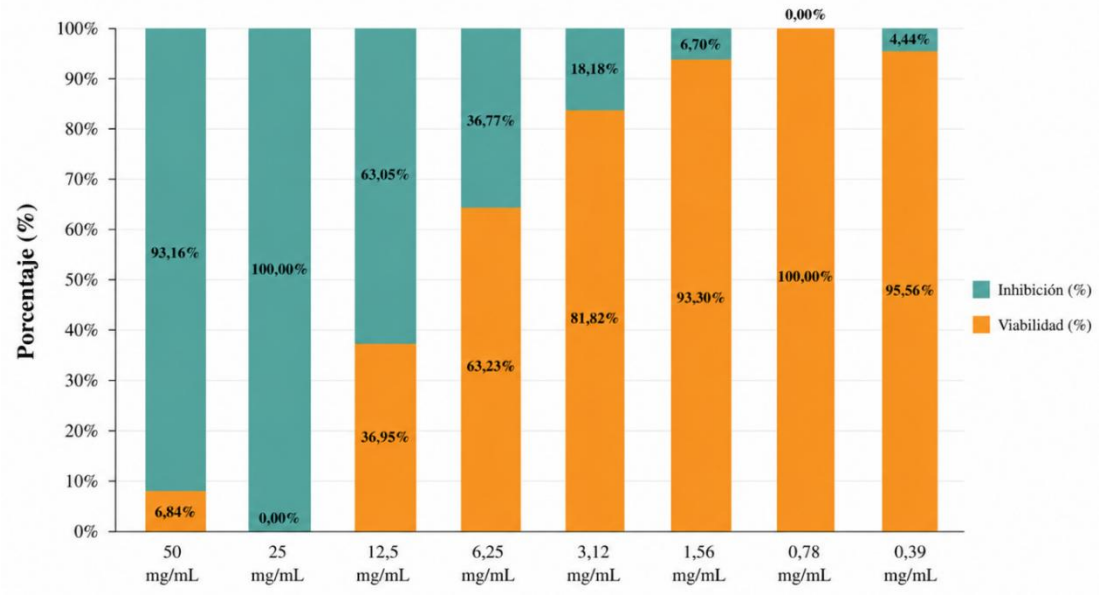
metabolismo bacteriano. A 12,5 mg/mL, se tuvo una evidencia visual de la existencia del metabolismo de la resazurina; por el contrario, a la concentración de 25 mg/mL no se dio el cambio de color que caracteriza el metabolismo; se determinó la CMI. La CMB correspondió a una concentración de 50 mg/mL, ya que, desde esta concentración, se evidenció que no había crecimiento bacteriano ni metabolización detectable. La relación CMB/CMI fue de 1, lo que indicaba que el aceite esencial microencapsulado de eucalipto actuaba como bactericida frente a *Klebsiella pneumoniae* 1705.

Tabla 6. Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial microencapsulado de romero frente a *Klebsiella pneumoniae* 1705

Concentración (mg/mL)	**Viabilidad**	**Inhibición**
50	6,84%	93,16%
25	0,00%	100,00%
12,5	36,95%	63,05%
6,25	63,23%	36,77%
3,12	81,82%	18,18%
1,56	93,30%	6,70%
0,78	100,00%	0,00%
0,39	95,56%	4,44%

Elaborado por: Morales, Natasha

Figura 7. Análisis de viabilidad e inhibición de *Klebsiella pneumoniae* 1705 frente al aceite esencial microencapsulado de romero según la concentración evaluada



Elaborado por: Morales, Natasha

Tabla 7. Concentración Mínima Bactericida del aceite esencial microencapsulado de romero frente a *Klebsiella pneumoniae* 1705

Concentración (mg/mL)	**50**	**25**	**12,5**	**6,25**	**3,12**	**1,56**	**0,78**	**0,39**
Crecimiento bacteriano	-	-	-	+	+	+	+	+
Efectividad	CMB		CMI					

Elaborado por: Morales, Natasha

El aceite esencial microencapsulado de romero mostró una más fuerte actividad inhibidora frente a *Klebsiella pneumoniae* 1705, en comparación al aceite de eucalipto esta correlación se observa en la Figura 7 y Tabla 7. A la concentración máxima de 25 mg/mL se observó una inhibición del 100% de la viabilidad bacteriana, mientras que a 12,5 mg/mL todavía se mostró una importante inhibición del crecimiento. Gradualmente a medida que disminuía la concentración, la viabilidad bacteriana

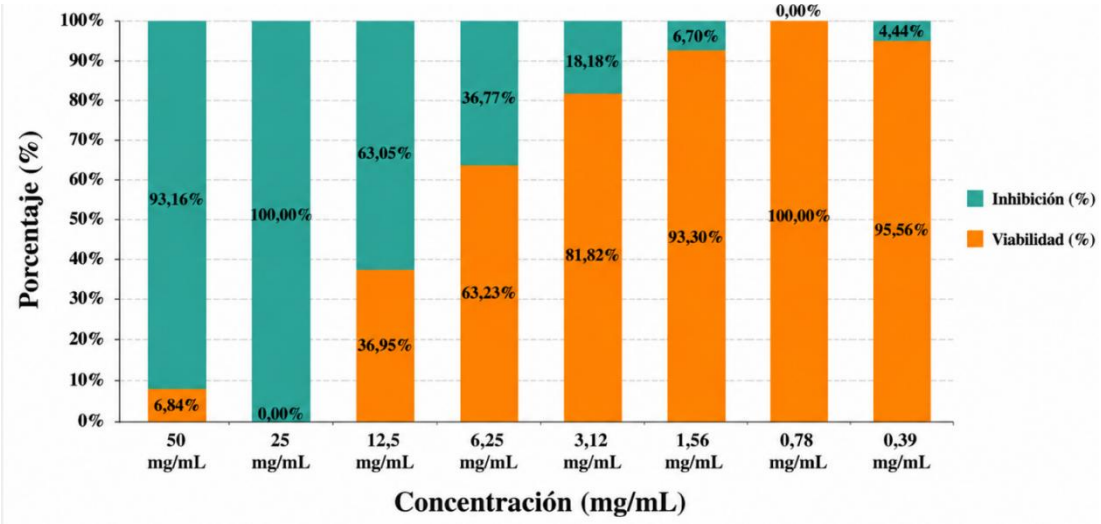
aumentaba. En la concentración de 6,25 mg/mL se llevó a cabo el metabolismo de la resazurina, en tanto que en la de 12,5 mg/mL no encontrándose alteración en el color y se determinó como concentración mínima inhibitoria (CMI). La concentración mínima bactericida (CMB) (tabla 7) fue de 25 mg/m. La relación CMB/CMI fue de 1, indicando actividad bactericida del aceite esencial microencapsulado de romero frente a *Klebsiella pneumoniae* 1705.

Tabla 8. Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial microencapsulado de eucalipto frente a *Klebsiella pneumoniae* 1706

Concentración	**Viabilidad**	**Inhibición**
50	0,00%	100,00%
25	5,52%	94,48%
12,5	22,53%	77,47%
6,25	19,24%	80,76%
3,12	33,75%	66,25%
1,56	38,65%	61,35%
0,78	39,98%	60,02%
0,39	100,00%	0,00%

Elaborado por: Morales, Natasha

Figura 8. Análisis de viabilidad e inhibición de *Klebsiella pneumoniae* 1706 frente al aceite esencial microencapsulado de eucalipto según la concentración evaluada



Elaborado por: Morales, Natasha

Tabla 9. Concentración Mínima Bactericida del aceite esencial microencapsulado de eucalipto frente a *Klebsiella pneumoniae* 1706

Concentración (mg/mL)	**50**	**25**	**12,5**	**6,25**	**3,12**	**1,56**	**0,78**	**0,39**
Crecimiento bacteriano	-	+	+	+	+	+	+	+
Efectividad	CMB				CMI			

Elaborado por: Morales, Natasha

Se observó actividad antibacteriana del aceite esencial microencapsulado de eucalipto frente a *Klebsiella pneumoniae* 1706 (Figura 8 y Tabla 9), resultado que se tradujo en inhibiciones del 100,00% y del 94,48% a las concentraciones de 50 mg/mL y 25 mg/mL, y el incremento de viabilidad bacteriana conforme disminuía el contenido del aceite.

De la colorimetría con resazurina se encontró un metabolismo bacteriano desde 1,56 mg/mL hasta las diluciones sucesivas más bajas, mientras que la concentración de 3,12 mg/mL mostró una inhibición del 66,25%, considerándose la Concentración Mínima

Inhibitoria (CMI), ya que es la menor concentración que causa un crecimiento visiblemente inhibido.

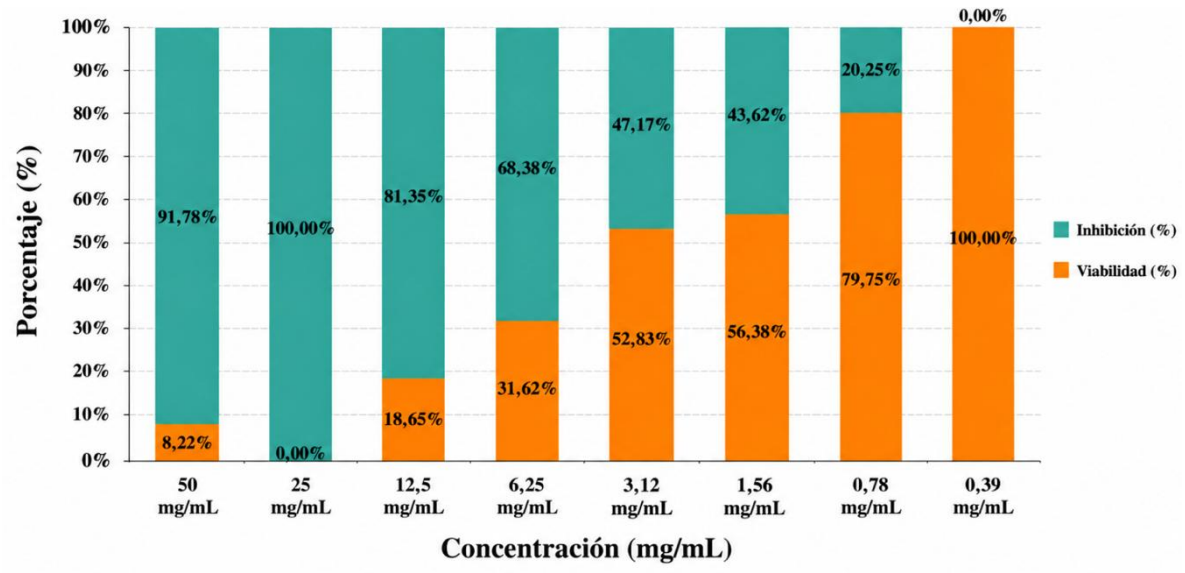
La Concentración Mínima Bactericida (CMB) mostrada fue de 50 mg/mL, dado que fue la única con una viabilidad bacteriana del 0,00%, o bien, con un efecto inhibitorio del 100,00%. La relación CMB/CMI fue de 1.1 lo que da cuenta que el aceite esencial microencapsulado de eucalipto mostró un efecto predominantemente inhibidor hacia *K. pneumoniae* 1706, teniendo que utilizar concentraciones muy superiores para llegar a tener un efecto total bactericida.

Tabla 10. Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial microencapsulado de romero frente a *Klebsiella pneumoniae* 1706

Concentración (mg/mL)	**Viabilidad**	**Inhibición**
50	8,22%	91,78%
25	0,00%	100,00%
12,5	18,65%	81,35%
6,25	31,62%	68,38%
3,12	52,83%	47,17%
1,56	56,38%	43,62%
0,78	79,75%	20,25%
0,39	100,00%	0,00%

Elaborado por: Morales, Natasha

Figura 9. Análisis de viabilidad e inhibición de *Klebsiella pneumoniae* 1706 frente al aceite esencial microencapsulado de romero según la concentración evaluada



Elaborado por: Morales, Natasha

Tabla 11. Concentración Mínima Bactericida del aceite esencial microencapsulado de romero frente a *Klebsiella pneumoniae* 1706

Concentración (mg/mL)	**50**	**25**	**12,5**	**6,25**	**3,12**	**1,56**	**0,78**	**0,39**
Crecimiento bacteriano	+	-	+	+	+	+	+	+
Efectividad	CMB	CMI						

Elaborado por: Morales, Natasha

El aceite esencial microencapsulado de romero demostró actividad antibacteriana frente a la cepa *Klebsiella pneumoniae* 1706 como se muestra en la Figura 9 y Tabla 11. Para la concentración de 25 mg/mL se observó una viabilidad bacteriana de 0,00% y se dedujo que correspondía a una concentración que producía igualmente un 100,00% de inhibición, la cual se determinó como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) o concentración que inhibe el crecimiento bacteriano. Para la concentración de 12,5 mg/mL se evidenció la existencia de metabolismo bacteriano, con una viabilidad de 18,65%, lo que denota recuperación parcial de ese crecimiento.

La Concentración Mínima Bactericida (CMB) se estableció en 50 mg/mL dado que corresponde a la concentración más alta ensayada que corresponde a la concentración que lograba ya el mayor efecto bactericida presuntivo. La relación CMB/CMI fue de 1 y fue indicativa de la actividad bactericida del aceite esencial microencapsulado de romero frente a la cepa *K. pneumoniae* 1706.

3.1.4. Formación de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae*

Tabla 12. Criterios de clasificación para la formación de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* cepa 1705

Cut-off	No formador	Débil formador	Moderado formador	Fuerte formador
0,145	≤ 0,145	0,145–0,290	0,290–0,581	≥ 0,581

Elaborado por: Morales, Natasha

Tabla 13. Criterios de cepas bacterianas según la capacidad de formación de biopelícula

Microorganismo	Absorbancia	Clasificación
Klebsiella pneumoniae 1705	0,771	Fuerte formador

Elaborado por: Morales, Natasha

La clasificación de la formación de biopelículas puede ser no formadora en la que la OD es menor o igual a 0.145; débil formadora en la que la OD es menor o igual a 0.290; moderada formadora entre 0.290 y 0.581 y fuerte formadora cuando la OD es igual o superior a 0.581. Con *Klebsiella pneumoniae* cepa 1705 Los valores obtenidos de absorbancia fueron de 0.771, lo que lo coloca en el grupo de fuerte formador de biopelícula.

Tabla 14. Criterios de clasificación para la formación de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* cepa 1706

Cut-off	No formador	Débil formador	Moderado formador	Fuerte formador
0,399	≤ 0,399	0,399–0,798	0,798–1,597	≥ 1,597

Elaborado por: Morales, Natasha

Tabla 15. Criterios de cepas bacterianas según la capacidad de formación de biopelícula

Microorganismo	Absorbancia	Clasificación
Klebsiella pneumoniae 1706	0,873	Moderado formador

Elaborado por: Morales, Natasha

La clasificación de la formación de biopelículas puede ser no formadora en la que la OD es menor o igual a 0,399; débil formadora en la que la OD es menor o igual a 0.798; moderada formadora entre 0.798 y 1.597 y fuerte formadora cuando la OD es igual o superior a 1.597. Con *Klebsiella pneumoniae* cepa 1706 Los valores obtenidos de absorbancia fueron de 0.873, lo que le ubica en el grupo de moderado formador de biopelícula.

3.1.4.1 Porcentaje de formación de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* BAA - 1705

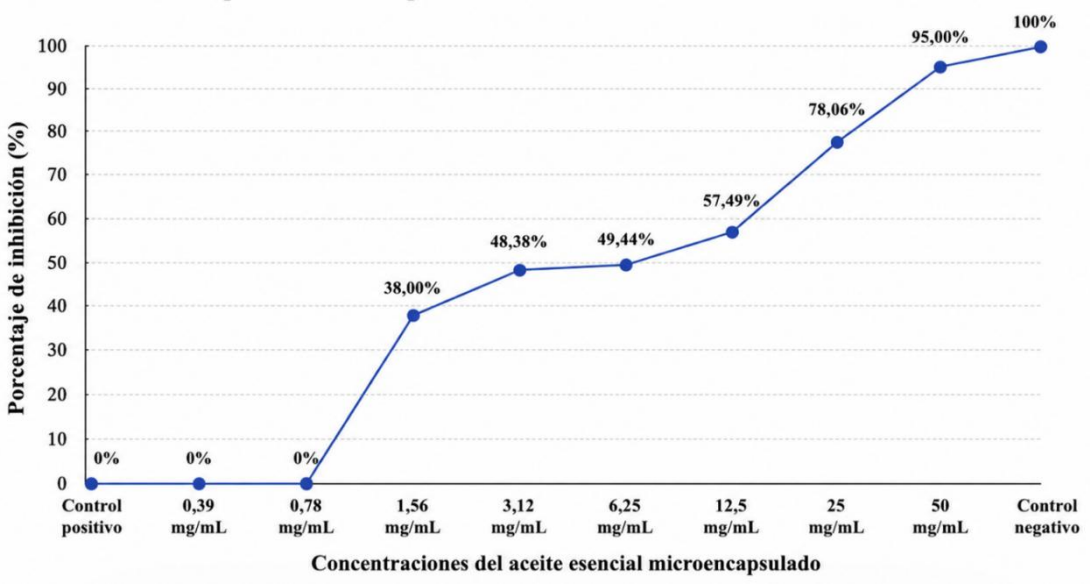
Tabla 16. Porcentaje de inhibición de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* 1705 frente al aceite esencial microencapsulado de eucalipto

Concentraciones del aceite esencial microencapsulado	Porcentaje de inhibición de la biopelícula
Control positivo	0%
0,39 mg/mL	0%
0,78 mg/mL	0%

Concentraciones del aceite esencial microencapsulado	Porcentaje de inhibición de la biopelícula
1,56 mg/mL	38,00%
3,12 mg/mL	48,38%
6,25 mg/mL	49,44%
12,5 mg/mL	57,49%
25 mg/mL	78,06%
50 mg/mL	95,00%
Control negativo	100%

Elaborado por: Morales, Natasha

Figura 10. Inhibición de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* 1705 frente al aceite esencial microencapsulado de eucalipto



Elaborado por: Morales, Natasha

La actividad antibiofilm del aceite esencial de eucalipto microencapsulado fue capaz de ejercer una relación dosis-respuesta sobre *Klebsiella pneumoniae* 1705 como se observa en la Tabla 16 y Figura 10. Se observó que a 0,39 mg/mL y a 0,78 mg/mL no

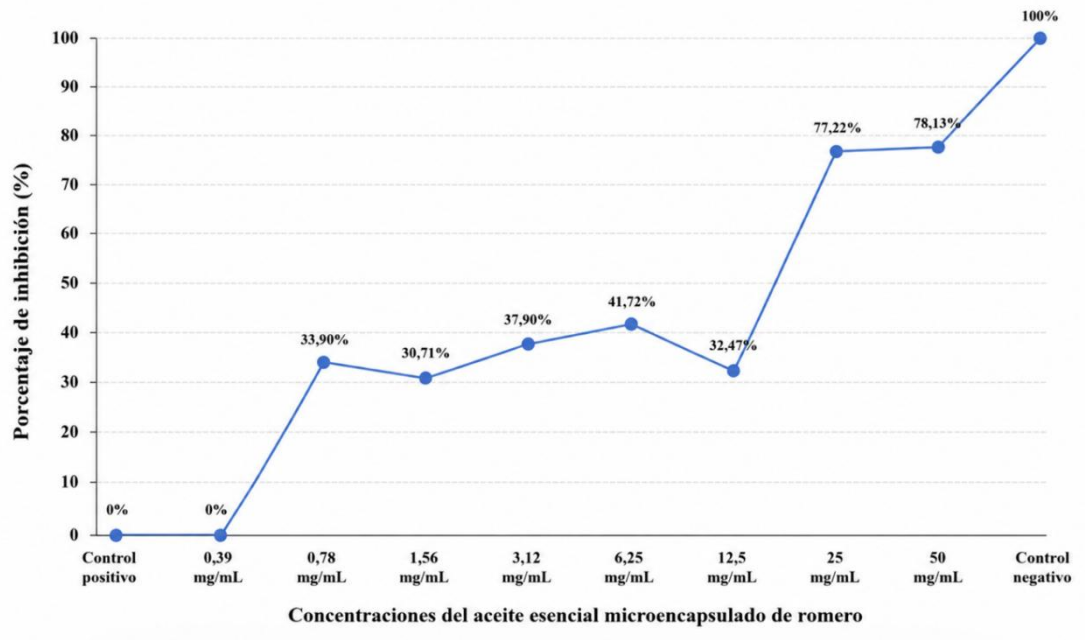
se inhibía la biopelícula (0%). Sin embargo, a partir de 1,56 mg/mL las concentraciones mostraron una actividad inhibitoria progresiva alcanzando 38,00%; 48,38%; 49,44% y 57,49% para las concentraciones de 1,56; 3,12; 6,25 y 12,5 mg/mL, respectivamente. Las mayores inhibiciones observadas fueron a 25 mg/mL (78,06%) y a 50 mg/mL (95,00%), lo que pone de manifiesto que el aceite esencial de eucalipto microencapsulado presenta una notable capacidad para inhibir de forma eficaz la formación de biopelícula de *K. pneumoniae* 1705 en concentraciones elevadas.

Tabla 17. Porcentaje de inhibición de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* 1705 frente al aceite esencial microencapsulado de romero

Concentraciones del aceite esencial microencapsulado	**Porcentaje de inhibición de la biopelícula**
Control positivo	0%
0,39 mg/mL	0%
0,78 mg/mL	33,90%
1,56 mg/mL	30,71%
3,12 mg/mL	37,90%
6,25 mg/mL	41,72%
12,5 mg/mL	32,47%
25 mg/mL	77,22%
50 mg/mL	78,13%
Control negativo	100%

Elaborado por: Morales, Natasha

Figura 11. Inhibición de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* 1705 frente al aceite esencial microencapsulado de romero



Elaborado por: Morales, Natasha

La actividad antibiofilm del aceite esencial de romero microencapsulado frente a *Klebsiella pneumoniae* 1705 mostró una respuesta dependiente de la concentración; las más bajas (0,39 mg/mL) no mostraron inhibición del biofilm (0%), mientras que con 0,78 mg/mL se logró una inhibición del 33,90% e intermedias de 1,56; 3,12 y 6,25 mg/mL presentaron porcentajes de inhibición de 30,71%, 37,90% y 41,72%, respectivamente, en tanto que con 12,5 mg/mL se registró un pequeño descenso de la actividad inhibitoria (32,47%), pero hubo un importante incremento de la inhibición con concentraciones más altas, 77,22% y 78,13% a 25 mg/mL y 50 mg/mL, respectivamente como se ve en la figura 11, lo que sugiere que el aceite esencial microencapsulado de romero posee capacidad para inhibir la biopelícula de *K. pneumoniae* 1705, siendo más efectivo a concentraciones altas. Por el otro lado, el control negativo se inhibió a 100%, confirmando la validez del ensayo llevado a cabo.

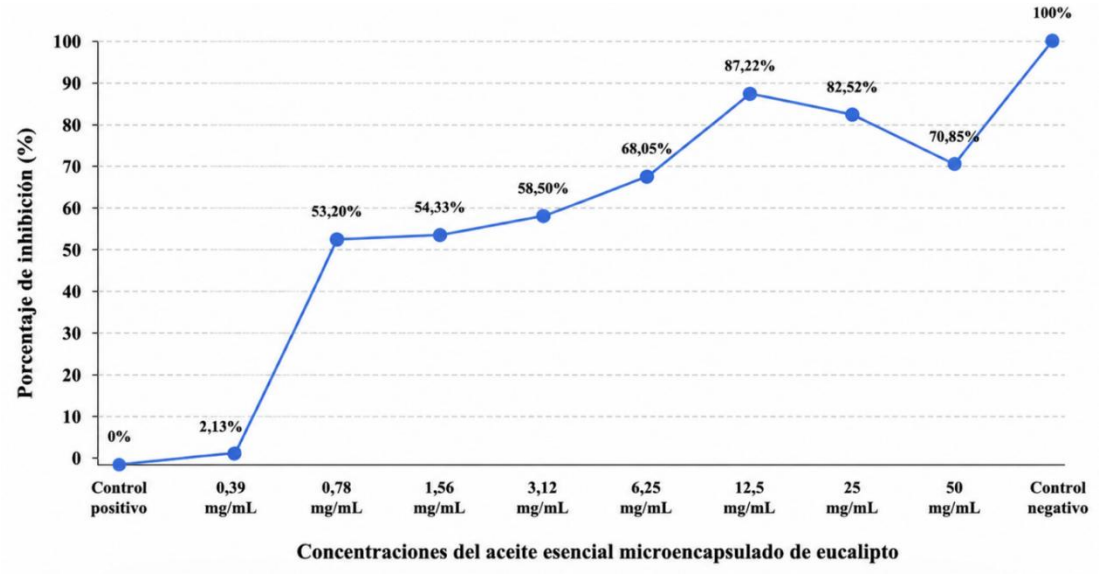
3.1.4.2 Porcentaje de formación de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* BAA - 1706

Tabla 18. Porcentaje de inhibición de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* 1706 frente al aceite esencial microencapsulado de eucalipto

Concentraciones del aceite esencial microencapsulado	**Porcentaje de inhibición de la biopelícula**
Control positivo	0%
0,39 mg/mL	2,13%
0,78 mg/mL	53,20%
1,56 mg/mL	54,33%
3,12 mg/mL	58,50%
6,25 mg/mL	68,05%
12,5 mg/mL	87,22%
25 mg/mL	82,52%
50 mg/mL	70,85%
Control negativo	100%

Elaborado por: Morales, Natasha

Figura 12. Inhibición de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* 1706 frente al aceite esencial microencapsulado de eucalipto



Elaborado por: Morales, Natasha

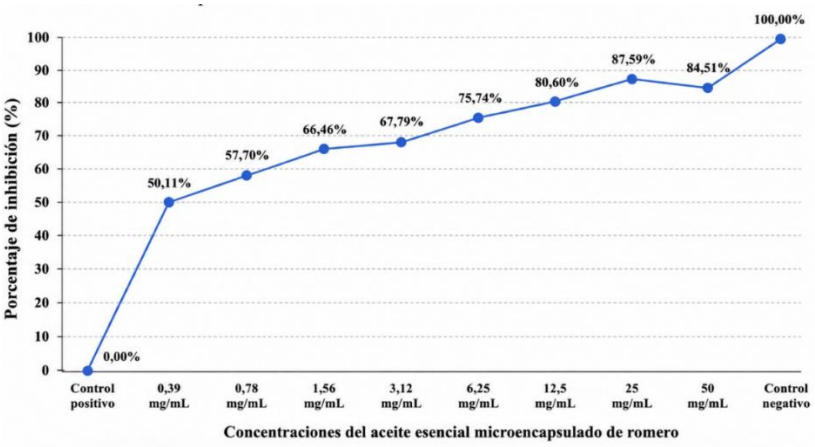
El aceite esencial microencapsulado de eucalipto mostró un importante rendimiento en la actividad anti-biopelícula frente a *Klebsiella pneumoniae* 1706 como se ve en la Figura 12, registrando en la concentración más baja evaluada (es decir, 0,39 mg/mL) la inhibición mínima de 2,13%. Sin embargo, observándose un aumento considerable de la actividad inhibitoria ya a partir de 0,78 mg/mL, alcanzando el 53,20%, 54,33% y 58,50% a las concentraciones de 0,78; 1,56 y 3,12 mg/mL, respectivamente. La inhibición siguió aumentando hasta los 6,25 mg/mL, donde se obtuvo un valor de 68,05% y la máxima actividad inhibitoria fue registrada a la concentración de 12,5 mg/mL con un total porcentaje de inhibición de 87,22%. Posteriormente, se aprecia un ligero decremento en las concentraciones de 25 mg/mL y 50 mg/mL alcanzando porcentajes de inhibición de 82,52% y 70,85%, respectivamente. Los resultados sugieren que el aceite esencial microencapsulado de eucalipto ejerce una elevada actividad anti-biopelícula frente a *K. pneumoniae* 1706, siendo 12,5 mg/mL la que presenta el mejor efecto inhibitorio de la formación de biopelícula. El control negativo (no tratado) presentó una inhibición del 100%, corroborando las condiciones experimentales del ensayo.

Tabla 19. Porcentaje de inhibición de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* 1706 frente al aceite esencial microencapsulado de romero

Concentraciones del aceite esencial microencapsulado	**Porcentaje de inhibición de la biopelícula**
Control positivo	0%
0,39 mg/mL	50,11%
0,78 mg/mL	57,70%
1,56 mg/mL	66,46%
3,12 mg/mL	67,79%
6,25 mg/mL	75,74%
12,5 mg/mL	80,60%
25 mg/mL	87,59%
50 mg/mL	84,51%
Control negativo	100%

Elaborado por: Morales, Natasha

Figura 13. Inhibición de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* 1706 frente al aceite esencial microencapsulado de romero



Elaborado por: Morales, Natasha

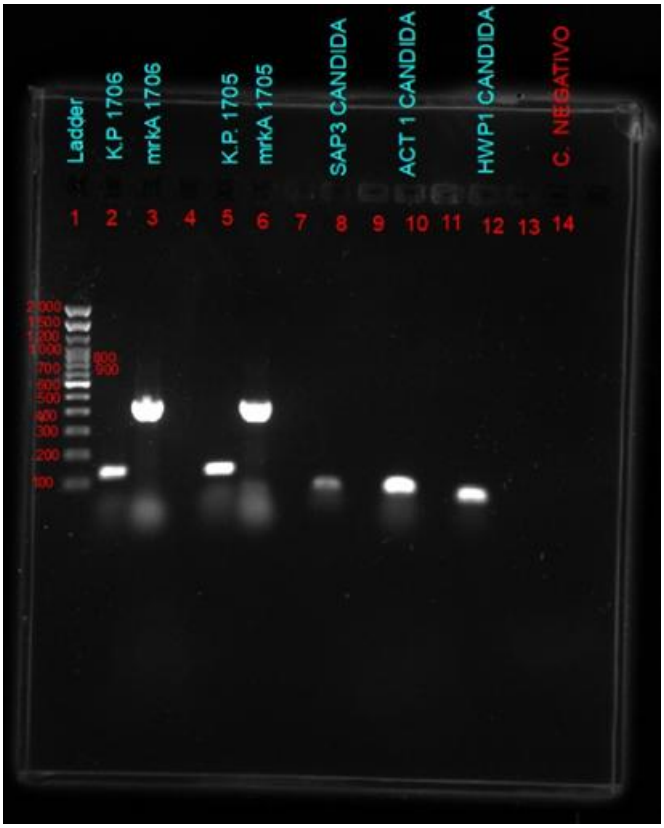
La actividad anti-biopelícula del aceite esencial microencapsulado de romero frente a *Klebsiella pneumoniae* 1706 mostró una importante capacidad inhibidora en todas las concentraciones analizadas como se ve en la Figura 13. A la concentración más baja (0,39 mg/mL) se obtuvo una inhibición del 50.11%, que aumentó progresivamente a 57.70%, 66.46%, 67.79% y 75.74 % para la concentración de 0,78; 1,56; 3,12 y 6,25 mg/mL, respectivamente. El mayor porcentaje de inhibición se produjo a 25 mg/mL, donde se obtuvo un valor de 87.59%; no obstante, a 50 mg/mL se apreció una leve disminución en el porcentaje de inhibición (84.51%). A su vez, se obtuvo una inhibición de 80.60 % a 12,5 mg/mL, lo que demuestra una respuesta dosis dependiente y elevado nivel de actividad frente a la biopelícula bacteriana. A partir de estos resultados se puede concluir que el aceite esencial microencapsulado de romero presenta elevadas capacidades de inhibición de la biopelícula de *K. pneumoniae* 1706 y en particular en concentraciones medias y altas. El control negativo para la actividad anti-biopelícula mostró una inhibición del 100% lo que da validez al procedimiento experimental.

3.1.5. Identificación génica del gen *mrkA*

Klebsiella pneumoniae es una bacteria patógena que puede generar biopelículas complejas en diferentes superficies, lo que permite una alta persistencia en el ambiente hospitalario y aumento de la resistencia frente a antimicrobianos, entre las cuales destaca el *gen mrkA*, que codifica la principal subunidad estructural de las fimbrias tipo 3 (estructuras implicadas en la adhesión bacteriana y en la formación de biopelículas).

El *gen mrkA* fue identificado por medio de la reacción en cadena de la polimerasa convencional para determinar la presencia del gen responsable de la formación de biopelículas en las cepas de *K. pneumoniae* empleadas en este estudio.

Figura 14. Identificación del gen *mrkA* en *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1705 y ATCC 1706.



Los resultados mostraron que las cepas de *K. pneumoniae* analizadas presentan el *gen mrkA*. En el gel de agarosa para la electroforesis, el primer pocillo estaba cargado con el Ladder que tiene un rango de 100 pb a 2000 pb. En los pocillos de las cepas ATCC 1705 y ATCC 1706, se observaban bandas de tipo compatible con una longitud de producto de amplificación del *gen mrkA*. Además, en el caso de los controles positivos, las amplificaciones eran adecuadas y en el control negativo no se mostraban bandas amplificadas. Los resultados obtenidos muestran que las cepas de *K. pneumoniae* analizadas tienen el *gen mrkA*, relacionado con la producción de fimbrias tipo 3 y con la capacidad de adhesión y formación de biopelículas, lo que constituye un importante factor de virulencia en *K. pneumoniae.*

3.1.6. Selección de concentraciones del aceite esencial microencapsulado para la amplificación del gen *mrkA*

Para la amplificación del gen *mrkA* se siguió el protocolo descrito previamente en el apartado de metodología. Se utilizó ADN obtenido de las cepas de *K. pneumoniae*

BAA 1705 Y BAA 1706 tratadas con los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Rosmarinus officinalis* a diferentes concentraciones. Las concentraciones seleccionadas fueron aquellas que previamente demostraron actividad sobre la formación de biopelícula.

Tabla 20. Concentraciones del aceite esencial microencapsulado utilizadas para la amplificación del gen *mrkA* **e**n *Klebsiella pneumoniae* BAA – 1705 y BAA – 1706.

Gen asociado a la formación de biopelícula	**Concentración de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Rosmarinus officinalis***
mrkA	50 mg/mL
mrkA	0,39 mg/mL
mrkA	Control positivo
mrkA	Control negativo

Las concentraciones seleccionadas permitieron evaluar la presencia del gen *mrkA* después de la exposición al tratamiento con aceite esencial microencapsulado, con la finalidad de determinar su detección molecular en las cepas estudiadas.

3.1.7. Amplificación del gen *mrkA* en *Klebsiella pneumoniae* BAA - 1705 y BAA – 1706 tratada con aceite esencial microencapsulado

Anteriormente se realizó la amplificación del gen *mrkA* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando ADNc obtenido de las cepas de *K. pneumoniae* BAA – 1705 y BAA 1706 tratadas con diferentes concentraciones de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Rosmarinus officinalis*. Una vez finalizada la reacción, se preparó el gel de agarosa y se efectuó la electroforesis para visualizar los productos amplificados correspondientes al gen evaluado.

Figura 15. Amplificación del gen *K. pneumoniae* y el gen *mrkA* en *Klebsiella pneumoniae BAA - 1705* tratada con aceite esencial microencapsulado.

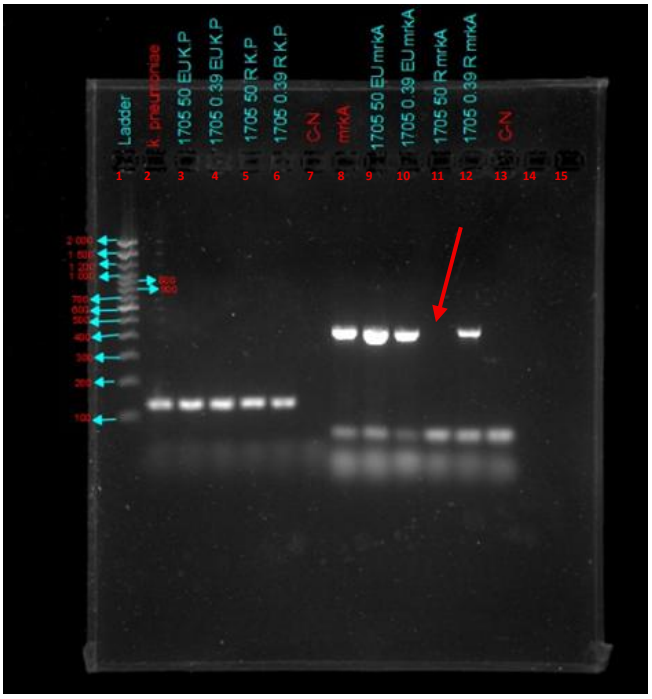
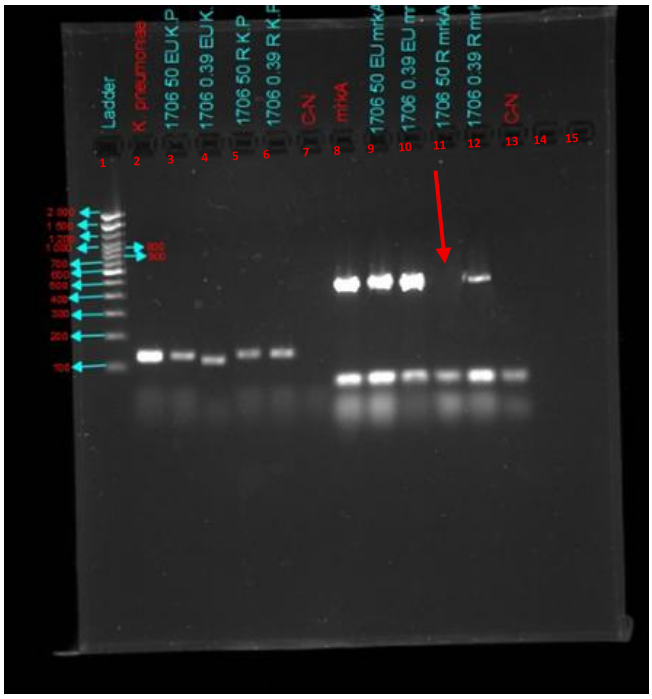


Figura 16. Amplificación del gen *K. pneumoniae* y el gen *mrkA* en *Klebsiella pneumoniae BAA - 1706* tratada con aceite esencial microencapsulado.



Los resultados obtenidos de la amplificación tanto del gen de control *K. pneumoniae* y el gen formador de biopelícula *mrkA* de las cepas BAA – 1705 y BAA – 1706 se observan en las Figura 15 y Figura 16, donde se posiciono en cada pocillo lo siguiente en el primer pocillo tenemos el Ladder de 100 pb, seguido a eso tenemos en el segundo pocillo el control positivo del gen control (*K. pneumoniae*), en el tercer pocillo

tenemos ya la cepa con el tratamiento 50 mg/mL de eucalipto, en el cuarto pocillo esta la concentración de 0,39 mg/mL de eucalipto, en el quinto pocillo tenemos 50 mg/mL de romero, en el sexto pocillo tenemos 0,39 mg/mL de romero y en el séptimo pocillo tenemos el control negativo para el gen de control. En el octavo pocillo iniciamos con el control positivo del gen formador de biopelícula *mrkA,* en el noveno pocillo de igual se inicia con la cepa tratada 50 mg/mL de eucalipto, en el décimo pocillo esta la concentración de 0,39 mg/mL de eucalipto, en el decimoprimero pocillo tenemos 50 mg/mL de romero, en el decimosegundo pocillo tenemos 0,39 mg/mL de romero y en el decimotercero pocillo tenemos el control negativo para el gen *mrkA.* Cabe recalcar que esta organización se usó en ambas cepas tanto para *Klebsiella pneumonia*e BAA – 1705 como para la cepa BAA – 1706.

El tamaño esperado de los amplicones de los genes es *K. pneumoniae* 130 pb y *mrkA* 498 pb, en ambos casos los controles positivos cumplieron con el tamaño esperado por lo que nos da a entender que las cepas *de Klebsiella pneumoniae* BAA – 1705 y BAA – 1706 expresan ambos genes. Por otro lado, tenemos el control negativo este no tuvo ninguna amplificación lo que nos confirma que este no se encontraba contaminado y funcionaba bien como control. Ahora al observar las bandas de las cepas con el tratamiento nos encontramos que en ambas cepas el gen *mrkA* no se inhibe ni por una alta concentración (50 mg/mL) mucho menos por una baja concentración (0,39 mg/mL) de aceite esencial de *Eucalyptus globulus* cosa que ocurre en ambas cepas (*K. pneumoniae* BAA – 1705 y BAA – 1706) puesto que este se amplifica al tamaño esperado (498 pb), esto da entender que existe presencia del gen en ambas cepas, aunque estas hayan sido sometidas al aceite de eucalipto.

Sin embargo, en las cepas sometidas al tratamiento con aceite de romero se observó que, a bajas concentraciones (0,39 mg/mL), existió amplificación del gen *mrkA*; mientras que, a altas concentraciones (50 mg/mL), no se evidenció amplificación. Estos resultados sugieren que el aceite esencial de romero tiene la capacidad de inhibir la formación de biopelícula en ambas cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

3.2 Discusión

Klebsiella pneumoniae es un patógeno con alta prevalencia en infecciones asociadas a la unidad de cuidados intensivos (UCI), situación que se agrava cuando existen cepas resistentes a los carbapenémicos y su capacidad para formar biopelículas que son

reguladas por genes como *treC, fimA* y *mrkA*. En el presente estudio se utilizó el gen *mrkA* marcador molecular de la capacidad de formación de biopelícula (32). En este contexto, y ante la creciente necesidad de alternativas terapéuticas frente a patógenos multirresistentes, la presente investigación evaluó la actividad antimicrobiana y antibiofilm de los aceites esenciales microencapsulados de *Eucalyptus globulus* (Eucalipto) y *Rosmarinus officinalis* (Romero) frente a cepas *Klebsiella pneumoniae* BAA – 1705 y BAA – 1706. Con el propósito de preservar los compuestos volátiles bioactivos, ambos aceites fueron microencapsulados mediante el método de secado por pulverización (spray drying), siguiendo la metodología propuesta Bringas – Lantigua et al. 2011 (19).

Los resultados obtenidos mediante la técnica de Kirby – Bauer modificada (Tabla 3 y Figura 5) por difusión en pocillos evidenciaron halos de inhibición coincidentes con el diámetro del pocillo (6 mm) para ambos aceites frente a las dos cepas evaluadas, lo que indica ausencia de actividad antimicrobiana detectable por ese método. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Elaissi et al. (2012), quienes observaron que *K. pneumoniae* fue uno de los patógenos más resistentes frente a los aceites de *Eucalyptus sp*., con zonas de inhibición entre 6,6 mm y 10,8 mm (13). En la misma línea, Iseppi et al. (2020) reportaron zonas de inhibición de entre 0 y 10 mm con E. *globulus* frente a aislados de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas (14).

En cuanto a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) determinada mediante el ensayo de resazurina, los resultados obtenidos para la cepa BAA – 1705 mostraron una correlación negativa significativa entre la concentración del aceite microencapsulado de eucalipto y la viabilidad bacteriana ($R = 0,986$; $R^2 = 0,972$; $p < 0,001$), lo que evidencia un efecto dosis – dependiente (Tabla 21). Este hallazgo es consistente con lo reportado por Moo et al. (2021), quienes demostraron que el 1,8 – cineol, componente mayoritario de *E. globulus*, ejerce un efecto bactericida a una concentración de 28,83 mg/mL contra *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas, validando el potencial de este compuesto como agente antimicrobiano activo (15). Para la cepa BAA – 1706, la correlación fue moderada ($= 0,656$; $R^2 = 0,430$; $p = 0,078$), sin significancia estadística, lo que sugiere que esta cepa presenta mayor resistencia intrínseca al aceite de eucalipto, posiblemente asociada a diferencias en el perfil de resistencia.

Por otro lado, el aceite de romero mostró actividad inhibitoria estadísticamente significativa frente a ambas cepas (BAA – 1705: R= 0,886, p= 0,005; BAA – 1706: R= 0,735, p= 0,038), con valores de CMI y CMB inferiores a los del aceite de eucalipto (Tabla 22 y Tabla 24). Aunque ambos aceites comparten el 1,8 – cineol como componente mayoritario, la mayor actividad del romero ni puede atribuirse exclusivamente a este compuesto, dado que el eucalipto, con una concentración similar de 1,8 – cineol, presentó menor eficacia inhibitoria. Esta aparente contradicción puede explicarse por la composición fitoquímica diferencial de ambas especies el aceite de romero posee además α – pineno y alcanfor en proporciones relevantes, compuestos a los cuales se atribuye un efecto sinérgico con el 1,8 – cineol que potencia la actividad antimicrobiana. Esta hipótesis es consistente con lo reportado por Kabotso et al. (2024), quienes reportaron una CMI y CBM de 6,25 mg/mL del aceite de romero frente a *K. pneumoniae*, atribuyendo dicha actividad precisamente a la sinergia entre el eucaliptol (42,68 %), α – pineno y otros compuestos minoritarios de su perfil fitoquímico (17). Asimismo, Elaissi et al. (2012) y Gama et al. (2024) sostienen que la eficacia biológica de los aceites esenciales no reside en un componente aislado, sino en la interacción sinérgica del conjunto de metabolitos secundarios presentes en cada especie. (10,13)

En cuanto a la inhibición de la formación de biopelícula, los resultados del ensayo de cristal violeta revelaron diferencias estadísticamente significativas según la prueba de post hoc de Bonferroni (Tabla 25 y Tabla 26). Para *K. pneumoniae* BAA – 1705, el aceite microencapsulado de eucalipto inhibición significativamente en concentraciones de 50,25,12,5,6,25 y 3,12 mg/mL ($p< 0,05$), mientras que el aceite de romero evidenció inhibición significativa a 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,12 mg/mL. Para la cepa BAA – 1706, el romero fue el aceite con mayor consistencia inhibitoria, mostrando diferencias significativas en casi todas las concentraciones evaluadas, excepto a 3,12 mg/mL, lo que lo posicionó como el aceite con mayor potencial antibiofilm en esta investigación. Estos resultados son comparables con los reportados por Ștefănescu et al. (2025), quienes describieron una inhibición moderada de biofilm de *K. pneumoniae* entre el 40 % y el 74% con aceite de romero a una concentración del 50%, señalando que dicha capacidad inhibitoria disminuía a concentraciones menores (16). En el presente estudio, el aceite esencial de eucalipto microencapsulado mantuvo actividad antibiofilm estadísticamente significativa incluso a la

concentración más baja evaluada (0,39 mg/mL) frente a la cepa BAA – 1705, lo sugiere que la microencapsulación mediante spray drying con maltodextrina y goma arábiga podría favorecer una liberación sostenida de los compuestos activos, preservando su eficacia a bajas concentraciones.

El aceite esencial microencapsulado de *Eucalyptus globulus* también exhibió actividad antibiofilm frente a ambas cepas, con porcentajes de inhibición superiores al 78 % a concentraciones de 25 y 50 mg/mL frente a BAA – 1705, lo que contrasta con el comportamiento del aceite de romero a esas mismas concentraciones. En concordancia con estos hallazgos, Pozharani et al. (2026), trabajando con nanoemulsiones de *E. citridora* y *E. radiata*, no registraron inhibición significativa del biofilm de *K. pneumoniae* pese a haber reducido la CIM planctónica, lo que refuerza la observación de que la actividad de antibiofilm de los aceites de *Eucalyptus* frente a este patógeno es limitada en comparación con el romero (11).

La expresión del gen *mrkA* fue identificado mediante RT – PCR en ambas cepas de *K. pneumoniae* BAA – 1705 y BAA – 1706. Se confirmaron bandas de amplificación al tamaño esperado de 498 pb en los controles positivos y en las cepas sin tratamiento, mientras que los controles negativos no mostraron amplificación, validando la integridad del ensayo. La presencia de este gen en las dos cepas empleadas es consistente con lo reportado por Mahrous et al. (2023), quienes detectaron el gen *mrkA* en el 53.6 % de los aislados de *K. pneumoniae* con capacidad formadora de biopelícula mediante PCR, utilizando los mismos cebadores y obteniendo un producto de amplificación de 498 pb. Este gen codifica la subunidad estructural principal de las fimbrias tipo 3, implicada en la adhesión bacteriana y en la formación de biopelículas, constituyendo un importante factor de virulencia en *K. pneumoniae*. (32)

En cuanto al efecto de los tratamientos sobre la expresión del gen, las cepas expuestas al aceite esencial microencapsulado de *Eucalyptus globulus* a 50 mg/mL y a 0,39 mg/mL mantuvieron la amplificación del gen *mrkA* al tamaño esperado en ambas cepas como se observa en la Figura 15 y 16, lo que indica que el eucalipto no comprometió la integridad del material genético portador de este gen a las concentraciones evaluadas. En contraste, las cepas tratadas con *Rosmarinus officinalis* a 50 mg/mL no evidenciaron amplificación del gen *mrkA* en ninguna de las dos cepas, mientras que a 0,39 mg/mL si se detectó amplificación. Este hallazgo es coherente con lo reportado

por Mahrous et al. (2023), quienes demostraron mediante RT -qPCR que el aceite de canela redujo significativamente la expresión de los genes de biopelícula *treC, fimA* y m*rkA* en aislados de *K. pneumoniae* con fuerte capacidad formadora de biopelícula (32). De igual manera, Abozahra et al. (2020), reportaron una inhibición del 100 % en la expresión del gen *mrkD*, también está asociado a la formación de fimbrias tipo 3, mediante nanopartículas de romero a concentraciones sub – inhibitorias, evidenciando el potencial del aceite de romero para suprimir genes de virulencia relacionados con el biofilm (8).

En conjunto, los resultados de esta investigación demuestran que los aceites esenciales microencapsulados de *Eucalyptus globulus* y *Rosmarinus officinalis* presentan actividad antimicrobiana y antibiofilm frente a *K. pneumoniae*, siendo el aceite de romero el que mostró mayor eficacia en ambas cepas. La microencapsulación mediante spray drying con maltodextrina y goma arábiga representó una estrategia tecnológica que favoreció la estabilización y la potencial liberación controlada de los principios activos. La eficacia biológica observada en el aceite de romero puede atribuirse a la interacción sinérgica entre el 1,8 – cineol, el α – pineno y el alcanfor, compuestos que en conjunto ejercen efectos sobre la membrana bacteriana, la inhibición de la formación de biopelícula y, a altas concentraciones, la supresión de la expresión del *gen mrkA* (10,18).

Los resultados de la presente investigación evidenciaron que los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Rosmarinus officinalis* presentan actividad antimicrobiana y antibiofilm frente a cepas de *Klebsiella pneumoniae* BAA – 1705 y BAA – 1706, destacándose el aceite de *Rosmarinus officinalis* por tener mayor eficacia inhibitoria sobre el crecimiento bacteriano y la formación de biopelículas. Asimismo, se confirmó la presencia del gen *mrkA* en ambas cepas, asociado a la capacidad de formación de biofilm, observándose que el tratamiento con aceite de romero a altas concentraciones evidenció ausencia de amplificación del gen, sugiriendo un posible efecto inhibitorio sobre factores de virulencia relacionados con la adhesión bacteriana. En conjunto, estos hallazgos respaldan el potencial de los aceites esenciales, especialmente el de romero, como una alternativa terapéutica.

3.3 Verificación de la hipótesis

El análisis estadístico se realizó de dos formas:

- Los resultados de la viabilidad por el método colorimétrico de resazurina aplicando la correlación entre la concentración y la viabilidad, además de comprobar la significancia con ANOVA.
- Los resultados obtenidos de la actividad antibiofilm a diferentes concentraciones de los aceites de *Eucalyptus globulus* y *Rosmarinus officinalis* se analizaron por ANOVA y aplicando el test de comparación múltiple de Bonferroni.
- Se usó el programa estadístico de SPSS

3.3.1 Hipótesis

- **Hipótesis nula:** Los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Rosmarinus officinalis* no inhibe la viabilidad y formación de biopelícula generada por *Klebsiella pneumoniae.*
- **Hipótesis alternativa:** Los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Rosmarinus officinalis* si inhibe la viabilidad y formación de biopelícula generada por *Klebsiella pneumoniae*

3.3.2 Análisis

Tabla 21. Validación de hipótesis del aceite esencial microencapsulado de eucalipto frente a *Klebsiella pneumoniae* 1705

Resumen de modelo

Modelo	R	R^2
1	0,986	0,972

Prueba ANOVA

Prueba	F (DFn, DFd)	Valor p
Regresión	209,000	<0,001

Elaborado por: Morales, Natasha

Los resultados mostraron una correlación negativa de R=0,986 entre la concentración del aceite esencial microencapsulado de eucalipto y la viabilidad de *Klebsiella pneumoniae* 1705. Esto demuestra que, a mayor concentración del aceite esencial, menor viabilidad bacteriana. Asimismo, el coeficiente de determinación (R^2=0,972) indicó que el 97,2% de la variabilidad observada en la viabilidad bacteriana fue explicada por la concentración del aceite esencial microencapsulado.

Por otro lado, la prueba ANOVA evidenció una diferencia estadísticamente significativa (F=209,000; p<0,001), confirmando que la concentración del aceite esencial microencapsulado de eucalipto ejerce un efecto significativo sobre la viabilidad de *Klebsiella pneumoniae* 1705.

Tabla 22. Validación de hipótesis del aceite esencial microencapsulado de romero frente a *Klebsiella pneumoniae* 1705

Resumen de modelo

Modelo	R	R^2
1	0,866	0,750

Prueba ANOVA

Prueba	F (DFn, DFd)	Valor p
Regresión	17,954	0,005

Elaborado por: Morales, Natasha

Los resultados mostraron una correlación negativa de R=0,866 entre la concentración del aceite esencial microencapsulado de romero y la viabilidad de *Klebsiella pneumoniae* 1705. Esto demuestra que, a mayor concentración del aceite esencial, menor viabilidad bacteriana. Asimismo, el coeficiente de determinación (R^2=0,750) indicó que el 75,0% de la variabilidad observada en la viabilidad bacteriana fue explicada por la concentración del aceite esencial microencapsulado.

Por otro lado, la prueba ANOVA evidenció una diferencia estadísticamente significativa (F=17,954; p=0,005), confirmando que la concentración del aceite esencial microencapsulado de romero ejerce un efecto significativo sobre la viabilidad de *Klebsiella pneumoniae* 1705.

Tabla 23. Validación de hipótesis del aceite esencial microencapsulado de eucalipto frente a *Klebsiella pneumoniae* 1706

Resumen de modelo

Modelo	R	R^2
1	0,656	0,430

Prueba ANOVA

Prueba	F (DFn, DFd)	Valor p
Regresión	4,523	0,078

Elaborado por: Morales, Natasha

Los resultados mostraron una correlación negativa de R=0,656 entre la concentración del aceite esencial microencapsulado de eucalipto y la viabilidad de *Klebsiella pneumoniae* 1706. Esto demuestra que existe una tendencia a la disminución de la viabilidad bacteriana conforme aumenta la concentración del aceite esencial. Asimismo, el coeficiente de determinación (R^2=0,430) indicó que el 43,0% de la

variabilidad observada en la viabilidad bacteriana fue explicada por la concentración del aceite esencial microencapsulado.

Por otro lado, la prueba ANOVA no evidenció diferencias estadísticamente significativas (F=4,523; p=0,078), por lo que no se puede confirmar que la concentración del aceite esencial microencapsulado de eucalipto ejerza un efecto significativo sobre la viabilidad de *Klebsiella pneumoniae* 1706. Este resultado sugiere una respuesta biológica menos consistente en comparación con las demás combinaciones evaluadas.

Tabla 24. Validación de hipótesis del aceite esencial microencapsulado de romero frente a *Klebsiella pneumoniae* 1706

Resumen de modelo

Modelo	R	R^2
1	0,735	0,541

Prueba ANOVA

Prueba	F (DFn, DFd)	Valor p
Regresión	7,066	0,038

Elaborado por: Morales, Natasha

Los resultados mostraron una correlación negativa de R=0,735 entre la concentración del aceite esencial microencapsulado de romero y la viabilidad de *Klebsiella pneumoniae* 1706. Esto demuestra que, a mayor concentración del aceite esencial, menor viabilidad bacteriana. Asimismo, el coeficiente de determinación (R^2=0,541) indicó que el 54,1% de la variabilidad observada en la viabilidad bacteriana fue explicada por la concentración del aceite esencial microencapsulado.

Por otro lado, la prueba ANOVA evidenció una diferencia estadísticamente significativa (F=7,066; p=0,038), confirmando que la concentración del aceite esencial

microencapsulado de romero ejerce un efecto significativo sobre la viabilidad de *Klebsiella pneumoniae* 1706.

Tabla 25. *Klebsiella pneumoniae* 1705 — Eucalipto (ANOVA y Bonferroni)

ANOVA

Prueba	SS	DF	MS	F	Valor p
Regresión	25855,161	8	3231,895	21,138	<0,001
Residuo	2752,122	18	152,896		
Total	28607,283	26			

Bonferroni vs control positivo

Comparación	Diferencia de medias	p ajustado
50 vs CP	-57,49	0,002
25 vs CP	-87,44	0,001
12,5 vs CP	-78,06	<0,001
6,25 vs CP	-49,44	0,023
3,12 vs CP	-48,38	0,010
1,56 vs CP	-4,63	1,000
0,78 vs CP	-38,00	0,682
0,39 vs CP	0,00	—

Elaborado por: Morales, Natasha

Los resultados de la prueba post hoc de Bonferroni evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre el control positivo y las concentraciones de 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL y 3,12 mg/mL ($p<0,05$). Estas concentraciones demostraron una capacidad inhibitoria significativa sobre la

formación de biopelícula. En contraste, las concentraciones de 1,56 mg/mL, 0,78 mg/mL y 0,39 mg/mL no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control positivo (p>0,05), sugiriendo un comportamiento similar en la inhibición de biopelícula.

Tabla 26. *Klebsiella pneumoniae* 1705 — Romero (ANOVA y Bonferroni)

ANOVA

Prueba	SS	DF	MS	F	Valor p
Regresión	25105,522	8	3138,190	24,270	<0,001
Residuo	2327,448	18	129,303		
Total	27432,970	26			

Bonferroni vs control positivo

Comparación	Diferencia de medias	p ajustado
50 vs CP	-77,22	<0,001
25 vs CP	-100,00	<0,001
12,5 vs CP	-32,47	0,247
6,25 vs CP	0,00	—
3,12 vs CP	-37,90	0,094
1,56 vs CP	-30,71	0,253
0,78 vs CP	-33,90	0,122
0,39 vs CP	-41,72	0,019

Elaborado por: Morales, Natasha

Los resultados de la prueba post hoc de Bonferroni mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el control positivo y las concentraciones de 50

mg/mL, 25 mg/mL y 0,39 mg/mL ($p<0,05$). Estas concentraciones presentaron una inhibición significativa de la biopelícula bacteriana. Por otro lado, las concentraciones de 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,12 mg/mL, 1,56 mg/mL y 0,78 mg/mL no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas respecto al control positivo ($p>0,05$), indicando una respuesta comparable en términos de inhibición de biopelícula.

Tabla 27. *Klebsiella pneumoniae* 1706 — Eucalipto (ANOVA y Bonferroni)

ANOVA

Prueba	SS	DF	MS	F	Valor p
Regresión	24110,418	8	3013,802	29,886	<0,001
Residuo	1815,153	18	100,842		
Total	25925,571	26			

Bonferroni vs control positivo

Comparación	Diferencia de medias	p ajustado
50 vs CP	-12,67	1,000
25 vs CP	-70,85	<0,001
12,5 vs CP	-82,52	<0,001
6,25 vs CP	-58,50	<0,001
3,12 vs CP	0,00	—
1,56 vs CP	-68,05	0,019
0,78 vs CP	-53,20	<0,001
0,39 vs CP	-54,33	<0,001

Elaborado por: Morales, Natasha

Los resultados de la prueba post hoc de Bonferroni evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre el control positivo y las concentraciones de 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 1,56 mg/mL, 0,78 mg/mL y 0,39 mg/mL ($p<0,05$). Estas concentraciones mostraron una reducción significativa de la formación de biopelícula. Por el contrario, las concentraciones de 50 mg/mL y 3,12 mg/mL no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al control positivo ($p>0,05$), indicando un comportamiento similar al observado en el control.

Tabla 28. *Klebsiella pneumoniae* 1706 — Romero (ANOVA y Bonferroni)

ANOVA

Prueba	SS	DF	MS	F	Valor p
Regresión	27897,121	8	3487,140	75,699	<0,001
Residuo	829,186	18	46,066		
Total	28726,307	26			

Bonferroni vs control positivo

Comparación	Diferencia de medias	p ajustado
50 vs CP	-84,51	<0,001
25 vs CP	-87,59	<0,001
12,5 vs CP	-75,74	<0,001
6,25 vs CP	-67,79	<0,001
3,12 vs CP	0,00	—
1,56 vs CP	-66,46	0,001
0,78 vs CP	-57,70	0,015
0,39 vs CP	-80,60	0,002

Elaborado por: Morales, Natasha

Los resultados de la prueba post hoc de Bonferroni mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el control positivo y todas las concentraciones evaluadas ($p<0,05$), excepto la concentración de 3,12 mg/mL, la cual no presentó diferencias significativas respecto al control positivo ($p>0,05$). Estos hallazgos indican que el aceite esencial microencapsulado de romero ejerció una actividad inhibitoria consistente sobre la formación de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* 1706, siendo el tratamiento con mayor número de concentraciones estadísticamente diferentes al control positivo.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

Los aceites esenciales microencapsulados de *Eucalyptus globulus* y *Rosmarinus officinalis* presentaron actividad antimicrobiana y antibiofilm frente a las cepas de *Klebsiella pneumoniae* BAA – 1705 productora de carbapenemasas y *Klebsiella pneumoniae* BAA – 1706, siendo el aceite de romero el que mostró mayor eficacia en ambas dimensiones evaluadas. Estos hallazgos respaldan el potencial de los aceites esenciales como alternativas terapéuticas complementarias frente a patógenos multirresistentes.

Ambos aceites esenciales microencapsulados inhibieron el crecimiento de *K. pneumoniae* de forma dosis – dependiente. El aceite de *Eucalyptus globulus* mostró una correlación negativa altamente significativa frente a la cepa BAA – 1705, mientras que en el aceite de *Rosmarinus officinalis* presentó actividad significativa frente a ambas cepas. La cepa BAA – 1706 evidenció mayor resistencia al eucalipto, lo que sugiere diferencias en la susceptibilidad entre cepas. Los resultados de difusión en pocillos mostraron halos de inhibición reducidos, atribuibles en parte a las características fisicoquímicas de la microencapsulación en medios sólidos.

Ambas cepas de *Klebsiella pneumoniae* demostraron capacidad de formación de biopelícula confirmada por el ensayo de cristal violeta. El aceite microencapsulado de *Eucalyptus globulus* inhibió significativamente el biofilm de la cepa BAA – 1705 a concentraciones de 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,12 mg/mL. El aceite de *Rosmarinus officinalis* presentó la mayor consistencia inhibitoria frente a la cepa BAA – 1706, con diferencias significativas en casi todas las concentraciones evaluadas y mantuvo actividad antibiofilm significativa incluso a la concentración más baja ensayada en la cepa BAA – 1705, lo que podría relacionarse con una liberación sostenida de los compuestos activos desde la matriz de la microencapsulación.

El gen *mrkA,* asociado a la formación de fimbrias tipo 3 y a la estructuración del biofilm, fue identificado mediante PCR en ambas cepas de *Klebsiella pneumoniae*, con amplificación al tamaño esperado de 498 pb. Las cepas tratadas con *Eucalyptus globulus* a 50 y 0,39 mg/mL mantuvieron la amplificación del gen en ambas cepas, lo

que indica que el aceite no afectó a la integridad del material genético a las concentraciones evaluadas. En contraste, las cepas tratadas con *Rosmarinus officinalis* a 50 mg/mL no evidenciaron amplificación del gen *mrkA* en ninguna de las dos cepas, mientras que a 0,39 mg/mL si se detectó amplificación. Este resultado es consistente con el mayor efecto bactericida y antibiofilm observado con el romero y sugiere que a concentraciones altas este aceite podría comprometer la integridad celular bacteriana de forma suficiente como para afectar la recuperación de ADN.

En conclusión, el aceite esencial microencapsulado de *Rosmarinus officinalis* demostró ser el más prometedor de los dos aceites evaluados, con actividad antimicrobiana, antibiofilm y efecto sobre la expresión del gen *mrkA* a *Klebsiella pneumoniae*.

4.2. Recomendaciones

- Se recomienda desarrollar investigaciones complementarias que permitan cuantificar la expresión genética diferencial y evaluar la eficacia en modelos de infección mas complejos, a fin de fortalecer la evidencia científica obtenida en el presente estudio.
- Se sugiere combinar el aceite esencial de *E. globulus* con otros aceites esenciales pues estos serían capaces de potenciar su actividad antimicrobiana dándole la posibilidad de ser una opción terapéutica.
- Se debería realizar pruebas del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* en muestras clínicas con el fin de validarlo como un agente complementario terapéutico para infecciones de *Klebsiella pneumoniae*.
- Se sugiere someter a más pruebas al aceite esencial de *Eucalyptus globulus*, es decir realizar pruebas experimentales con aceite puro u otros derivados del eucalipto, como el vinagre que proviene de la corteza del eucalipto para saber si su efecto antimicrobiano contra *K. pneumoniae* es mejor o es igual que usar el aceite microencapsulado.

Referencias Bibliográficas

1. Organization WHealth. Global Antibiotic Resistance Surveillance Report 2025 WHO Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS). World Health Organization; 2025.

2. Organization WHealth. WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: Bacterial Pathogens of Public Health Importance, to Guide Research, Development, and Strategies to Prevent and Control Antimicrobial Resistance. World Health Organization; 2024.

3. Rojas JD, Merejildo Vera MC, Benites Azabache JC, De La Cruz Surco V, Lucas López JR, Pichardo-Rodriguez R. Prevalence of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacilli from Intensive Care Units from Latin America and the Caribbean: A Systematic Review and Meta-Analysis. Antibiotics 2026, Vol 15, el 13 de febrero de 2026;15(2). doi:10.3390/ANTIBIOTICS15020209

4. Pogo NN, Chamba EM, Serpa CA. Resistencia Antimicrobiana en Klebsiella pneumoniae productora de KPC. ASCE MAGAZINE. el 13 de octubre de 2025;4(4):497–515. doi:10.70577/ASCE/497.515/2025

5. Organización Panamericana de la Salud. Evaluación Rápida de Riesgo para la salud pública relacionada con Klebsiella pneumoniae hipervirulenta portadora de genes de carbapenemasas en la Región de las América [Internet]. 2024 [citado el 12 de abril de 2026]. p. 1–11. Disponible en: https://www.paho.org/sites/default/files/2024-03/2024marzoevaluacion-riesgohvkpresistentephespfinal.pdf

6. 2023 Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis [Internet]. [citado el 12 de abril de 2026]. Disponible en: https://www.who.int/publications/i/item/9789240094000

7. Nirwati H, Sinanjung K, Fahrunissa F, Wijaya F, Napitupulu S, Hati VP, et al. Biofilm formation and antibiotic resistance of Klebsiella pneumoniae isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia. BMC Proceedings 2019 13:11. el 16 de diciembre de 2019;13(11):20-. doi:10.1186/S12919-019-0176-7

8. Abozahra R, Abdelhamid SM, Wen MM, Abdelwahab I, Baraka K. A Nanoparticles based Microbiological Study on the Effect of Rosemary and Ginger Essential Oils against Klebsiella pneumoniae. Open Microbiol J. el 5 de septiembre de 2020;14(1):205–12. doi:10.2174/1874285802014010205

9. Elaissi A, Rouis Z, Salem NA Ben, Mabrouk S, ben Salem Y, Salah KBH, et al. Chemical composition of 8 eucalyptus species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities. BMC

Complement Altern Med. el 28 de diciembre de 2012;12(1):81. doi:10.1186/1472-6882-12-81

10. Gama GSP, Pimenta AS, Feijó FMC, Aires CAM, de Melo RR, dos Santos CS, et al. Antimicrobial Impact of Wood Vinegar Produced Through Co-Pyrolysis of Eucalyptus Wood and Aromatic Herbs. Antibiotics. el 6 de noviembre de 2024;13(11):1056. doi:10.3390/antibiotics13111056

11. Beba Pozharani L, İlktaç M, Ak-Sakallı E, Alhadi M, Ozbil E, Hanoglu A, et al. Nanoencapsulation of Eucalyptus Essential Oils via Box–Behnken Design: Phytochemical Profiling and Enhanced Antibacterial and Antibiofilm Efficacy. ACS Omega. el 3 de marzo de 2026;11(8):13799–818. doi:10.1021/acsomega.5c11998

12. Organization WHealth. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. 2021 [citado el 14 de abril de 2026]. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance

13. Elaissi A, Rouis Z, Salem NA Ben, Mabrouk S, ben Salem Y, Salah KBH, et al. Chemical composition of 8 eucalyptus species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities. BMC Complement Altern Med. el 28 de diciembre de 2012;12(1):81. doi:10.1186/1472-6882-12-81

14. Iseppi R, Di Cerbo A, Aloisi P, Manelli M, Pellesi V, Provenzano C, et al. In Vitro Activity of Essential Oils Against Planktonic and Biofilm Cells of Extended-Spectrum β-Lactamase (ESBL)/Carbapenamase-Producing Gram-Negative Bacteria Involved in Human Nosocomial Infections. Antibiotics. el 25 de mayo de 2020;9(5):272. doi:10.3390/antibiotics9050272

15. Moo CL, Osman MA, Yang SK, Yap WS, Ismail S, Lim SHE, et al. antimicrobial activity and mode of action of 1,8-cineol against carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae. Sci Rep. el 21 de octubre de 2021;11(1):20824. doi:10.1038/s41598-021-00249-y

16. Ștefănescu R, Laczkó-Zöld E, Ciurea C, Tero-Vescan A, Ősz B, Vancea S, et al. GC-MS Profiling and Antimicrobial Activity of Eight Essential Oils Against Opportunistic Pathogens with Biofilm-Forming Potential. Inti J Mol Si. el 11 de noviembre de 2025;26(22):10928. doi:10.3390/ijms262210928

17. Kabotso DEK, Neglo D, Gaba SE, Danyo EK, Dayie AD, Asantewaa AA, et al. In Vitro Evaluation of Rosemary Essential Oil: GC-MS Profiling, Antibacterial Synergy, and Biofilm Inhibition. Pharmaceuticals. el 8 de diciembre de 2024;17(12):1653. doi:10.3390/ph17121653

18. Ameur E, Sarra M, Yosra D, Mariem K, Nabil A, Ibrahim J, et al. Chemical compositions of Eucalyptus sp. Essential oils and the evaluation of their

combinations as a promising treatment against ear bacterial infections. BMC Complement Med Ther. el 7 de junio de 2024;24(1):220. doi:10.1186/s12906-024-04494-2

19. Bringas-Lantigua M, Expósito-Molina I, Reineccius GA, López-Hernández O, Pino JA. Influence of Spray-Dryer Air Temperatures on Encapsulated Mandarin Oil. Drying Technology. el 28 de marzo de 2011;29(5):520–6. doi:10.1080/07373937.2010.513780

20. Sousa VI, Parente JF, Marques JF, Forte MA, Tavares CJ. Microencapsulation of Essential Oils: A Review. Polymers (Basel). el 23 de abril de 2022;14(9):1730. doi:10.3390/polym14091730

21. Liliana Jordá Vargas, Andrea Vila, Javier Nazar, Analía Mikietuk. Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana [Internet]. 2005 [citado el 18 de abril de 2026]. Disponible en: https://www.redalyc.org/pdf/535/53522191005.pdf

22. Sánchez-García E, Castillo-Hernández SL, García-Palencia P. Actividad antimicrobiana. Investigación en plantas de importancia médica. el 21 de septiembre de 2016;77–100. doi:10,3926/OMS.334

23. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol [Internet]. 2009 [citado el 25 de mayo de 2026]. Disponible en: www.atcc.org

24. Monteiro-Neto V, Fernandes ES. Antimicrobial and Anti-infective Activity of Natural Products.

25. Park C, Kim N, Na H, Park MJ. Screening the Physical Properties, Chemical Profile and Antimicrobial Activity of Five Essential Oils. J Oleo Sci. 2025;74(11): ess24354. doi:10.5650/jos. ess24354

26. dos Santos RD, Matos BN, Freire DO, da Silva FS, do Prado BA, Gomes KO, et al. Chemical Characterization and Antimicrobial Activity of Essential Oils and Nanoemulsions of Eugenia uniflora and Psidium guajava. Antibiotics 2025, Vol 14, el 13 de enero de 2025;14(1). doi:10.3390/ANTIBIOTICS14010093

27. Meryem S, Mohamed D, Nour-eddine C, Faouzi E. Chemical composition, antibacterial and antioxidant properties of three Moroccan citrus peel essential oils. Sci Afr. julio de 2023;20: e01592. doi: 10.1016/j.sciaf. 2023.e01592

28. Quick-DNA^{TM} Fungal/Bacterial Miniprep Kit DNA from tough-to-lyse fungi and bacteria samples.

29. Quick-RNA ^{TM} Miniprep Kit RNA from any sample Highlights.

30. Corporation P. GoScript™ Reverse Transcription System INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A5000 AND A5001 [Internet]. [citado el 30 de mayo de 2026]. Disponible en: www.promega.com

31. Estrada-Barraza D, Dávalos Martínez A, Flores-Padilla L, Mendoza-De Elias R, Sánchez-Vargas LO. Comparación entre métodos convencionales, ChromAgar Candida® y el método de la PCR para la identificación de especies de Candida en aislamientos clínicos. Rev Iberoam Micol. el 1 de enero de 2011;28(1):36–42. doi: 10.1016/J.RIAM.2010.11.003 PubMed PMID: 21167300.

32. Mahrous SH, El-Balkemy FA, Abo-Zeid NZ, El-Mekkawy MF, El Damaty HM, Elsohaby I. Antibacterial and Anti-Biofilm Activities of Cinnamon Oil against Multidrug-Resistant Klebsiella pneumoniae Isolated from Pneumonic Sheep and Goats. Pathogens 2023, Vol 12, el 5 de septiembre de 2023;12(9). doi:10.3390/PATHOGENS12091138

ANEXOS

Anexo 1. Procedimiento de viabilidad con resazurina al 0.01 %

	CONTROL POSITIVO	EUCALIPTO			ROMERO			CONTROL ACEITES		CONTROL CALDO		CONTROL NEGATIVO	
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	CONCENTRACIONES
A	50 ul 10 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 20 ul 20ul	50 mg/mL
B	50 ul 10 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 20 ul 20ul	25 mg/mL
C	50 ul 10 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 20 ul 20ul	12,5 mg/mL
D	50 ul 10 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 20 ul 20ul	6,25 mg/mL
E	50 ul 10 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 20 ul 20ul	3,12 mg/mL
F	50 ul 10 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 20 ul 20ul	1,56 mg/mL
G	50 ul 10 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 20 ul 20ul	0,78 mg/mL
H	50 ul 10 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 100 ul 20 ul	50 ul 20 ul 20ul	0,39 mg/mL

Volumen del medio de cultivo LB
Volumen de la solucion de AE + DMSO 0,1 %
Volumen del inoculo
Volumen de resazurina al 0.01 %
Volumen de antibiotico

Realizado por: Morales Maliza, Karen Natasha

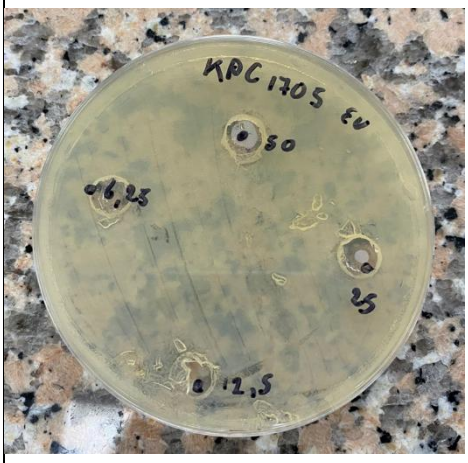
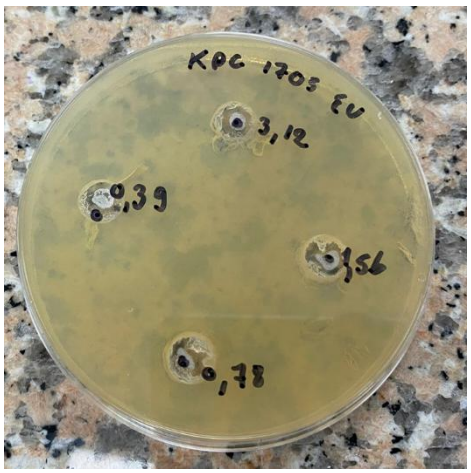
Anexo 2. Diseño experimental para la evaluación de la actividad anti – biopelícula de aceites esenciales.

	CONTROL POSITIVO	EUCALIPTO			ROMERO			CONTROL CALDO		CONTROL ACEITES		CONTROL NEGATIVO	
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	CONCENTRACIONES
A	100 ul 10 ul 10 ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul	100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 10 ul	50 mg/mL
B	100 ul 10 ul 10 ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul	100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 10 ul	25 mg/mL
C	100 ul 10 ul 10 ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul	100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 10 ul	12,5 mg/mL
D	100 ul 10 ul 10 ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul	100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 10 ul	6,25 mg/mL
E	100 ul 10 ul 10 ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul	100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 10 ul	3,12 mg/mL
F	100 ul 10 ul 10 ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul	100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 10 ul	1,56 mg/mL
G	100 ul 10 ul 10 ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul	100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 10 ul	0,78 mg/mL
H	100 ul 10 ul 10 ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul	100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 10 ul	0,39 mg/mL

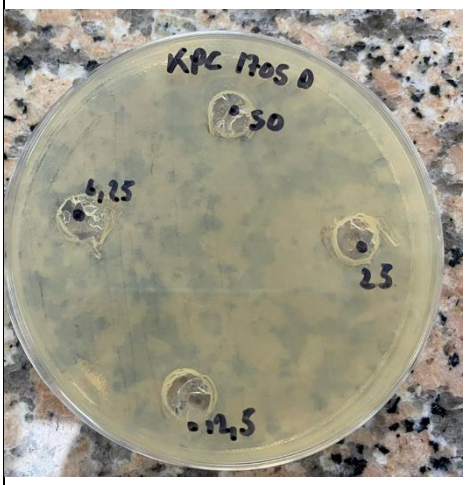
Volumen de caldo BHI
Volumen del inoculo
Volumen del AE + DMSO 0,1%
Volumen antibiotico

Realizado por: Morales Maliza, Karen Natasha

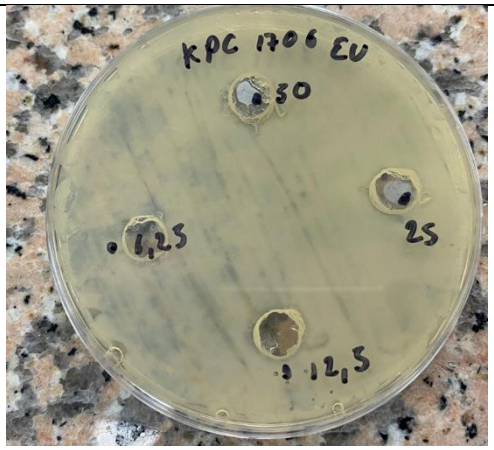
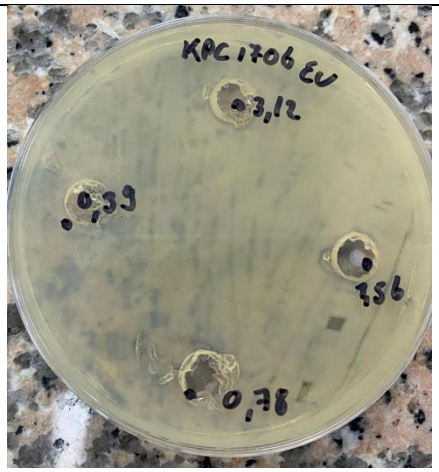
Anexo 3. Difusión en pocillo de AE *Eucalyptus globulus* de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705

Difusión en pocillo de AE *Eucalyptus globulus* de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705	
	
50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL y 6,25 mg/mL	3,12 mg/mL, 1,56 mg/mL, 0,78 mg/mL y 0,39 mg/mL

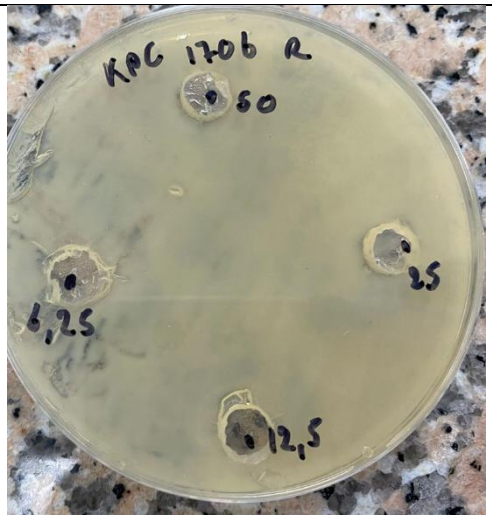
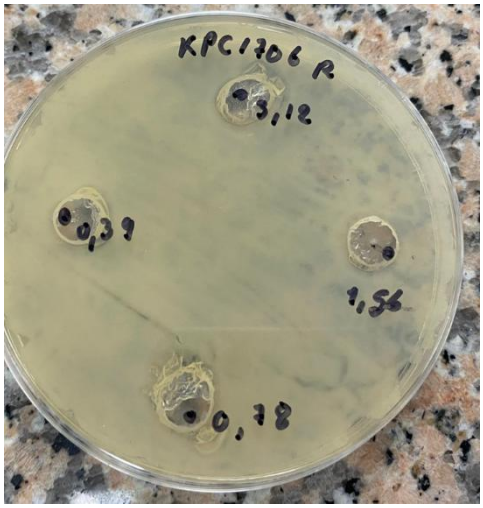
Anexo 4. Difusión en pocillo de AE *Rosmarinus officinalis* de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705

Difusión en pocillo de AE *Rosmarinus officinalis* de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705	
	
50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL y 6,25 mg/mL	3,12 mg/mL, 1,56 mg/mL, 0,78 mg/mL y 0,39 mg/mL

Anexo 5. Difusión en pocillo de AE *Eucalyptus globulus* de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1706

Difusión en pocillo de AE *Eucalyptus globulus* de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1706	
	
50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL y 6,25 mg/mL	3,12 mg/mL, 1,56 mg/mL, 0,78 mg/mL y 0,39 mg/mL

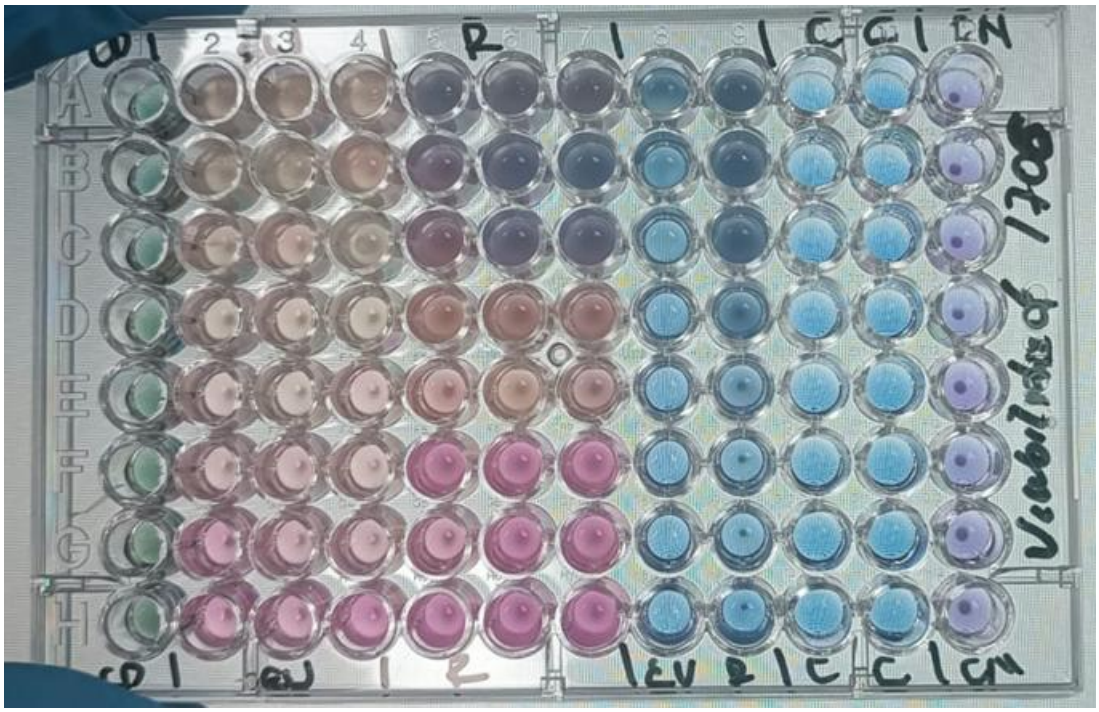
Anexo 6. Difusión en pocillo de AE *Rosmarinus officinalis* de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1706

Difusión en pocillo de AE *Rosmarinus officinalis* de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1706	
	
50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL y 6,25 mg/mL	3,12 mg/mL, 1,56 mg/mL, 0,78 mg/mL y 0,39 mg/mL

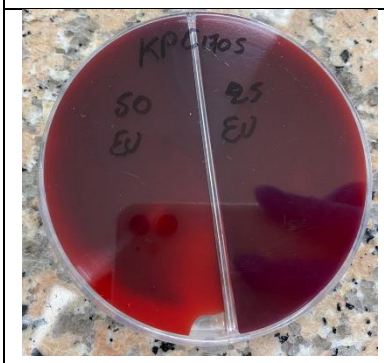
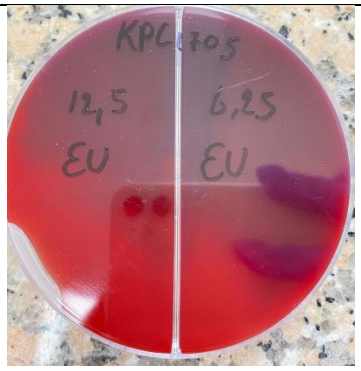
Anexo 7. Viabilidad con resazurina al 0,01% de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705



Anexo 8. Viabilidad con resazurina al 0,01% de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1706

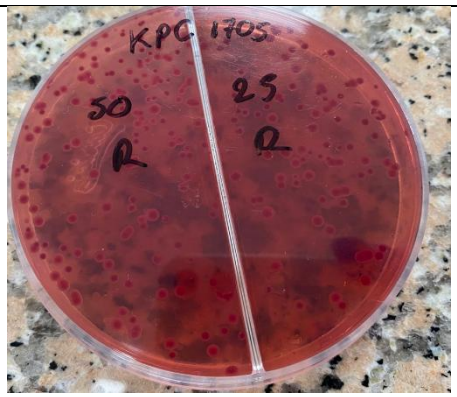


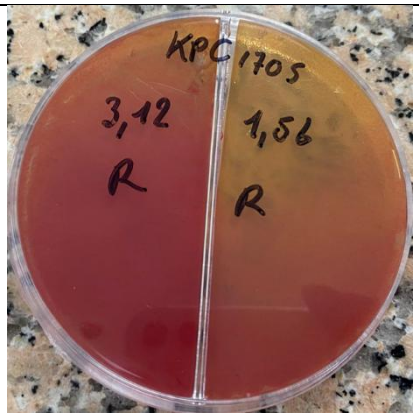
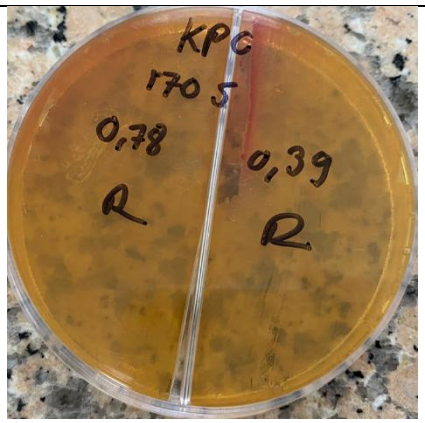
Anexo 9. Concentración Mínima Bactericida de AE *Eucalyptus globulus* de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705

<table>
<tr><td colspan="2">Concentración Mínima Bactericida de AE Eucalyptus globulus de Klebsiella pneumoniae BAA 1705</td></tr>
<tr><td>Cara anterior</td><td>Cara posterior</td></tr>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">50 mg/mL, 25 mg/mL</td></tr>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL</td></tr>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">3,12 mg/mL, 1,56 mg/mL</td></tr>
</table>

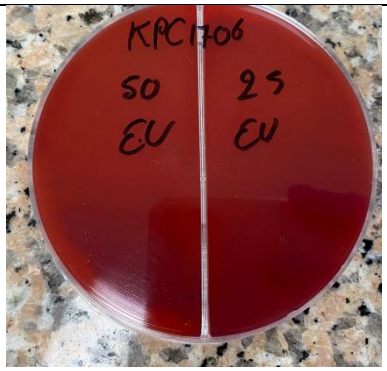
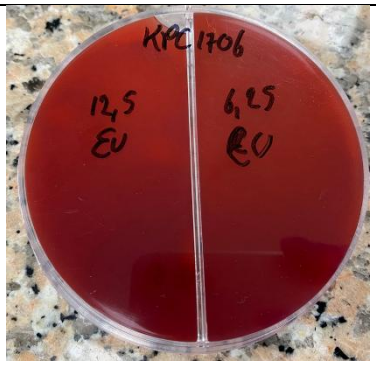
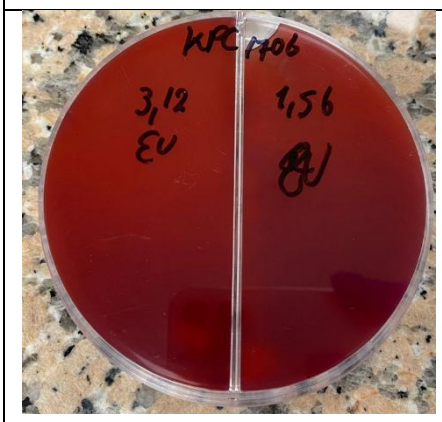
	
0,78 mg/mL, 0,39 mg/mL	

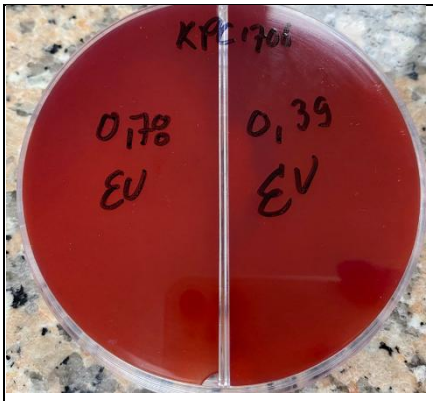
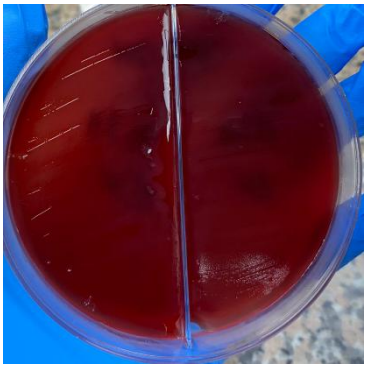
Anexo 10. Concentración Mínima Bactericida de AE *Rosmarinus officinalis* de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705

Concentración Mínima Bactericida de AE *Rosmarinus officinalis* de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705	
Cara anterior	**Cara posterior**
	
50 mg/mL, 25 mg/mL	

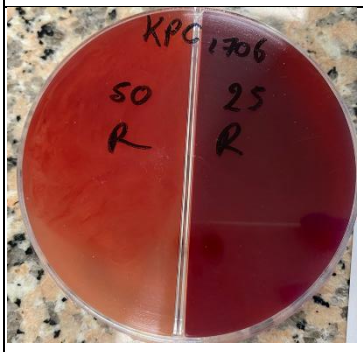
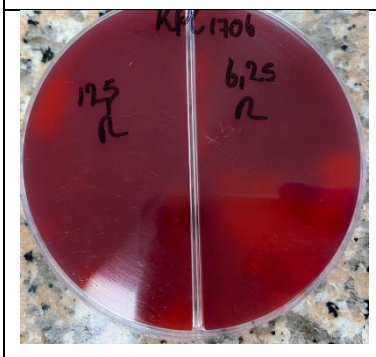
	
12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL	
	
3,12 mg/mL, 1,56 mg/mL	
	
0,78 mg/mL, 0,39 mg/mL	

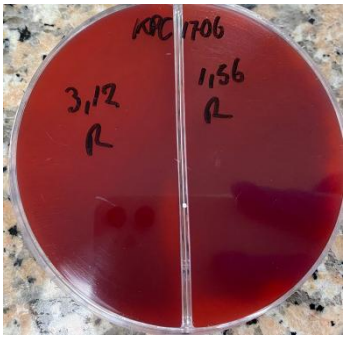
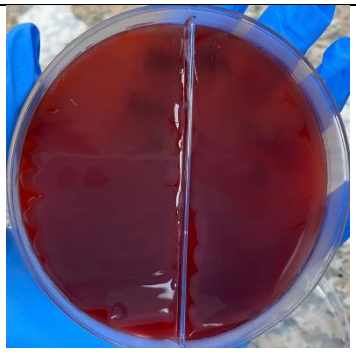
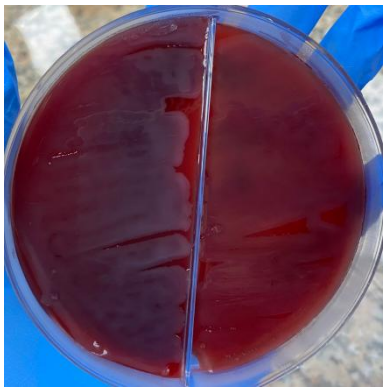
Anexo 11. Concentración Mínima Bactericida de AE *Eucalyptus globulus* de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1706

<table>
<tr><td colspan="2">Concentración Mínima Bactericida de AE Eucalyptus globulus de Klebsiella pneumoniae BAA 1706</td></tr>
<tr><td>Cara anterior</td><td>Cara posterior</td></tr>
<tr><td>
</td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">50 mg/mL, 25 mg/mL</td></tr>
<tr><td>
</td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL</td></tr>
<tr><td>
</td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">3,12 mg/mL, 1,56 mg/mL</td></tr>
</table>

	
0,78 mg/mL, 0,39 mg/mL	

Anexo 12. Concentración Mínima Bactericida de AE *Rosmarinus officinalis* de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1706

Concentración Mínima Bactericida de AE *Rosmarinus officinalis* de *Klebsiella pneumoniae* BAA 1706	
Cara anterior	**Cara posterior**
	
50 mg/mL, 25 mg/Ml	
	
12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL	

	
3,12 mg/mL, 1,56 mg/mL	
	
0,78 mg/mL, 0,39 mg/mL	

Anexo 13. Resolución

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CONSEJO DIRECTIVO

Resolución Nro. UTA-CD-FCS-2026-0367

Ambato, 13 de febrero de 2026

UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO

Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias de la Salud, mediante sesión ordinaria del 11 de febrero de 2026, en conocimiento del acuerdo UTA-UAT-FCS-2026-0077-A, suscrito por el Lcdo. Mg. Mario Vilcacundo Córdova, sugiriendo se apruebe a modalidad Trabajo de Titulación del/la señor/ita MORALES MALIZA KAREN NATASHA con cédula de ciudadanía 1804878377 estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico, para el período académico enero – julio 2026.

Que, el numeral 6.1 del Instructivo del Reglamento para la Titulación de Grado en la Universidad Técnica de Ambato, aprobado mediante la Resolución Nro. CAU-P-681-2023, de fecha 29 de noviembre de 2023, y reformado mediante la Resolución Nro. CAU-P-290-2025, de fecha 19 de mayo de 2025, establece las modalidades de titulación y el procedimiento para su aprobación.

CONSEJO DIRECTIVO, RESUELVE:

- **APROBAR** la modalidad Trabajo de Titulación del/la señor/ita MORALES MALIZA KAREN NATASHA con cédula de ciudadanía 1804878377 estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico, para el período académico enero – julio 2026, según el siguiente detalle:

Opción modalidad	Proyecto de investigación
Tema	Evaluación antimicrobiana y antibiofilm de aceites esenciales en Klebsiella sp.
Tutor	PhD. María Elizabeth Proaño Pérez

- **DEJAR CONSTANCIA** de que el presente trabajo de titulación forma parte del proyecto de investigación: "Evaluación de la actividad antimicrobiana y antibiofilm de aceites esenciales micro encapsulados", aprobado mediante la Resolución Nro. UTA-CONIN-2023-0185-R.

Documento firmado electrónicamente

Dr. José Luis Herrera López
PRESIDENTE CONSEJO DIRECTIVO - FCS