



UNIVERSIDAD ABIERTA
Y A DISTANCIA DE MÉXICO



DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD,
BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

***ALOE BARBADENSIS* MILL:
EFECTOS BACTERICIDAS Y
BACTERIOSTÁTICOS EN *ESCHERICHIA COLI***

PROYECTO TERMINAL QUE PARA OBTENER EL
TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA
PRESENTA:

**ALBERTO LÓPEZ RESÉNDIZ
ES1611321174**

**ASESORES: Q.F.B. FABIOLA ORTEGA SALDAÑA
DRA. DIANA ELINOS CALDERÓN**



Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento al Laboratorio Campestre Norte, por el apoyo institucional para realizar este proyecto, permitiéndome utilizar sus instalaciones, aparatos y equipos para llevar a cabo dicho proyecto.

Con mi admiración y respeto a la Químico Fármaco Biólogo Fabiola Ortega Saldaña, por su tiempo y apoyo, siempre disponible para la realización de mis tareas y resolver las dudas que surgían durante el proceso de dicho proyecto, así como por su paciencia durante la revisión del presente escrito.

Asimismo, agradezco a los docentes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la UNADM, en especial a mi asesora de tesis, la Dra. Diana Elinos Calderón, al guiarme en esta investigación apoyándome con sus observaciones y sugerencias para mejorarlo y lograr los objetivos de este.

Finalmente, gracias a mi esposa e hija, por su paciencia y comprensión con este proyecto, por el tiempo concedido y el tiempo robado de nuestra historia familiar. Sin el apoyo de todos los aquí mencionados, nunca hubiera logrado realizar y terminar este proyecto, gracias a todos.



Dedicatoria

A mi madre María S. Reséndiz, una gran mujer en todos los sentidos, inteligente, hermosa, trabajadora, responsable, esa personita maravillosa que me educo, me saco adelante junto a 3 hermosas hermanas, que ha estado conmigo en todos los momentos buenos o malos, apoyándome, aconsejándome y sobre todo amándome como solo una madre puede hacerlo, espero la vida me permita regresarte un poco de todo lo que tu me has dado; gracias por hacer de mi un hombre de bien, responsable y trabajador.

A mi esposa Rosaura Aguilera Carrillo, quien me tuvo la paciencia y comprensión durante casi un año que duro este proyecto importante para mí, apoyándome en las buenas y las malas, soportando mis altas y bajas durante el trayecto.

A mi hija Frida Sophia López Aguilera, quien es el motor de mi vida, la que me impulso a seguir con la carrera en todo momento y no rendirme cuando se presentaron contratiempos, siempre teniendo una sonrisa en su rostro y esperando los momentos que tenía libres para pasarlos conmigo, por su paciencia y comprensión al no pasar mucho tiempo con ella. Espero que esto te motive y te haga comprender que nunca es tarde para hacer lo que te gusta y que siempre contaras con mi apoyo incondicional.

Índice

Resumen	5
Justificación	5
1. Marco teórico	6
1.1 Antibióticos: antecedente histórico	6
1.2 Conceptos básicos	6
1.2.1 Antibiótico	6
1.2.2 Bactericidas	6
1.2.3 Bacteriostáticos	7
1.2.4 Resistencia bacteriana	7
1.3 <i>Aloe barbadensis</i> Mill	7
1.3.1 Definición	7
1.3.2 Historia y antecedentes de su uso	8
1.3.2 Propiedades químicas	8
1.3.3 Usos medicinales	9
1.4 <i>Escherichia coli</i>	10
1.4.1 Definición	10
1.4.2 Morfología	11
1.4.3 Características bioquímicas	11
1.4.4 Enfermedades que causa	12
1.4.5 Aislamiento e identificación	12
1.4.6 Requerimientos nutricionales	13
1.4.7 Medios de cultivo (desarrollo y crecimiento)	13



1.4.8 Pruebas bioquímicas	15
2 Hipótesis	16
3. Objetivos	16
3.1. Objetivo General	16
3.2. Objetivos específicos	16
4. Metodología	17
4.1 Efectos de extracto de <i>Aloe barbadensis</i> Mill en <i>Escherichia coli</i>	17
4.1.1 Extracción de pulpa (gel)	18
4.1.2 Aislamiento e identificación de <i>Escherichia coli</i>	19
4.1.3 Elaboración de sensidisco	21
4.1.4 Efectos de pulpa en <i>Escherichia coli</i> .	21
5. Resultados	22
6. Discusiones	30
7. Conclusiones	31
8. Recomendaciones	32
9. Bibliografía	33

***Aloe barbadensis* Mill.**

Efectos bactericidas y bacteriostáticos en *Escherichia coli*

Resumen

El descubrimiento de la penicilina como el primer antibiótico por Alexander Fleming, fue sin duda alguna un evento que cambió la historia y el rumbo de la medicina moderna; sin embargo, la resistencia bacteriana, a pesar de ser un proceso evolutivo de la propia terapia contra dichos microorganismos; constituye un fenómeno que ha tomado gran relevancia en los últimos años, a consecuencia del uso indiscriminado de agentes antibióticos, limitando con ello el efecto deseado al reducir su efectividad; por lo cual, es necesario buscar otros agentes que puedan ser utilizados como bactericidas o bacteriostáticos.

Este trabajo está enfocado en los efectos bactericidas y bacteriostáticos del extracto de *Aloe barbadensis* Mill en la bacteria *Escherichia coli*, microorganismo que forma parte de la microbiota intestinal humana; sin embargo, algunas cepas actúan como agentes infecciosos, siendo responsables de diversas enfermedades.

Palabras claves: Antibiótico, bactericida, bacteriostáticos, cepas, *Escherichia coli*.

Justificación

Hoy en día la resistencia a los antibióticos constituye una grave amenaza para la salud a nivel mundial como para la seguridad alimentaria, afectando a personas de cualquier edad, raza o país, a causa del uso indiscriminado de antibióticos, haciendo más difícil el poder tratar enfermedades, como las causadas por la *Escherichia coli*, siendo necesario reevaluar los agentes que son utilizados como bactericidas y bacteriostáticos; y en este proyecto se analizarán las propiedades con las que cuenta *Aloe barbadensis* Mill, con la finalidad de utilizarla como otra opción en el tratamiento contra *Escherichia coli*.



Marco Teórico

1.1 Antibióticos: antecedentes históricos

El uso de agentes antimicrobianos data de 2.500 años de antigüedad, cuando la civilización china utilizó la planta de soja en el tratamiento del carbunco; en la era pre-antibiótica, el control de las enfermedades infecciosas se realizaba mediante medidas de asepsia, uso de desinfectantes, antisépticos y vacunas (Bacteriana, 1999).

El descubrimiento de los antibióticos ha sido uno de los logros más importante y fue en 1929, cuando Alexander Fleming descubre el primer antibiótico: la penicilina. Este tremendo éxito y la esperanza de hacer desaparecer las enfermedades producidas por microbios se ven oscurecidos diez años después por la aparición de las primeras resistencias (Bacteriana, 1999).

Si bien es cierto que la resistencia a los antibióticos es un proceso evolutivo normal; la resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de éstos y no sólo por la presión evolutiva que se ejerce en el uso terapéutico (Sussmann et al, 2001).

1.2 Conceptos básicos

1.2.1 Antibiótico

Se le denomina antibiótico a cualquier sustancia química producida por un microorganismo, utilizada para eliminar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos infecciosos (Fernández, 2015). Considerando que todo antibiótico tiene como propiedad común toxicidad selectiva y se dividen en bactericidas o bacteriostáticos.

1.2.2 Bactericidas

Antibióticos que provocan la muerte del agente infeccioso, por lo cual es un proceso irreversible (Fernández, 2015).

1.2.3 Bacteriostáticos

Antibiótico que bloquea el desarrollo y la multiplicación del agente infeccioso, sin lisis a la bacteria, por lo que su efecto es reversible al retirar dicho antibiótico (Fernández, 2015)

1.2.4 Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana a los antibióticos se define como la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibiótico que inhiben o matan a otras de la misma especie (Alós, 2015). De tal forma que dicha resistencia, ejerce efectos negativos al prolongar las estancias hospitalarias, incrementando costos médicos y generando un elevado aumento de la mortalidad.

1.3 *Aloe barbadensis* Mill

1.3.1 Definición

La planta *Aloe barbadensis* Mill (Figura 1), es una hierba carnosa de 50-70 cm de altura, hojas agrupadas hacia el extremo, con tallos de 30-40 cm de borde espinoso-dentado, químicamente se compone de polisacáridos, glicoproteínas y aminoácidos, constituye una especie de gran importancia en la medicina natural y la industria (Buenfil y Jiménez, 2011).



Figura 1. *Aloe barbadensis* Mill (Ortiz, 2010)



1.3.2 Historia y antecedentes de su uso

El *Aloe barbadensis* Mill es una planta nativa de las zonas tropicales de Asia y África que se conoce desde hace más de 5,000 años, también crece en diversas regiones del Mar Mediterráneo, sus propiedades medicinales y cosmetológicas han sido divulgadas desde los tiempos de los faraones egipcios hace alrededor de 3,000 años antes de cristo, traída al Continente Americano por navegantes europeos en 1492 conocida con el nombre de *Zabaira* (Ortiz, 2010)

El nombre Sábila proviene de la voz árabe "Sabbara" o "Sabaira", que significa amargo, el nombre genérico "Aloe", el cual es empleado a nivel mundial que también significa amargo, a causa del sabor acibarado de la savia de sus hojas. (Schweizer, 1994)

1.3.3 Propiedades químicas

De la corteza verde de sus hojas se extrae una sustancia amarga, resinosa, de color oscuro conocida como acíbar o aloína, su contenido principal es agua, diversas sustancias inorgánicas (Cuadro 1) como: Na, K, Cl, Ca y P; y los principales compuestos orgánicos que contiene son glucosa, proteínas, colesterol, triglicéridos, ácido salicílico, magnesio y zinc (Gage, 1999).

Químicamente (Cuadro 1), el *Aloe barbadensis* Mill se caracteriza por la presencia de constituyentes fenólicos generalmente clasificados en dos principales grupos: las cromonas, como la aloensina y las antraquinonas (libres y glicosiladas) como la barbaloína, isobarbaloína y la aloemodina; estos compuestos se encuentran en la capa interna de las células epidermales. La aloína es un glicósido antraquinónico que le confiere propiedades laxantes al acíbar y se utiliza en preparados farmacéuticos produciendo en ocasiones alergias a personas sensibles (Okamura y col., 1996).



Cuadro 1. Composición química de la planta *Aloe barbadensis* Mill
(Dagne et al, 2000, Choi y Chung, 2003, Ni et al, 2004, Hamman y Viljoen, 2008)

Composición	Compuestos
Antraquinonas	Acido aloético, antranol, acido cinámico, barbaloína, ácido crisofánico, emodina, aloe-emodin, éster de ácido cinámico, aloína, isobarbaloína, antraceno, resistanol.
Vitaminas	Ácido fólico, vitamina B1, colina, vitamina B3, vitamina E, vitamina B6, betacaroteno.
Minerales	Ca, Mg, K, Zn, Na, Cu, Fe, Mn, P, Cr.
Carbohidratos	Celulosa, galactosa, glucosa, xilosa, manosa, arabinosa, aldopentosa, glucomanosa, fructuosa, acemanano, sustancias pépticas, L-ramnosa.
Enzimas	Amilasa, ciclooxidasa, carboxipaptidasa, lipasa, bradikinas, catalasa, oxidasa, fosfatasa alcalina, ciclooxigenasa, superóxido dismutasa.
Lípidos y compuestos orgánicos	Esteroides (campesterol, colesterol, β -sitoesterol), ácido salicílico, sorbato de potasio, triglicéridos, lignina, ácido úrico, saponinas, giberelina, triterpenos.
Aminoácidos	Alanina, ácido aspártico, arginina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, tirosina, treonina, valina.

1.3.4 Usos

Los usos de la planta *Aloe barbadensis* Mill han sido diversos desde la antigüedad abarcando diversas áreas que van desde la industria alimentaria hasta la medicina, este trabajo está enfocado en el área de la medicina, específicamente en su uso como posible bactericida o bacteriostático, por lo que hablaré solo de los usos medicinales:

Dermatología: el *Aloe vera* es una planta de uso frecuente en el tratamiento de algunas enfermedades de la piel y de aplicación frecuente en la cosmetología, formando parte de diversas cremas o geles, usada como antiinflamatorio y reconstituyente del tejido epitelial (Ferraro, 2009).

Antiasmático: la utilidad del *Aloe vera* en el tratamiento del asma bronquial, mediante un jarabe de esta planta a diferentes concentraciones (Rodríguez et al., 2004).

Hipolipemiante: estudios en ratas albinas wistar y conejos han demostrado que el uso del extracto de *Aloe barbadensis* Mill tiene efectos hipolipemiantes reduciendo de forma considerable los niveles séricos de colesterol, triglicéridos, y HDL (Tillan et al, 2008, Valencia y Poquioma, 2017).

Antidiabético: entre sus componentes químicos contiene metabolitos que poseen efectos de regulación de la glucemia (Castro et al, 2014).

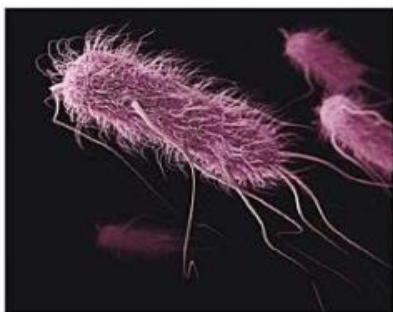
Antimicrobiano: el extracto acuoso de *Aloe barbadensis* Mill posee propiedades bactericidas y bacteriostáticos en diversas bacterias, hongos y levaduras, un ejemplo de ello es su efecto inhibitor sobre el hongo *Aspergillus niger* y la bacteria *Enterococcus faecalis* (Buenfil y Jiménez, 2011, Rojas y rodrigo, 2016).

1.4 *Escherichia coli*

1.4.1 Definición

Aislada y descrita por el pediatra alemán Escherich en 1885, quien demostró su existencia como huésped habitual del intestino, la *Escherichia coli* (Figura 2), forma parte de la familia de *Enterobacteriaceae* componente normal de la microbiota del intestino grueso, definido como un bacilo Gram negativo móvil o inmóvil, anaerobio facultativo; existen 5 cepas patógenas causantes de enfermedades entéricas, las cuales están clasificadas a sus antígenos somáticos (O), capsulares (K), flagelares (H) y fimbriales (F), las cuales les dan características para diferir en su patogenicidad y virulencia (Acha y Szyfres, 2003).

Sin embargo, los antibióticos de tratamiento básico contra *Escherichia coli* van perdiendo eficacia, haciendo necesario la búsqueda de nuevas alternativas que



sean capaces de frenar su desarrollo y al mismo tiempo la eliminen de como agente causal de enfermedad.

Figura 2. *Escherichia coli*, imagen obtenida de microscopio electrónico de barrido (Montes et al, 2018)

1.4.2 Morfología

Se trata de un bacilo (forma de bastón), Gram -, móvil ante la presencia de flagelos peritricos, la cubierta de *Escherichia coli* consta de 3 elementos: la membrana citoplasmática, en esta se encuentran el citoplasma, los ribosomas y el nucleoide; la membrana externa y entre ambas, un espacio periplásmico constituido por péptido-glucano, esta última estructura confiere a la bacteria su forma y rigidez, y le permite resistir presiones osmóticas ambientales relativamente elevadas, (Montes et al., 2018).

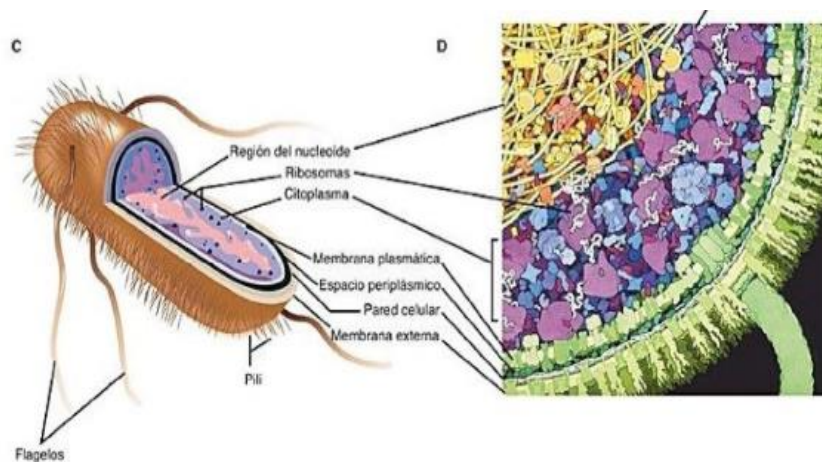


Figura 3. Morfología de la bacteria *Escherichia coli* (Montes et al, 2018).

1.4.3 Características bioquímicas

La *Escherichia coli* es capaz de producir indol a partir de triptófano, no utiliza el citrato como fuente de carbono y no produce acetoina, fermenta la glucosa y la lactosa con producción de gas, es una bacteria mesófila, su óptimo de desarrollo se encuentra entre los 35-43 °C, a un pH de 4.0 - 9.0 , es catalasa positiva, y oxidasa negativa, reducen nitratos a nitritos, y ayudan al cuerpo humano en la producción de vitamina B y K (Granados y Villaverde, 2003).

1.4.4 Enfermedades que causa

A pesar de ser uno de los habitantes comunes y principales del tracto digestivo humano, la *Escherichia coli* puede ser causante de infecciones urinarias, algunas cepas causan la llamada diarrea del viajero y puede ser causante de infecciones de la zona orofaríngea o de heridas en la piel en donde la bacteria actúa de forma oportunista; sin embargo al ser transmitida por contaminación fecal a través del agua y/o alimentos puede ocasionar enfermedades graves transmitidas por las 2 vías mencionadas (Tórtola et al., 2007).

1.4.5 Aislamiento e identificación

Para una rápida identificación bacteriana en este caso particular *Escherichia coli* se inicia con una tinción de Gram directa de la muestra biológica en cuestión (orina, heces, mucosa bucal, etc.), posteriormente se aísla mediante la siembra de las muestras biológicas en medios de cultivo específicos (EMB, MacConkey), y finalmente una vez desarrolladas las colonias se realizan diversas pruebas bioquímicas como indol, oxidasa, lactosa, etc (Figura 4), para asegurar la identificación de la enterobacteria *Escherichia coli* (Anderson y Calderón, 1999).

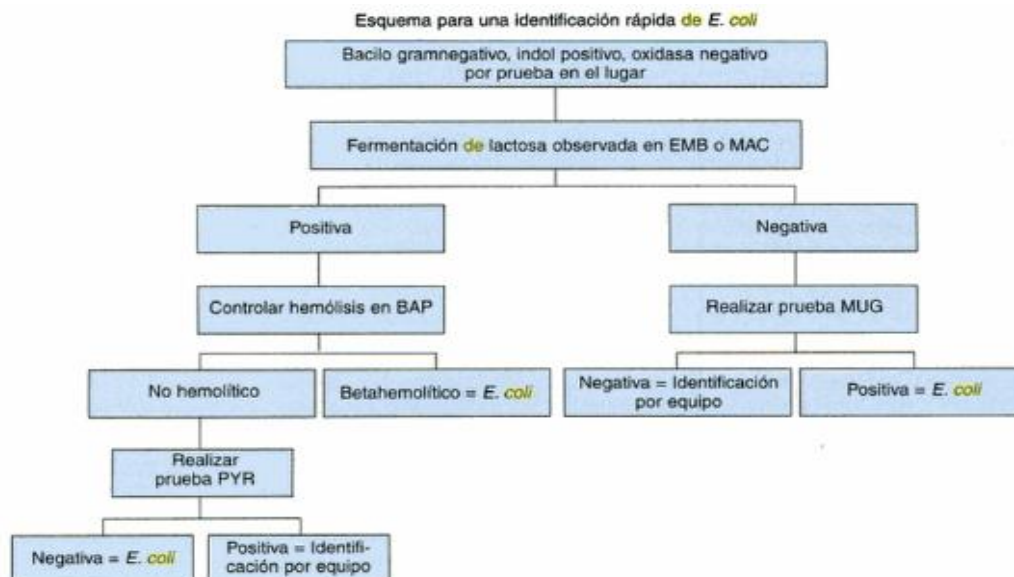


Figura 4. Esquema para la identificación rápida de *Escherichia coli* (Koneman y Allen, 2008)

1.4.6 Requerimientos nutricionales

Esta bacteria no es exigente en cuanto a sus requerimientos nutricionales, y son fácil de desarrollar, fermenta glucosa y lactosa con producción de gas, es anaerobio facultativo (Granados y Villaverde, 2003).

1.4.7 Medios de cultivo (desarrollo y crecimiento)

De acuerdo con las características nutricionales de la bacteria *Escherichia coli* que son simples al solo requerir glucosa y lactosa, los medios de cultivo de uso para su desarrollo e identificación morfológica son: EMB, MacConkey; posteriormente para evaluar el efecto del extracto de *Aloe vera* utilizaremos el medio de cultivo Mueller Hilton.

EMB: El Agar con Eosina y Azul de Metileno es una combinación del medio de Levine y el de Holt-Harris y Teague, contiene una mezcla de peptonas según Levine y presenta dos carbohidratos lactosa y sacarosa, este medio de cultivo permite una diferenciación muy clara entre las colonias de organismos fermentadores de lactosa y aquellos que no la fermentan; el contenido de eosina y azul de metileno inhibe en cierto grado organismos Gram (+). Las colonias lactosa positiva son azules a moradas con brillo metálico o poseen centros oscuros con periferias transparentes incoloras y las que son negativas en lactosa o sacarosa, se observan incoloras o rosa pálido transparentes (Probiotek, 2017).

Las colonias de *Escherichia coli* en agar E.M.B. (Figura 5) tienen 2 a 4 mm de diámetro, un centro grande de color oscuro e incluso negro, y tienen brillo verde metálico cuando se observan con luz refleja (Anderson y Calderón, 1999).

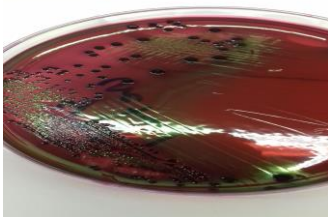


Figura 5. Características coloniales de *Escherichia coli* (Autoría propia)

MacConkey: Las sales biliares y el cristal violeta inhiben el crecimiento de gérmenes Gram (+), la lactosa y el indicador de pH rojo neutro, permiten la diferenciación de las bacterias lactosa positiva (colonias rosa intenso con halo de precipitación), de las no fermentadoras (colonias transparentes o ámbar), sembrar el medio de cultivo con la muestra problema por estría cruzada, las colonias de *Escherichia coli* (Figura 6), son colonias grandes, que van de rosa intenso hasta rojo con halo turbio de precipitación. (Probiotek, 2017).

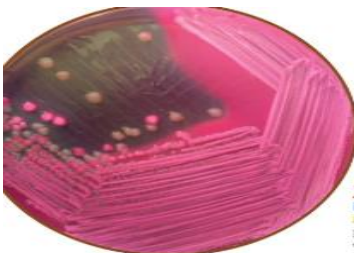


Figura 6. Colonias de *Escherichia coli* en Agar MacConkey (Leboffe & Pierce, 2012)

Mueller Hinton: Se trata de un medio universal utilizado para realizar la prueba de sensibilidad antimicrobiana, que nos permitirá determinar la inhibición de crecimiento bacteriano (Figura 7) según el antibiótico utilizado, determinando si es efectivo o no contra dicho microorganismo.



Figura 7. Agar Mueller Hinton para análisis de sensibilidad microbiana, recuperado de: <https://mdmcientifica.com/agar-mueller-hinton-medio-de-cultivo/>



1.4.8 Pruebas bioquímicas

Son una serie de pruebas que nos permiten determinar la actividad metabólica de una cepa pura, empleadas principalmente para la identificación y clasificación de bacterias y hongos; existen diversas y estas varían de acuerdo con el microorganismo en cuestión van desde indol, descarboxilasa, SH₂, ureasa, oxidación, fermentación, movilidad, RM, VP, fenilalanina (García et al, 1994).

En el caso de la *Escherichia coli* a continuación se describe (cuadro 2) la reacción de dicha bacteria hacia las pruebas bioquímicas para su identificación positiva (Rojas et al., 2006).

Cuadro 2. Reacción de *Escherichia coli* en las diversas pruebas bioquímicas para su identificación positiva.

Prueba bioquímica	Resultado
TSI (fermentar carbohidratos, de producir H ₂ S y producir gas).	Negativo, positivo 1% de cepas
ONPG (orto-nitrofenil-β-galactopiranosido)	Positivo
Movilidad (movilidad para bacilos fermentadores)	Positiva en un 95%
Gelatinasa (producción de enzima gelatinasa)	Negativa
RM (rojo de metilo, producción de ácidos a partir de glucosa)	Positiva en un 99%
VP (Voges-Proskauer, para detectar producción de acetoina)	Negativa
Fenilalanina desaminasa	Negativa
Indol	Positivo en 98%

2. Hipótesis

El uso del extracto de la planta *Aloe barbadensis Mill*, será efectivo como tratamiento alternativo contra el agente infeccioso *Escherichia coli*.

3. Objetivos

3.1 Objetivos generales

Analizar el efecto que ejerce el extracto de *Aloe barbadensis Mill* en colonias de *Escherichia coli*, como probable agente bactericida o bacteriostático.

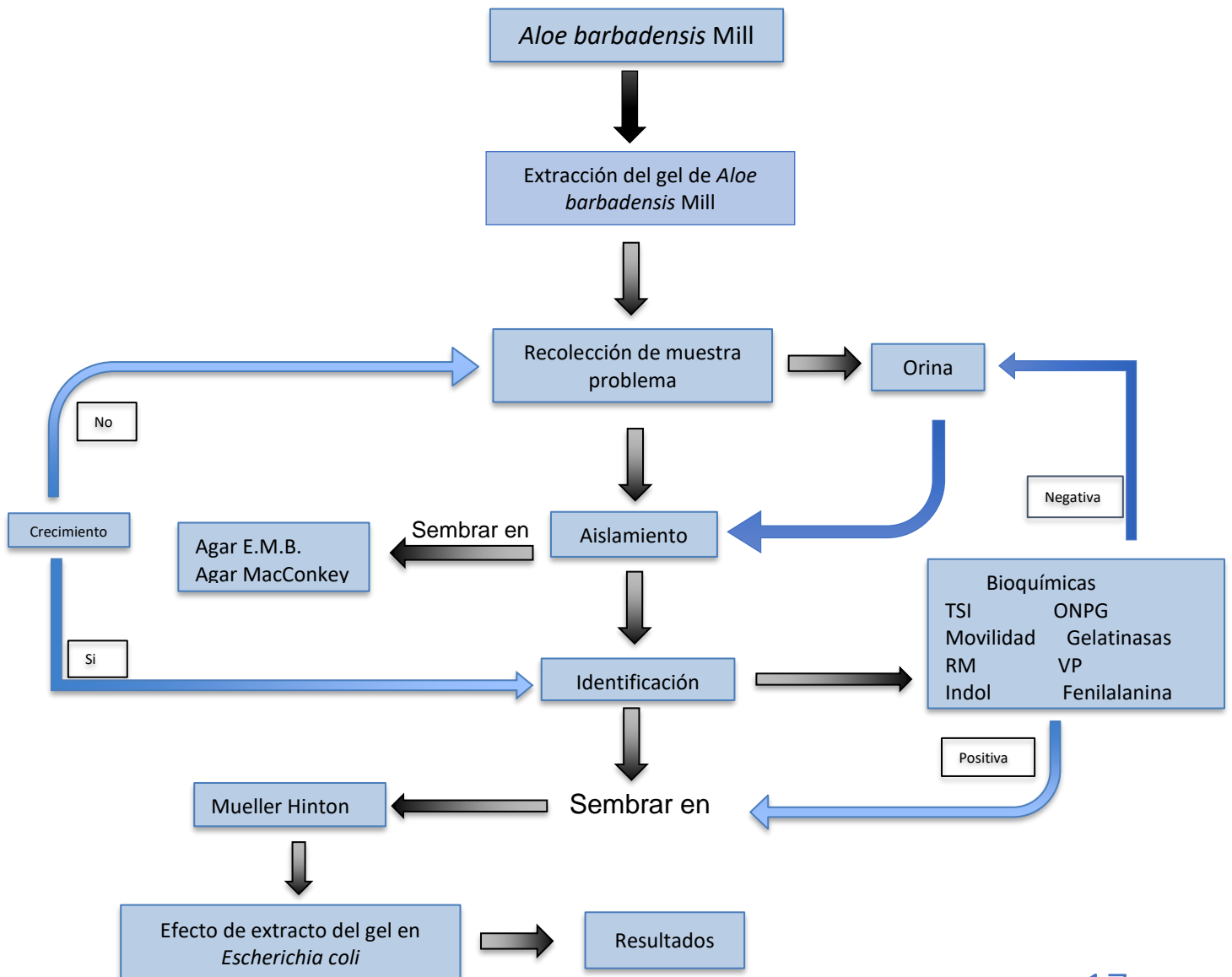
3.2 Objetivos particulares

- Sembrar muestras biológicas para desarrollo bacteriano.
- Identificar colonias de bacteria *Escherichia coli*.
- Extraer la pulpa de *Aloe barbadensis Mill*.
- Determinar efectos bactericidas y/o bacteriostáticos de *Aloe barbadensis Mill* en bacteria *Escherichia coli*.
- Descubrir nuevo tratamiento alternativo contra *Escherichia coli*.

4. Metodología

4.1 Efectos de extracto de *Aloe barbadensis* Mill en *Escherichia coli*

La presente investigación está caracterizada por la extracción de los principios activos del *Aloe barbadensis* Mill para la elaboración de un gel con posibles efectos bactericidas o bacteriostáticos para ser usado como posible tratamiento en las infecciones causadas por la bacteria *Escherichia coli*.



4.1.1 Extracción de pulpa (gel)

FUNDAMENTO.

Para extraer de forma correcta el gel de acuerdo con Chunga (2015), es necesario procesarlo de forma directa de la penca de sábila con un cuchillo de modo que obtengamos el cristal de sábila y que no se vean deterioradas sus cualidades, siendo licuada o procesada con aspa o cuchilla ya que el objetivo fundamental es aprovechar al máximo sus nutrientes y bondades.

MATERIALES

Penca de sábila, cuchillo, agua destilada, tabla de madera, guantes.

PROCEDIMIENTO (Chunga, 2015)

La planta debe estar madura, cerca de los 3 años o en su primera floración, debemos cortar la penca por la parte más baja de la planta, para no dañarla y lavarla muy bien con agua corriente, dividimos la penca en trozos grandes (3 ó 4) de acuerdo al tamaño; poner agua a tibia ($25 - 30^{\circ} \text{C}$) donde colocaremos los trozos durante 10-15 minutos para detener el yodado de la planta, sacar y secar los trozos quitando a cada uno las orillas espinosas, ponemos en vertical el trozo de la penca y realizar un corte transversal por una de las caras de la sábila dejando el gel al descubierto; raspar con un cuchillo o navaja para extraer el gel que será utilizado, el cual vamos a moler utilizando una licuadora y lo filtramos para obtener extracto del gel; finalmente preparamos soluciones acuosas con el extracto obtenido al 25%, 50%, 75% y 100% en agua destilada, las mantendremos en refrigeración, para su uso posterior.

4.1.2 Aislamiento e identificación de *Escherichia coli*

Aislamiento

Al formar parte de la microbiota intestinal, aislaré la bacteria *Escherichia coli* de muestras biológicas de orina y heces fecales.

Procedimiento

- Material y equipos

Frascos estériles, asas bacteriológicas calibradas, mechero, incubadora, guantes, cubrebocas, cajas Petri, EMB, MacConkey, Mueller Hinton, tinción de Gram, tubos con pruebas bioquímicas.

- Recolección de muestras (Lynch et al, 1977):

Orina: depositar la muestra de orina en un frasco estéril, siendo esta la primera del día o en su defecto tener la vejiga llena durante 4 horas, desechar el primer chorro de orina y a partir del segundo chorro depositarla en el frasco hasta la mitad de este, etiquetar y sembrar.

Heces fecales: colocar un poco de muestra fecal dentro del frasco estéril, etiquetar y sembrar.

- Siembra de muestras

Medios de cultivo utilizados

Agar E.M.B

Agar MacConkey

Agar Mueller Hinton

Utilizaremos el método clásico en placas de Petri, sembradas con asas de platino calibradas, que me permite recuento y aislamiento, para posteriormente mediante pruebas bioquímicas y tinción de Gram realizar la identificación positiva de *Escherichia coli*.

- Método (Lynch et al, 1977)

Acercar material a utilizar: muestra problema (orina y heces), cajas Petri con agar E.M.B y MacConkey, asas bacteriológicas, mechero, guantes y cubrebocas.

Procedimiento: encender el mechero, tomar muestra con el asa bacteriológica (orina y heces) e inocular el agar E.M.B y MacConkey con una línea central por todo el diámetro de la placa (Figura 8) y realizar las estrías por todo el medio (Figura 9), incubar por 24 horas a 37°C, observar si hubo desarrollo bacteriano y analizar características coloniales del desarrollo obtenido (tamaño, textura y color).



Figura 8. Inoculación de cultivo (Autoría propia).

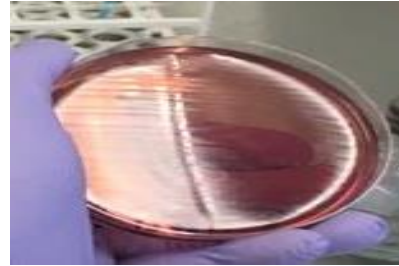


Figura 9. Siembra del medio mediante estrías (Autoría propia).

Identificación

Tinción de Gram

Realizar frotis y teñir con tinción de Gram para identificar y clasificar a nuestra bacteria desarrollada en los cultivos, para esto obtenemos un poco de muestra de una colonia con un asa y la colocamos en un portaobjetos, fijamos la muestra con metanol y la dejamos secar; colocamos sobre la placa 3 gotas de cristal violeta durante un minuto y enjuagamos con agua corriente, agregamos lugol por 30 segundos y decoloramos con alcohol-acetona, finalmente añadimos 4 gotas de safranina durante 40 segundos y enjuagamos con agua corriente; dejamos secar y observamos al microscopio (100x).

Interpretación

Gram (+): bacterias teñidas de azul o violeta.

Gram (-): bacteria teñidas de color rojo o rosas

Pruebas bioquímicas

Se analizará la actividad metabólica de las cepas obtenidas de *Escherichia coli* mediante las siguientes pruebas bioquímicas (cuadro 3) para su plena identificación.

Cuadro 3. Pruebas bioquímicas realizadas a *Escherichia coli* para su identificación (Rojas et al, 2006).

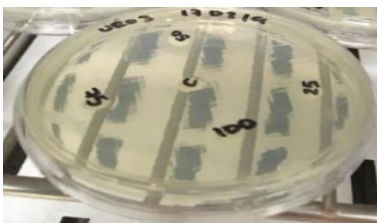
Prueba bioquímica	Resultado
TSI (fermentar carbohidratos, de producir H ₂ S y producir gas).	
ONPG (orto-nitrofenil-β-galactopiranosido)	
Movilidad (movilidad para bacilos fermentadores)	
Gelatinasa (producción de enzima gelatinasa)	
RM (rojo de metilo, producción de ácidos a partir de glucosa)	
VP (Voges-Proskauer, para detectar producción de acetoína)	
Fenilalanina desaminasa	
Indol	

4.1.3 Elaboración de sensidisco

Para su elaboración utilizamos papel filtro No.4 y una perforadora de 6 mm de diámetro, una vez realizados son esterilizados utilizando la estufa de esterilización, posteriormente los discos se impregnan con las diluciones realizadas del extracto del gel del *Aloe vera* (10 µ/disco) y los dejamos que absorban durante 1- 2 horas.

4.1.4 Efectos de pulpa en *Escherichia coli*

Identificada la bacteria *Escherichia coli*, realizaremos pruebas experimentales con el extracto preparado de la siguiente forma: tomaremos con un asa una colonia que será sembrada en medio de cultivo Mueller Hinton, colocaremos los sensidiscos elaborados (extracto del *Aloe barbadensis* Mill), incubamos por 24 horas a 37°C y



analizamos su efecto en las cepas sembrada mediante la presencia de halos de inhibición.

Figura 10. Resiembra en Inoculación de cultivo (Autoría propia).

5. Resultados

Desarrollo bacteriano en 17 cultivos

Se recibieron y analizaron 22 muestras biológicas (Figura 11), siendo 15 de orina y 7 de heces fecales (grafico 1), las cuales fueron sembradas en medios de cultivo agar MacConkey y E.M.B (Figura 11) e incubadas durante 24 horas a 37°C, obteniendo desarrollo bacteriano en 17 siembras (grafico 2).

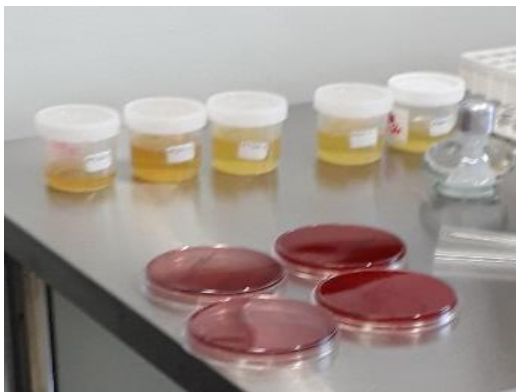
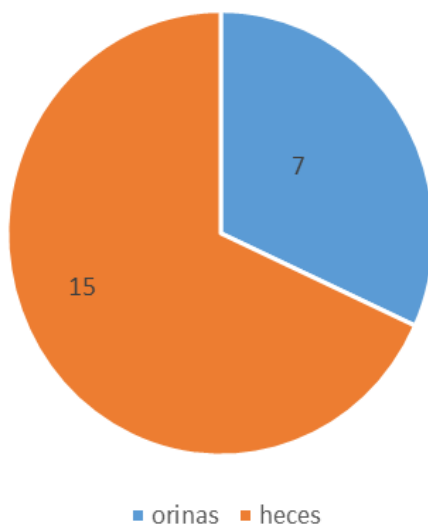


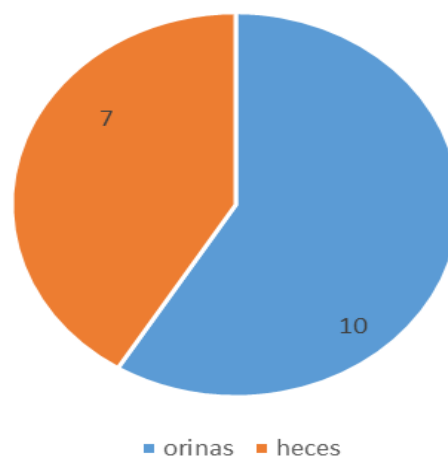
Figura 11. Muestras biológicas analizadas de orina y heces fecales, sembradas en medios de cultivo MacConkey y E.M.B (Autoría propia).

Muestras analizadas



Gráfica 1. Muestras biológicas analizadas, un total de 22 muestras: 15 muestras urinarias (color naranja) y 7 de heces fecales (color azul) (Autoría propia).

Cultivos positivos



Gráfica 2. 17 cultivos positivos, 7 de muestras de heces (color naranja) y 10 de orina (color azul). (Fuente propia).

Identificación de 15 cepas de *Escherichia coli*

Tras un periodo de incubación de 24 horas a 37° C el proceso de identificación se realizó primero, de forma macroscópica observando la cantidad de colonias desarrolladas en cada placa siendo >100,000 UFC en cada una; después, se analizaron las características coloniales en los medios de cultivo utilizados: E.M.B (Figura 12) y MacConkey (Figura 13); posteriormente, a cada uno de los 17 cultivos positivos, se les realizó un frotis, que fue teñido con la tinción de Gram (Figura 14), identificando 17 bacilos gramnegativos (Figura 15).



Figura 12. Características coloniales de *Escherichia coli* en agar E.M.B (circulo azul), diámetro de 2-4 mm, centro grande de color oscuro o negro y tienen brillo verde metálico, cada colonia corresponde a 1,000 UFC/mL (Autoría propia).



Figura 13. Características coloniales de *Escherichia coli* en agar MacConkey (circulo azul), colonias grandes, que van de rosa intenso hasta rojo con halo turbio de precipitación, cada colonia corresponde a 1,000 UFC/mL (Autoría propia).



Figura 14. Frotis teñido de una colonia bacteriana de *Escherichia coli*, con la tinción de Gram (Autoría propia).



Figura 15. Bacilos Gram negativos (color rojo) observados al microscopio a 100x (Autoría propia).



Pruebas bioquímicas

La identificación definitiva de *Escherichia coli* se realizó con pruebas bioquímicas en equipo VITEK® 2 Compact, obteniendo los siguientes resultados (cuadro 4; graficas 3-10), 15 bacilos de *Escherichia coli* y 2 bacilos pertenecientes a otras enterobacterias (*Proteus*).

Las pruebas bioquímicas nos permiten determinar las características metabólicas de las bacterias con la finalidad de poder identificarlas de forma correcta.

Las pruebas que realizamos son:

TSI: estudia el uso de la glucosa y lactosa, la producción de gas y ácido sulfhídrico (como producto metabólico final de los aminoácidos azufrados).

ONPG: nos permite determinar si dicho microorganismo fermenta lactosa.

Movilidad: mediante una siembra en picadura, y después de incubar 24 h. observaremos desarrollo entorno a la zona inoculada, lo que nos dirá si dicho microorganismo es móvil o no.

Gelatinasa: analizamos la capacidad proteolítica (la capacidad de degradación de proteínas) del microorganismo.

Rojo de metilo (RM): es un indicador de pH, que actúa entre un pH 4,2 y 6,3 variando desde rojo hasta amarillo; con esta prueba determinamos la capacidad de un microorganismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación ácido-mixta.

Voges-Proskauer: permite observar si el microorganismo fermenta la glucosa por la vía butanodiólica.

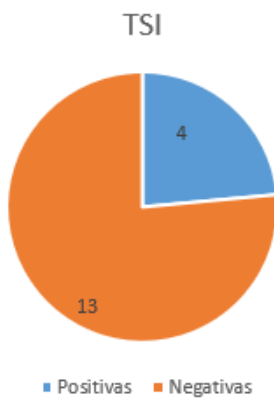
Fenilalanina: determina la capacidad de la bacteria para desaminar el aminoácido fenilalanina en ácido fenilpirúvico por acción de la enzima Fenilalanina desaminasa, produciendo una acidificación del medio.

Indol: Nos permite identificar la liberación de Indol en un cultivo bacteriano, debida a la degradación del aminoácido triptófano mediante la enzima triptófanoasa.

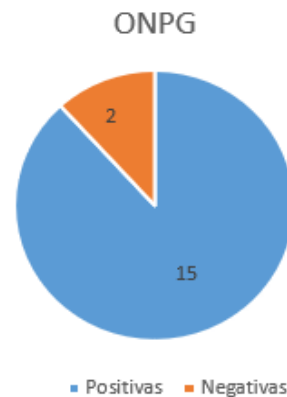
Cuadro 4. Resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas realizadas a *Escherichia coli* para su identificación (Autoría propia)

Prueba bioquímica (17 bacterias)	Resultado
TSI (fermentar carbohidratos, de producir H ₂ S y producir gas).	4 cepas positivas, 13 cepas negativas
ONPG (orto-nitrofenil-β-galactopiranosido)	15 cepas positivas, 2 cepas negativas
Movilidad (movilidad para bacilos fermentadores)	15 cepas positivas, 2 cepa negativa
Gelatinasa (producción de enzima gelatinasa)	17 cepas negativas
RM (rojo de metilo, producción de ácidos a partir de glucosa)	17 cepas positivas
VP (Voges-Proskauer, para detectar producción de acetoína)	17 cepas negativas
Fenilalanina desaminasa	15 cepas negativas, 2 cepas positivas
Indol	12 cepas positivas, 5 cepas negativas

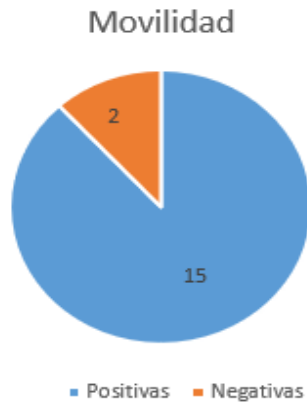
Representación grafica de los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas



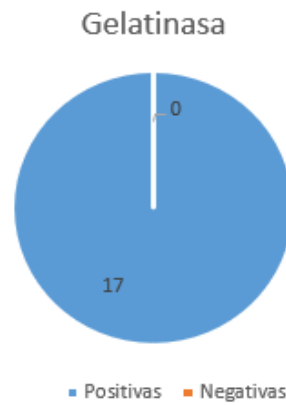
Grafica 3. Prueba TSI a 17 cepas; resultando 4 cepas positivas (azul) y 13 negativas (naranja). Esto nos indica que 4 cepas fermentan carbohidratos y producen H₂S y gas.



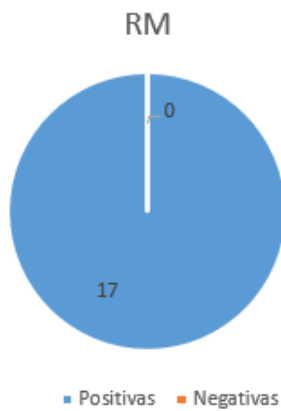
Grafica 4. Prueba ONPG, resultando 2 cepas positivo (azul) y 15 negativas (naranja). Solo 2 cepas fermentan lactosa.



Grafica 5. Movilidad (17 cepas), 15 móviles (azul) y 2 inmóviles (naranja). Indicando que 15 cepas son móviles.



Gráfica 6. Gelatinasa, las 17 cepas fueron negativas, lo que nos indica que ninguna cepa tiene capacidad proteolítica (no degradan proteínas)

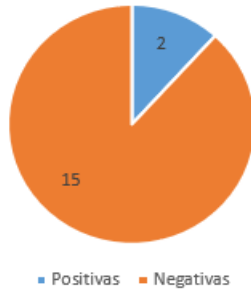


Grafica 7. Rojo de metilo, las 17 cepas fueron positivas (azul); indicando que pueden producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación ácido-mixta



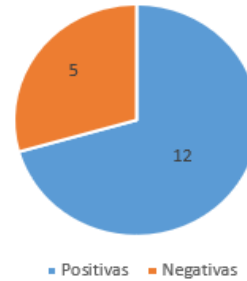
Grafica 8. Voges-Proskauer, las 17 cepas fueron negativas (naranja). Ninguna fermenta glucosa por vía butanodiólica

Fenilalanina desaminasa



Grafica 9. Fenilalanina 15 cepas negativas (naranja) 2 positivas (azul). Lo cual significa que solo 2 cepas producen la enzima Fenilalanina desaminasa, y acidifican el medio utilizado.

Indol



Grafica 10. Indol, 12 cepas positivas (azul) y 5 cepas negativas (naranja). 12 cepas producen la enzima triptófano.

Se obtuvieron 10 ml de extracto del gel del *Aloe barbadensis* Mill

Para la extracción del gel del *Aloe barbadensis* Mill se utilizaron 3 pencas de una planta en su primera floración que tras su tratamiento y licuado adecuado se obtuvieron 10 ml de su gel (Figura 16), se prepararon 4 diferentes diluciones al 25%, 50%, 75% y 100% (Figura 17), para preparar 60 sensidiscos (15 de cada concentración) para su uso como antibiograma.



Figura 16. Se obtuvieron 10 ml de gel de *Aloe barbadensis* Mill de 3 pencas de la planta (Autoría propia).

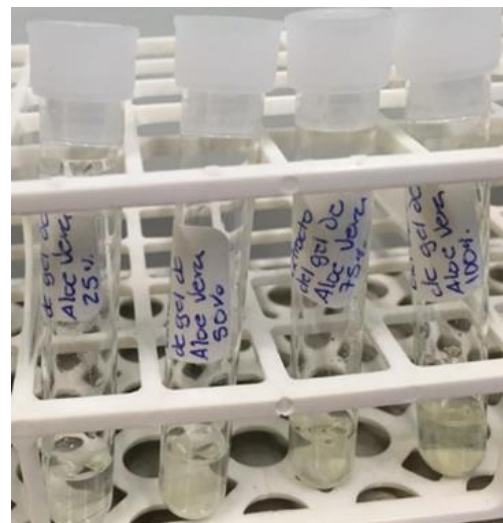


Figura 17. Se muestran las 4 diluciones realizadas con el extracto del gel de *Aloe barbadensis*, para la preparación de los sensidiscos Mill (Autoría propia)

***Escherichia coli* no presentó sensibilidad al extracto de *Aloe barbadensis* Mill.**

Una vez aislada e identificada de forma positiva la bacteria *Escherichia coli*, se realizaron las resiembras en 15 medios de cultivo Mueller Hilton a los cuales se les colocaron los sensidiscos (4 de cada concentración utilizada y 1 de control al centro de la placa); y después, de 24 horas de incubación analizamos los resultados obtenidos. Como podemos observar en la figura 17, el extracto del gel del *Aloe barbadensis* Mill no tuvo efecto (no hubo halos de inhibición, círculos verdes) sobre ninguna de las 15 cepas de *Escherichia coli*; en la imagen 18 podemos observar la reacción de la bacteria frente a un sensidisco de antibióticos comunes (círculos azules).

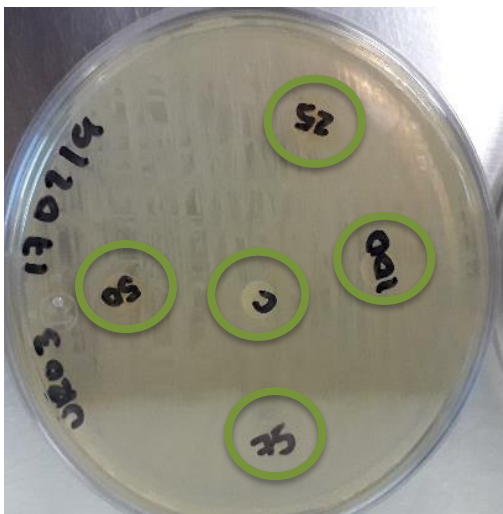


Figura 17. La *Escherichia coli* no presentó ningún halo inhibitorio frente a los sensidiscos con *Aloe barbadensis* Mill, los círculos verdes muestran que la bacteria se desarrolló en toda la placa (Autoría propia).



Figura 18. Sensibilidad de *Escherichia coli* frente a antibióticos comunes; podemos observar en los círculos azules el halo inhibitorio frente a GM (Gentamicina), AT (Aztreonam) y AK (Amikacina), mientras que el círculo naranja muestra algunos antibióticos en los que no hubo sensibilidad por ausencia de halo inhibitorio (Autoría propia)

Tratamiento alternativo contra *Escherichia coli* descartado.

Después de haber identificado 15 cepas de *Escherichia coli* y probar su reacción al extracto obtenido de la planta *Aloe barbadensis* Mill en sus 4 diferentes concentraciones, podemos determinar que este no puede utilizarse como posible tratamiento alternativo.



6. Discusión

El principal componente del gel de *Aloe vera* son los compuestos fenólicos (antraquinonas) con propiedades fúngicas y bactericidas que en estudios previos como el de Cabello et al. (2015) ha mostrado actividad inhibitoria del crecimiento contra *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*; mientras que Scarpati y Montero (2015), mostraron que el uso de las cremas dentales con *Aloe vera* tiene efecto antibacterial sobre *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*. Sin embargo, solo ha sido probado en bacterias Gram positivas y hongos, por lo que este estudio pretendía probar su actividad en la *Escherichia coli* un bacilo Gram negativo, resultando ineficaz a causa de sus características celulares, metabólicas y los mecanismos de defensa (inactivación enzimática, alteraciones en el sitio blanco y alteraciones de la permeabilidad) con los que cuenta, los cuales limitaron su actividad inhibitoria de su crecimiento.

En cuanto a la extracción del gel de la planta *Aloe barbadensis* Mill, nuestro procedimiento fue de forma directa como lo hizo en su estudio Chunga (2015); sin embargo, en estudios previos realizados por Domínguez et al (2012) existen otros métodos para la obtención del gel utilizando calor o frío en el proceso siendo más efectivo en frío; finalmente, para la preparación de los sensibilizados para Buenfil y Jiménez (2011) resulto mas efectivo utilizar como solvente para la dilución, etanol y no agua destilada como en nuestro estudio así mismo dejar macerando durante 24 horas las hojas del Aloe para posteriormente licuarlas e iniciar el procedimiento.

Por lo tanto, surgen 2 hipótesis:

- 1) El gel diluido con etanol será efectivo como bactericida o bacteriostático
- 2) Macerar las hojas del *Aloe Barbadensis* Mill durante 24 horas en etanol hará más efectivo su efecto.

7. Conclusiones

Se sembraron 22 muestras (orina y heces) de las cuales 17 resultaron positivas a desarrollo bacteriano y 15 de ellas con identificación positiva a el bacilo Gram (-) *Escherichia coli*, se logró la extracción del gel del *Aloe barbadensis* Mill y se prepararon sensidiscos a diferentes concentraciones de este, para finalmente probar su efecto sobre la bacteria *Escherichia coli*, obteniendo resultados no satisfactorios, por lo cual se puede concluir que:

- La orina es una fuente biológica con desarrollo bacteriano diverso.
- Pudimos aislar *Escherichia coli* de muestras urinarias en el 90% de los casos.
- La extracción del gel del *Aloe barbadensis* Mill es un proceso corto y sencillo.
- *Aloe barbadensis* Mill no ejerce ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la bacteria *Escherichia coli*.
- *Aloe barbadensis* Mill no puede ser usado como tratamiento contra la bacteria *Escherichia coli*.



8. Recomendaciones

De acuerdo con el proceso realizado y comparado con los autores de referencia que utilizamos se recomienda lo siguiente:

- a) Utilizar un solvente diferente al agua para hacer las diluciones del extracto de gel (alcohol o metanol)
- b) Macerar las hojas de la planta durante 24 horas antes de ser licuadas utilizando alcohol o metanol.
- c) Utilizar otras especies de Aloe para probar sus propiedades bactericidas y fúngicas (existen mínimo otras 3 especies con dichas propiedades).



9. Bibliografías

- Acha, P. N., & Szyfres, B. (2003). Zoonoses and communicable diseases common to man and animals (Vol. 580). Pan American Health Org.
- Alós, J. I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 33(10), 692-699.
- Anderson, M. D. R. P., & Calderón, V. (1999). Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. Ediciones Diaz de Santos.
- Bacteriana, M. D. R. (1999). Resistencias a antibióticos en nuestro medio. *Visión global del problema. Bol Pediatra*, 39, 243-247.
- Buenfil, M. N. C., & Jiménez, M. B. (2011). *Aloe vera*: agente antimicrobiano.
- Cabello Ruiz, Ethel Daniela, Molina Salinas, Gloria María, Torres de la Cruz, Víctor Manuel, Núñez González, María Adriana, Oranday Cárdenas, Azucena, Verde Star, María Julia, Martínez de Villarreal, Laura Elia, & Rivas Morales, Catalina. (2015). Actividad antimicrobiana del extracto proteico de hojas de *Aloe vera*. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 46(1), 41-46.
- Castro Juárez, C. J., Villa Ruano, N., Ramírez García, S. A., & Mosso González, C. (2014). Uso medicinal de plantas antidiabéticas en el legado etnobotánico oaxaqueño. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(1), 101-120.
- Choi, S. y Chung, M. (2003). A review on the relationship between Aloe vera components and their biologic effects. *Seminars in Integrative Medicine* 1, 53-62.
- Chunga Mejía, A. M. (2015). Determinación de la acción antimicótica in vitro de un gel elaborado a partir del aloe vera y perseá americana en la Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Químicas. Guayaquil, 2014 (Bachelor's thesis, Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Químicas).



- Dagne, E., Bisrat, D., Viljoen, A. y Van Wyk, BE. (2000). Chemistry of aloe species. *Current Organic Chemistry* 4, 1055-1078.
- Domínguez-Fernández, R.N., Arzate-Vázquez, I., Chanona-Pérez, J. J., Welti-Chanes, J. S., Alvarado-González, J. S., Calderón-Domínguez, G., Garibay-Febles, V., & Gutiérrez-López, G. F. (2012). El gel de Aloe vera: estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(1), 23-43.
- Fernández, P. L. (2015). *Velázquez, farmacología básica y clínica*. panamericana.
- Ferraro, G. M. (2009). Revisión de la *Aloe vera* (Barbadensis Miller) en la dermatología actual. *Revista argentina de dermatología*, 90(4), 00-00.
- Gage, D. (1999). La sábila: Suavizante y curativo natural. Inner Traditions/Bear & Co.
- García, P., Fernández, M., & Paredes, F. (1994). Microbiología clínica práctica. Servicio de publicaciones Universidad de Cádiz, Cádiz.
- Granados, R., & Villaverde, M. C. (2003). microbiología. Bacteriología. Características y clasificación bacteriana. Paraninfo Editorial, Madrid-España, 79-82.
- Hamman, J.H. y Viljoen, A.M. (2008). Use of *Aloe vera* for increasing the bioavailability of poorly absorbable drugs. SA patent application 2008/01542.
- Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas. Ed. Médica Panamericana.
- Leboffe, M. J., & Pierce, B. E. (2012). A photographic atlas for the microbiology laboratory. Morton Publishing Company.
- Lynch, M., Raphael, S., Mellor, L., Spare, P., Inwood, M. (1977). Métodos de laboratorio Volumen 1 y 2. México: Interamericana.



- Montes, F. M., Vázquez, J. P. P., & Rosas, H. R. (2018). Bioquímica de Laguna y Piña. Manual Moderno.
- Ni, Y., Turner, D., Yates, K. y Tizard, I. (2004). Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. *International Immunopharmacology* 4, 1745-1755.
- Okamura, M., Asaia, M., Hine, N. y Yagi, A. (1996). High performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in Aloe species. *Journal Chromatographic A* 747, 225-231.
- Ortiz, J. L. (2010). *Aloe Vera: La Planta del Futuro: Sábila*. AuthorHouse.
- Probiotek (2017). Agar con eosina y azul de metileno. Recuperado de: <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/medios-de-cultivo-reactivos/agar-con-eosina-y-azul-de-metileno-emb/>
- Rodríguez Rivas, M., Hernández Parets, M., Arias Gallardo, A. I., López Guerra, R. L., & Martínez Chaviano, Y. (2004). Acción antiasmática del Aloe vera en pacientes. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 9(1), 0-0.
- Rojas, C., & Rodrigo, L. (2016). Eficacia antibacteriana in vitro del gel natural de *Aloe Barbadosensis*, Clorhexidina e hidróxido de Calcio sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
- Rojas N, Chaves E, García F (2006) Bacteriología Diagnóstica, Costa Rica, Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología.
- Scarpati, E., & Montero, M. (2015). Efecto del *Aloe vera* sobre los microorganismos cariogénicos. *Acta odontológica venezolana*, 53(4), 125-126.
- Schweizer, M. (1994). *Aloe vera. La planta que cura*. APB, Paris.
- Sussmann, O., Mattos, L., & Restrepo, A. (2001). Resistencia bacteriana. Hospital Universitario San Ignacio. Unidad de Infectología. Bogotá–Colombia, 43(1), 91.



- Tillán Capó, J., Fernández Nieves, M., Menéndez Castillo, R., Carrillo Domínguez, C., & Pérez González, D. (2008). Efecto del extracto acuoso de *Aloe vera* (L.) NL Burm. sobre indicadores lipídicos de suero de conejo. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 13(4), 0-0.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Ed. Médica Panamericana.
- Valencia, E. F., & Poquioma, V. (2017). Acción biológica de *Aloe vera* (*Aloe Barbadensis* Miller) sobre el perfil lipídico en ratas albinas wistar. *Biotempo*, 13, 20-28.