



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

U. N. A. M. FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN CUAUTITLAN



Departamento de Exámenes Profesionales

Efecto de Caléndula officinalis en Pseudomonas aeruginosa evidenciado por microscopia electrónica.

T E S I S QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA P R E S E N T A : MARIA DE LOS ANGELES MORALES SANCHEZ

ASESORES: M.V.Z. GERARDO CRUZ JIMENEZ, M.V.Z. JOSE A. LICEA VEGA, M. EN C. SOFIA GONZALEZ GALLARDO, PH D. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Efecto de Caléndula officinalis en Pseudomonas aeruginosa  
evidenciado por microscopia electrónica.

que presenta la pasante: María de los Angeles Morales Sánchez  
con número de cuenta: 8414439-7 para obtener el título de:  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de Noviembre de 2001

PRESIDENTE	<u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
VOCAL	<u>Q. Mario A. Morales Delgado</u>	<u>Mario A. Morales D.</u>
SECRETARIO	<u>Dra. Susana E. Mendoza Elvira</u>	<u>Susana E. Mendoza Elvira</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Brigida del C. Camacho Enriquez</u>	<u>Brigida del C. Camacho Enriquez</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.B.P. Amparo Londoño Orozco</u>	<u>Amparo Londoño</u>

*Dedicada a la memoria de mis queridos padres Felipa Sánchez Murillo y Victor Morales Alcántara, así como a mi amado esposo David Romero Martínez y mi pequeña hija Dayana Denisse Romero Morales.*

*El que llega a alguna parte es solamente aquel que supo elegir entre un dilema. Y elegir es sacrificar. El buen éxito nace de un valeroso renunciamiento.*

*Emma Godoy.*

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios por que me a dado la vida y la oportunidad de realizar este proyecto.*

*A mis padres por que fueron los mejores y sus consejos siguen fructificando en mí.*

*A mi esposo por su apoyo, solidaridad y fortaleza en mis ratos de flaqueza, a mi hija por que ella me motiva.*

*A mis hermanos Eduardo, Victor, Elia y David por su cariño, apoyo y consejos, a mis cuñados Maria, Leticia y V. Hugo por que contribuyeron con ese apoyo.*

*A mis sobrinos Luchia, Hugo, Vero, Mauro, Dafia, Victor, Cesar, Ivan y Pam por su cariño.*

*A mi suegra por su apoyo.*

*A mi amigo Abad por que sus consejos me alentaron a elegir el mejor camino.*

*A mis amigos de la FESC por esos ratos tan amenos que hicieron menos pesadas las jornadas en la escuela en especial a Enrique quiten fue mi mejor amigo en la facultad.*

*A los profesores Gerardo Cruz Jiménez y Antonio Licea Vega quienes me asesoraron y ayudaron para la realización de esta tesis.*

*Al PH D. Eliseo Hernández Baumgarten, la M. En C Sofia González Gallardo y al Tec. Rodolfo Robles Gómez por que me asesoraron y permitieron realizar mi proyecto de tesis en el laboratorio de microscopia electrónica.*

*A todos mis profesores de la FESC por que me dieron las herramientas para crecer.*

*Al T.A. José Ignacio Garcia Salgado por su apoyo técnico en la búsqueda de información biblio-hemerográfica.*

# INDICE

	Pág
◆ Lista de abreviaturas.....	I
◆ Lista de diagramas.....	II
◆ Lista de figuras.....	II
◆ Lista de fotografías.....	II
◆ Lista de gráficas.....	II
◆ Lista de tablas.....	III
◆ Resumen .....	IV
1. <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 <i>Caléndula officinalis</i> .....	1
1.1.1 Distribución geográfica .....	1
1.1.2 Recolección.....	1
1.1.3 Descripción.....	2
1.1.4 Extracción .....	2
1.1.5 Propiedades .....	3
1.1.6 Composición .....	4
1.1.7 Actividad antimicrobiana de <i>Caléndula officinalis</i> .....	6
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	7
1.2.1 Habitat .....	7
1.2.2 Morfología .....	8
1.2.3 Nutrición y crecimiento .....	8
1.2.4 Patogenicidad .....	8

	Pág.
1.2.5 Factores de virulencia .....	9
1.2.5.1 Exotoxina A .....	9
1.2.5.2 Exoenzima S .....	9
1.2.5.3 Proteasa alcalina y elastasa .....	10
1.2.5.4 Leucocidina .....	11
1.2.5.5 Hemolisinas .....	12
1.2.5.6 Alginato .....	12
1.2.6 Detección e identificación .....	12
1.2.7 Colonización .....	13
1.2.8 Invasión .....	14
1.2.9 Diseminación .....	16
1.2.10 Enfermedades causadas por <i>P. aeruginosa</i> .....	16
1.2.10.1 Endocarditis .....	16
1.2.10.2 Infecciones respiratorias .....	16
1.2.10.3 Bacteremia .....	17
1.2.10.4 Infecciones en SNC .....	17
1.2.10.5 Infecciones en oído .....	17
1.2.10.6 Infecciones en ojo .....	18
1.2.10.7 Infecciones en hueso y articulaciones .....	18
1.2.10.8 Infecciones gastrointestinales .....	18
1.2.10.9 Infecciones en piel y tejido blando .....	19
1.2.11 Tratamiento y profilaxis.....	19

	Pág.
1.2.12 Resistencia y estructuras membranales .....	20
1.2.12.1 Organización de la pared y la membrana .....	21
1.2.12.2 Membrana citoplasmática .....	22
1.2.12.3 Mucopéptido .....	22
1.2.12.4 Área periplásmica .....	22
1.2.12.5 Membrana externa .....	23
1.2.12.6 Componentes lipoprotéicos, lipídicos y lipopolisacáridos .....	23
1.3 Microscopia electrónica .....	24
1.3.1 Tinción negativa .....	25
1.3.2 Importancia del microscopio electrónico en microbiología .....	26
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
2.1 Objetivo general .....	27
2.1.1 Objetivos particulares .....	27
<b>2.2 JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>28</b>
<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	<b>30</b>
3.1 Obtención de las flores de <i>Caléndula officinalis</i> .....	30
3.2 Preparación del extracto de <i>Caléndula officinalis</i> .....	30
3.3 Diluciones del extracto .....	30
3.4 Purificación de la cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	31
3.5 Estandarización de la cepa .....	31
3.6 Enfrentamiento bacterias- extracto (prueba cualitativa) .....	32
3.7 Método de MTT (prueba cuantitativa) .....	32
3.8 Prueba para determinar si el extracto es bactericida o bacteriostático .....	33

	Pág.
3.9 Preparación de las muestras para la observación al microscopio electrónico de transmisión .....	33
3.9.1 Fijación de la muestra .....	33
3.9.2 Tinción negativa .....	33
3.10 <b>RESULTADOS</b> .....	35
4. <b>DISCUSIÓN</b> .....	46
5. <b>CONCLUSIONES</b> .....	49
5.1 <b>APÉNDICE</b> .....	50
5.2 <b>REFERENCIAS</b> .....	58

## ABREVIATURAS

ATCC	Colección de Cultivo Tipo Americano.
Col.	Colaboradores.
G.I	Gastro Intestinal.
IFN	Interferón Gama.
IgA	Inmunoglobulina A.
IgG	Inmunoglobulina G.
Kd	Kilodaltones.
LPS	Lipopolisacárido.
μ	Micras.
μl	Microlitros.
μm	Micrómetros.
m.o	Microorganismo.
M	Molar.
MTT	(3-[4,5-dietiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoliobromida; azul de tiazolil).
n.m	Nanómetro.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
OF	Oxidación-Fermentación.
OPS	Organización Panamericana de la Salud.
PM	Peso Molecular.
pp	Precipitado.
rpm	Revoluciones por minuto.
SEM	Microscopio Electrónico de Barrido.
SNC	Sistema Nervioso Central.
snm	Sobre el nivel del mar.
SSF	Solución Salina Fisiológica.
TEM	Microscopio Electrónico de Transmisión.
TNF	Factor de Necrosis Tumoral.
UFC	Unidades Formadoras de Colonias.
U.V	Ultravioleta.

## LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama		Pág.
1	Metodología (resumen) .....	29

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	<i>Caléndula officinalis</i> .....	2
2	Estructuras membranales de <i>Pseudomonas</i> .....	24

## LISTA DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía		Pág.
1	Microfotografía electrónica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> control .....	42
2	Microfotografía electrónica de <i>P. aeruginosa</i> con <i>C. officinalis</i> al 10% .....	42
3	Microfotografía electrónica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> control .....	43
4	Microfotografía electrónica de <i>P. aeruginosa</i> con <i>C. officinalis</i> al 15% .....	43
5	Microfotografía electrónica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> control .....	44
6	Microfotografía electrónica de <i>P. aeruginosa</i> con <i>C. officinalis</i> al 20% .....	44
7	Microfotografía electrónica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> control .....	45
8	Microfotografía electrónica de <i>P. aeruginosa</i> con <i>C. officinalis</i> al 30% .....	45

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica		Pág.
1	Efecto del extracto de <i>C. officinalis</i> en <i>P. aeruginosa</i> por el método de MTT.....	41

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Componentes de <i>Caléndula officinalis</i> .....	5
2	Diluciones del extracto de <i>C. officinalis</i> .....	30
3	Lecturas de absorbancia del efecto inhibitorio de <i>C. officinalis</i> en <i>P. aeruginosa</i> . Método de MTT:.....	36
4	Promedio de absorbancias del método de MTT del enfrentamiento de <i>C. officinalis</i> en <i>P. aeruginosa</i> con las desviaciones estándar promedio e intervalos de confianza.....	37
5	Porcentaje de crecimiento del enfrentamiento de <i>C. officinalis</i> en <i>P. aeruginosa</i> . Método de MTT.....	38
6	Porcentaje de inhibición del enfrentamiento de <i>C. officinalis</i> en <i>P. aeruginosa</i> . Método de MTT.....	38
7	Resultados de la determinación del efecto bactericida o bacteriostático de <i>C. officinalis</i> en <i>P. aeruginosa</i> .....	39

## RESUMEN

Las flores de *Caléndula officinalis* (nombre común mercadela o alta reyna) son utilizadas en la medicina tradicional como antiinflamatorio, regenerador del epitelio, antiviral, presenta actividad antiséptica contra *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Streptococcus feacalis*, *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa*.

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria de gran importancia médica por que produce infecciones nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos, en heridas traumáticas, quirúrgicas, quemaduras, fibrosis quística, etc. y presenta una multiresistencia a los antibióticos, sin embargo estudios anteriores han demostrado que esta bacteria es especialmente sensible al extracto etanólico de los pétalos de *C. officinalis*, es por esta razón que el objetivo del presente trabajo es: "Determinar la actividad antiséptica de *Caléndula officinalis* en *Pseudomonas aeruginosa* evidenciado por microscopia electrónica", ya que esta técnica es una herramienta de gran utilidad para demostrar un posible daño en la estructura de *P. aeruginosa* producido por *C. officinalis*.

Para llegar a nuestro objetivo se realizó una extracción etanólica de los pétalos de la flor esterilizando con membrana milipore y liofilizando para eliminar el etanol y evitar que presente actividad antiséptica, por que deseamos observar sólo el efecto de *C. officinalis* en *P. aeruginosa*. Utilizamos el extracto a diferentes diluciones (10, 15, 20 y 30%) y lo enfrentamos con la bacteria estandarizada con el 0.5 del nefelometro de Mac Farland, (prueba cualitativa), para comprobar este efecto de manera cuantitativa aplicamos el método de MTT (3-[4,5-dietiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoliobromida; azul de tiazolil) que determina la presencia de bacterias vivas a partir de la reducción del MTT por la acción de una deshidrogenasa producida por dichas bacterias, la cantidad de estas, es determinada por un método espectrofotométrico obteniendo los resultados con un lector ELISA.

Se considero de importancia comprobar si el efecto producido por *C. officinalis* sobre *P. aeruginosa* es bactericida o bacteriostático, por lo que después del enfrentamiento, se sembró en agar sangre 10 µl de la suspensión incubando y contando unidades formadoras de colonias (UFC). Finalmente para observar si *C. officinalis* produce un daño en la estructura de *P. aeruginosa* se realizó una tinción negativa que nos revela en el microscopio electrónico de transmisión si existe o no una alteración en la estructura de la bacteria. considerable.

Para la determinación del efecto bactericida o bacteriostático del extracto se encontró que en las placas sembradas con los tubos control positivo y al 10% hubo crecimiento, por lo que en esta dilución el extracto es bacteriostático, mientras que al 15, 20, y 30% no hubo ninguna colonia presente por lo que a partir de esta dilución del extracto produce efecto bactericida. Con lo que respecta a la microscopía electrónica se pueden observar diferencias anormales en la estructura de las bacterias tratadas, particularmente en la pared por lo que se penso en un posible esferoplasto. Debido a esto se concluye que se puede obtener un extracto de *Caléndula officinalis* libre de etanol que inhibe a *Pseudomonas aeruginosa* a una baja concentración 3.6 mg/ml. (10% del extracto) y que tiene un efecto bactericida contra esta bacteria a partir de una concentración de 5.4 mg/ml. (15% de la dilución del extracto), observándose un daño en la pared celular de la bacteria desde la primera dilución la cuál pudo ser visualizada con microscopía electrónica de transmisión.

El presente trabajo nos indica que la medicina alternativa es otro camino para el tratamiento de enfermedades que la medicina alopata no puede controlar debido tal vez al mal uso de los mismos, como en el caso de los antibióticos, por lo que se requiere mayor investigación sobre la elaboración de productos farmacéuticos con esta planta.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 *Caléndula officinalis*

#### 1.1.1 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

*Caléndula officinalis* conocida también como marigold, alta reyna o mercadela es una planta anual o perenne originaria del sur de Europa y en México es cultivada como planta de ornato, se encuentra presente en clima simiseco y templado desde los 20 hasta los 2 000 m. snm. Cultivada en huertos familiares o asociada a bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo y bosque mixto pino y encino. (12,19, 23).

#### 1.1.2 RECOLECCIÓN

La planta se recolecta principalmente durante el mes de agosto en el cual las flores son más abundantes. Se separan de los capítulos las corolas liguladas y se extienden sobre bandejas de lona y se secan en cámara aireada (19).

### 1.1.3 DESCRIPCIÓN

*Caléndula officinalis* es una planta herbácea anual con raíz fibrosa. Tallos esparcidos, de 5 a 45 cm de altura, con numerosas ramas estriadas, foliosas, succulentas y pubescentes. En la figura 1 pueden observarse sus hojas oblongas, agudas, algo succulentas, las superiores lanceoladas, con margen entero, frecuentemente hispido con vellos cortos, su cabezuela es grande, terminal, sus pétalos pueden ser de color amarillo o anaranjado (19).

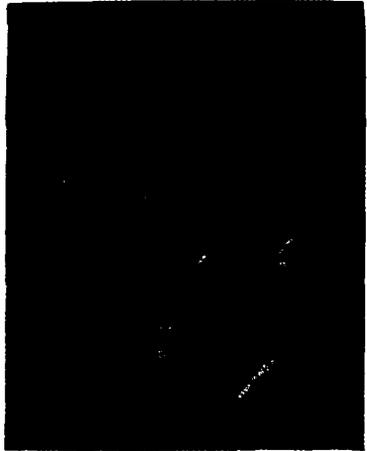


Figura 1. *Caléndula officinalis*

### 1.1.4 EXTRACCIÓN

El primer paso es realizar una extracción con un disolvente, normalmente alcohol y posteriormente concentrar el líquido obtenido mediante evaporación que puede ser total o parcial (24).

**Clasificación:** Hay múltiples maneras de clasificar los extractos, como por ejemplo según el método empleado para su obtención (24)

- a) **Fluidos.** Consistencia líquida, color oscuro y olor intenso.
- b) **Blandos.** Extractos fluidos donde se sigue evaporando disolvente hasta que la consistencia sea semejante a un unguento (actualmente no se usan).
- c) **Secos.** El disolvente se evapora por completo y se obtiene un sólido que pulveriza. Se trata de los extractos más concentrados, pues un gramo del extracto seco corresponde, en la mayoría de los casos a 5 gramos de la planta (relación 1:5).
- d) **Nebulizados.** El líquido extractivo se atomiza en presencia de una corriente de aire muy caliente, de este modo logramos que el disolvente se evapore a gran velocidad, evitando así que los principios activos deban someterse a altas temperaturas durante mucho tiempo.
- e) **Glicólicos.** El disolvente es el propilenglicol. Están recomendados en la preparación de cremas o geles.
- f) **Hidroglicerinos.** La extracción se realiza con agua y glicoles.
- g) **Hidroalcohólicos.** La extracción se realiza con alcohol etílico a distintas graduaciones.
- h) **Lipídicos.** La extracción se realiza con ésteres en ácidos grasos saturados.

### 1.1.5 PROPIEDADES

Esta planta ha sido utilizada durante mucho tiempo en la medicina tradicional y se le han atribuido más de 35 propiedades a las infusiones y tinturas de las flores, por ejemplo, antiinflamatorio, analgésico, antitumoral, diurético, bactericida, antiviral, por su capacidad emenagoga, favorece la aparición de la menstruación en mujeres que padecen amenorrea y al mismo tiempo regula y hace disminuir las pérdidas excesivas de sangre, mejora la dismenorrea, favorece la cicatrización de las úlceras de estómago alivia la

gastritis, es útil también en las afecciones de la piel como llagas, verrugas y callos así como cicatrizante de la piel (22, 4, 12).

Esta planta también tiene efectos sobre el sistema inmunológico porque estimula la proliferación de linfocitos T pero inhibe la inducción mitógena de la proliferación de linfocitos. Aunque los mecanismos no son claros, al parecer los constituyentes del extracto y la superficie celular son los factores involucrados en ésta inhibición (51).

Se ha comprobado su actividad antiséptica contra algunas bacterias (Tuxquí y cols.,1996), así como su capacidad antiviral y antiinflamatoria (Della-Loggia y cols. 1994), antiedematosa ( Zitterl y cols., 1997) y en 1980 Dumenil y cols. determinaron sus propiedades bactericidas contra *E. coli*, *Streptococcus feacalis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los extractos de *C. officinalis* no presentan actividad genotóxica (37) ni citotóxica (34) en cultivos celulares.

### 1.1.6 COMPOSICIÓN

*Caléndula officinalis* contiene aproximadamente 0.02% de esencia, materia amarga amorfa 19%, una sustancia descubierta en 1818, llamada calendulina, carotina en las flores, ésteres colesterínicos de los ácidos láurico, mirístico, palmítico esteárico y pentadecílico, un hidrocarburo, glucósido, xantofila, mucílagos, ácidos orgánicos, ácido málico, ácido salicílico, materia colorante y vitamina C (46). En la Tabla 1 puede observarse una gran parte de los componentes de *Caléndula officinalis*

**Tabla 1 :** Algunos componentes químicos de *Caléndula officinalis* (7, 19, 20, 25 )

4-beta-metilergosta-7,24(28)-dien-3-beta-ol.	Aurochromo.
9'cis-luteína.	Auroxantinas.
9cis-luteína.	Beta-amirina.
24-metilen-colesterol.	Beta-sitosterol.
28-iso fucosterol.	Breina.
Licopeno.	Calendulina.
Ácido málico.	Calenduladiol.
Maniladiol.	Campesterol.
Metilpentosa.	Carotenoides.
Mucilago.	Cariofileno..
Mutaxantina.	Acido clorogénico.
Narcissina.	Colesterol.
Neolicopeno.	Cis-flavonoxantinas.
Olean-12-ene-3-beta,16-beta,28-triol.	Cis-luteoxantinas.
Ácido oleanólico.	Eo.
Ácido p-hidroxibenzóico.	Eritrodiol.
Ácido p-hidroxifenilacetico.	Faradiol.
Ácido pentadecanóico.	Flavocromos.
Fitoflueno.	Flavonoides.
Proteínas.	Flavoxantinas.
Pseudotaraxasterol.	Galactosa.
Pirogalol-tanina.	Ácido gentísico
Resina.	Heliantriol-C.
Rutina.	Heliantrol-F.
Saponinas.	Isoramnetina-3-glucosido.
Alfa-amirin.	Isoramnetina-3-o-rutinosido.
Arnadiol.	Isoramnetina-3-rutinosido.
Ácido Ascórbico.	Lapetriol.
	Longispinogenina.

### 1.1.7 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *Caléndula officinalis*.

Algunos trabajos han demostrado que *Caléndula officinalis* es eficaz para inhibir el crecimiento de bacterias como *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y *Candida albicans* (Tuxqui y cols. 1994). El efecto de los extractos acuosos, etanólicos, e hidroacetónico fueron estudiados por Duménil y cols. en 1980, encontrando que: el extracto etanólico al 80% produce un efecto bactericida sobre *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Estas investigaciones son de importancia debido a que algunas de estas bacterias han ayudado al aumento de enfermedades nosocomiales como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa* quien en 1984 causó junto con otras bacterias Gram negativas el 47% de infecciones intrahospitalarias en el país (según datos de la OPS y OMS) (33); esto es el resultado de la multirresistencia que presenta *Pseudomonas aeruginosa* a los antibióticos, lo cual nos hace pensar en la necesidad de buscar nuevas alternativas en el tratamiento contra esta bacteria por lo que el objetivo de este trabajo es: "Determinar el efecto que produce *Caléndula officinalis* en *Pseudomonas aeruginosa*".

## 1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

### 1.2.1 HABITAT

Muchas de las especies están comúnmente presentes en el agua, suelo y en medio hospitalario, pueden formar parte de la flora normal del cuerpo como en el tubo intestinal, y esporádicamente en zonas húmedas de la piel humana (axila, ingle y saliva). Las plantas, los animales salvajes y domésticos pueden ser portadores de *Pseudomonas*, pero rara vez tienen un papel importante como reservorios y vectores de la transmisión al hombre (4, 8)

Más de 25 especies diferentes de *Pseudomonas* se asocian al hombre y su medio ambiente inmediato, pero solamente, *P. aeruginosa* representa más del 75% de las que se recuperan de muestras clínicas (3).

Especialmente *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista. Puede ser etiológicamente significativo, en general en pacientes previamente comprometidos, en heridas y en sepsis postquemaduras, infecciones postquirúrgicas, septicemias e infecciones del tracto respiratorio (6).

Pueden metabolizar una gran variedad de fuentes de carbono. De ahí su capacidad para multiplicarse en cualquier medio húmedo que contenga incluso cantidades mínimas de compuestos orgánicos, por ejemplo: gotas oftálmicas, soluciones antisépticas débiles, detergentes, equipos de anestesia, fregaderos, equipos desmineralizadores e incluso agua destilada almacenada (9, 17).

### 1.2.2 MORFOLOGÍA

Microscópicamente *P. aeruginosa* es un bacilo fino no esporulado y en general no encapsulado con un solo flagelo polar. Esta bacteria presenta tres tipos de colonias. La más común en una placa de agar sangre de 24 horas, es baja, convexa y plana de 1 a 5 mm de diámetro, con una superficie rugosa o de vidrio opaco y una superficie ondulada y erosionada. Puede ser  $\beta$ -hemolítica y generalmente presenta  $\beta$ -hemólisis difusa en una placa de 48 horas (28, 30).

### 1.2.3 NUTRICION Y CRECIMIENTO

*Pseudomonas* crece en un amplio rango de temperaturas que va de 4 a 43°C, se desarrollan bien en medios que han sido diseñados para Enterobacterias, así como en medios de laboratorio estándar como el agar sangre y los medios nutritivos en donde pueden ser visualizados los pigmentos hidrosolubles, plicianina azul, fluoresceína de color amarillo (9, 15). Estos pigmentos colorean el medio que rodea las colonias. Alrededor del 10% de las cepas no forman pigmentos (27). *P. aeruginosa* como casi todas las *Pseudomonas*, no es nutricionalmente exigente (29).

### 1.2.4 PATOGENICIDAD

Para un patógeno oportunista como *P. aeruginosa*, el proceso de la enfermedad empieza con alguna alteración en las defensas normales del huésped. La patogénesis de infecciones por *P. aeruginosa* es multifactorial, sugerido por el gran número de factores

de virulencia de la bacteria, estos producen una amplia gama de enfermedades producidos por *Pseudomonas* como: septicemia, infección del tracto urinario, neumonía, infecciones pulmonares crónicas, endocarditis, dermatitis y osteocarditis.

La mayoría de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* son invasivas y toxigénicas. El proceso puede verse en tres fases: (1) la adherencia bacteriana y colonización; (2) la invasión local y (3) la diseminación sistémica. Sin embargo el proceso de la enfermedad puede detenerse en cualquier fase. Los determinantes de virulencia median cada una de estas fases y son finalmente responsables de los síntomas característicos que acompañan a la enfermedad (21).

### 1.2.5 FACTORES DE VIRULENCIA

#### 1.2.5.1 **Exotoxina A:**

Es un solo polipéptido con un PM de 66 Kd producido por un alto porcentaje de las cepas aisladas de pacientes y cuya acción es inhibir la síntesis de proteínas por ADP-ribosilación del factor de alargamiento 2(EF-2) requerido para el paso de translocación durante la síntesis protéica (2, 49).

#### 1.2.5.2 **Exoenzima S:**

Es una proteína con actividad de ADP-ribosiltransferasa que contribuye a la virulencia de *P. aeruginosa* ya que se ha demostrado que mutantes deficientes de esta enzima son significativamente menos virulentos que su cepa progenitora (9, 27).

La exoenzima S es un producto extracelular producido por *P. aeruginosa* que contribuye a la patogenicidad de este microorganismo, sobre todo en mecanismos de invasividad. Esta enzima parece ser similar aunque no idéntica a la exotoxina A (27).

### 1.2.5.3 Proteasa alcalina y elastasa:

Han sido implicados en la producción de hemorragias en órganos internos, especialmente en pulmones y probablemente los responsables de la destrucción de tejido corneal en infecciones oculares provocadas por este organismo (3).

Aproximadamente el 85% de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* producen elastasa, la cual es una proteasa neutra que contiene zinc y es sensible a quelantes de metales (17).

La elastasa es creada como una proenzima inactiva asociada a la pared celular y es activa por proteólisis limitada por otras proteasas de *Pseudomonas* o por la propia enzima. La elastasa purificada inactiva a los factores C<sub>1</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>8</sub> y C<sub>9</sub> del complemento "in vitro", por lo que quizá inhibe el movimiento de los leucocitos polimorfonucleares al sitio de inflamación y disminuye su actividad fagocítica (3, 21).

Las proteasas extracelulares de *P. aeruginosa* (proteasa alcalina y elastasa) son factores importantes de virulencia en varias infecciones humanas. De esas dos enzimas, la elastasa purificada puede demostrarse que contribuye al daño tisular causado durante neumonías por *Pseudomonas* en estudio "in vivo" e "in vitro" (6, 15).

Parece ser que hay al menos 2 mecanismos diferentes usados para la secreción de esas proteínas. La elastasa es sintetizada como un precursor inactivo el cual se acumula en el espacio periplásmico después de la activación y se libera en el medio de cultivo (9, 26).

El mecanismo por el cual la proteasa alcalina es exportada no se conoce. Estas enzimas tienen varias actividades tales como:

- a) Efectos directos de destrucción de tejidos.
- b) Factores quimiotácticos y fagocíticos.
- c) Inactivación del complemento.
- d) Inhibición de la proteinasa del plasma.
- e) Habilidad para disminuir el tiempo de generación de cepas deficientes de proteasas en extractos de piel quemada.

En 1981 Doring y colaboradores demostraron "in vitro", que la elastasa de *P. aeruginosa*, tiene la capacidad de adherirse a la IgG, no así la proteasa alcalina y sugieren que las cepas elastasa (+) son más virulentas que las cepas elastasa o proteasa total (+). Con lo que se apoya que la producción de elastasas durante el proceso infeccioso está relacionado con la disminución en plasma de los niveles de IgG, lo cual se ha observado en infecciones de heridas de ratones quemados (8, 31, 47).

#### 1.2.5.4 Leucocidina :

Una proteína de 27.5 Kd, termolábil y activable por tripsina, que destruye a los leucocitos pero no a los glóbulos rojos (36).

#### 1.2.5.5 Hemolisinas :

Un glicolípido termoestable y una fosfolipasa termolábil (fosfolipasa C), la cual es una proteína de 78 Kd que cataliza la hidrólisis de la fosfatilcolina y diacilglicerol. Se ha sugerido que la combinación del glicolípido hemolítico y la fosfolipasa C pueden producir efectos citopáticos considerables en los pulmones de pacientes con infecciones de estos órganos (36, 39).

#### 1.2.5.6 Alginato :

Es un exopolisacárido constituido principalmente por ácido manurónico y ácido glucurónico que hace a las cepas presentar morfología mucóide. El alginato inhibe la actividad fagocítica de los leucocitos (31).

*P. aeruginosa* también produce lipopolisacárido (endotoxina) común en las bacterias Gram negativas. Estas endotoxinas activan los sistemas de coagulación, fibrinolíticos y del complemento, estimula además la liberación de péptidos vasoactivos.

### 1.2.6 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Esta especie bacteriana es fácilmente aislada y puede ser identificada en exudados, pus, orina, etc. El aislamiento de *P. aeruginosa* de muestras clínicas es facilitado por el uso de medios selectivos que contienen 0.03% de cetrimida (Lowbury y Collins ) y por el uso de medios de cultivo como agar sangre pueden observarse bajo luz ultravioleta el color verde-azul y/o verde-amarillo (8, 43).

Puede considerarse también la típica morfología de las colonias (grandes, planas y escarchadas) además del olor característico (17, 43).

La identificación inicial es semejante a la de una enterobacteria. Los rasgos para la identificación de *P. aeruginosa* son (29, 32) :

- 1) Morfología microscópica, morfología colonial y pigmentación si existe.
- 2) Producción de piocianina (color verde- azul).
- 3) Gram (-)
- 4) Producción de pioverdina (color verde-amarillo) .
- 5) Crecimiento a 42°C.
- 6) Reducción de nitrato a nitrógeno gaseoso.
- 7) Acidificación de hidratos de carbono particularmente glucosa, arabinosa y xilosa.
- 8) Descarboxilación de la lisina.
- 9) Alcalinización de la acetamida y urea.
- 10) Oxidasa (+).
- 11) Licuefacción de gelatina.
- 12) Olor peculiar ("tortillas").
- 13) Catalasa (+)

### 1.2.7 COLONIZACIÓN

La fimbria de *P. aeruginosa* se adhiere a las células epiteliales del tracto respiratorio superior. Estas adhesinas se fijan específicamente a los receptores manosa, galactosa y ácido sialico celular.

La colonización del tracto respiratorio por este microorganismo requiere de la adherencia fimbrial y puede ser ayudado por la producción de una enzima proteasa que degrada la fibronectina en orden a expansión de la capa inferior de los receptores fimbriales en la superficie celular. El receptor en las células de traquea para las pili de la bacteria es el ácido sialico (ácido N-acetilneuraminico) Las cepas mucoides producen un exopolisacarido (alginato), lo cual le da una adhesina adicional con ataque a la mucina traqueobronquial (n-acetilglucosamina). El pili y el polisacárido mucoide son dos adhesinas de la superficie celular utilizado por *P. aeruginosa* para colonizar el epitelio respiratorio o mucina. La superficie de la exoenzima S puede servir como adhesina para glicolípidos en la célula respiratoria.

El exopolisacárido mucoide producido por *P. aeruginosa* es un polímero repetido del ácido manurónico y glucurónico referido como alginato.

La matriz de formas mucoides del alginato de *P. aeruginosa* protege a las bacterias del ataque del sistema de defensa del huésped (linfocitos, fagocitos, acción ciliar del tracto respiratorio, anticuerpos y complemento) (21, 43).

### 1.2.8 INVASIÓN

La habilidad de *P. aeruginosa* para invadir tejido depende de la resistencia a la fagocitosis del sistema de defensa del huésped, así como a las barreras físicas, las enzimas extracelulares y toxinas contribuyen a la invasión bacteriana. La cápsula del microorganismo protege a la célula bacteriana de la opsonización por anticuerpos, fijación del complemento y fagocitosis (43).

Dos proteasas extracelulares pueden estar asociadas con la virulencia que ejerce su actividad a su fase invasiva: elastasa y proteasa alcalina. La elastasa tiene varias actividades relacionadas a la virulencia. La enzima se adhiere a la colagena, IgG, IgA y complemento, también lisa fibronectina de receptores expuestos al ataque bacterial en la mucosa del pulmón (6, 43).

La elastasa rompe el epitelio respiratorio e interfiere con la función ciliar. La proteasa alcalina afecta la formación de fibrina y la lisa. Esta proteína y la proteasa alcalina destruyen la cornea y otras estructuras de soporte compuestos de fibrina y elastina. Se ha reportado que la elastasa y la proteasa alcalina causan la inactivación del interferón gamma (IFN ) y el factor de necrosis tumoral (TNF).

*Pseudomonas aeruginosa* produce otras tres proteínas solubles involucradas en la invasión, estas son: una citotoxina (PM 25,000) y dos hemolisinas. La citotoxina es una proteína de formación de poro, esta fue llamada originalmente leucocidina ya que afectaba a neutrófilos pero este efecto citotóxico aparece en la mayoría de las células eucarióticas. De dos hemolisinas, una es una fosfolipasa y la otra es una lecitinas. La citotoxina y las hemolisinas contribuyen a la invasión a través de los efectos citotóxicos en las células eucarióticas (21, 50).

Los pigmentos que produce *P. aeruginosa* son probablemente determinantes de virulencia del patógeno. El pigmento azul, piocianina, daña la función normal de los cilios nasales humanos, rompe el epitelio respiratorio y ejerce un efecto proinflamatorio en fagocitos (6, 21).

### 1.2.8 DISEMINACIÓN

La invasión en sangre y la diseminación de *P. aeruginosa* de los sitios de infección local es probablemente mediado por algunas células asociadas y productos extracelulares responsables de las enfermedades, aunque no esta completamente claro como las bacterias producen la enfermedad sistémica. *P. aeruginosa* es resistente a la fagocitosis y al efecto bactericida del suero normal, posiblemente por la cápsula y el LPS. Las proteasas inactivan complemento, IFN, TNF y otras citocinas, además se adhieren a los anticuerpos IgG. El lípido A de las *Pseudomonas* tiene actividad patológica similar a las Gram-negativas provocando septicemia, fiebre, hipotensión, coagulación intravascular, etc.<sup>(21)</sup>.

### 1.2.10 ENFERMEDADES CAUSADAS POR *P. aeruginosa* (23, 48).

#### 1.2.10.1 Endocarditis

Esta bacteria, se establece en el endocardio por invasión directa del torrente sanguíneo.

#### 1.2.10.2 Infecciones respiratorias

Las infecciones provocadas por *P. aeruginosa* ocurren casi exclusivamente en individuos con tracto respiratorio bajo comprometido o por mecanismos de defensas comprometidas. La neumonía primaria ocurre en pacientes con enfermedades pulmonares

crónicas. La neumonía bacterémica ocurre comúnmente en pacientes con cáncer neutropénico por quimioterapia.

### **1.2.10.3 Bacteremia**

El microorganismo causa bacteremia primaria en pacientes inmunocomprometidos. Las condiciones predisponibles son : hematologías malignas, inmunodeficiencias relacionadas a SIDA, neutropenia, diabetes mellitus y quemaduras severas. Muchas bacteremias por *Pseudomonas* son adquiridas en hospitales. *P. aeruginosa* esta presente en el 25% de todas las bacteremias por Gram-negativas adquiridas en hospitales.

### **1.2.10.4 Infecciones en sistema nervioso central**

La bacteria produce meningitis y abscesos cerebrales. El organismo, invade SNC de estructuras inmediatas o cercanas como oído interno, seno paranasal, o al ser directamente inoculado por medio de traumatismo en cabeza, cirugía o procedimientos diagnósticos invasivos o de sitios distantes tal como el tracto urinario.

### **1.2.10.5 Infecciones en oído incluyendo otitis externa**

*Pseudomonas aeruginosa* es patógeno predominante en algunos casos de otitis externa como en el caso de "oreja de nadadores". La bacteria infrecuentemente se le encuentra en oído normal, pero habita el canal auditivo externo en asociación con lesiones, maceración, inflamación o simplemente condiciones húmedas.

### **1.2.10.6 Infecciones en ojo**

*Pseudomonas aeruginosa* puede causar infecciones devastadoras en el ojo humano. Uno de los casos más comunes es la queratitis bacteriana y el agente etiológico puede ser aislado en oftalmia neonatal. El microorganismo puede colonizar epitelio ocular por medio de ataque fimbrial a receptores de ácido siálico. La bacteria puede proliferar rápidamente y a través de la producción de enzimas tal como la elastasa, proteasa alcalina y exotoxina A, causa rápidamente infección destructiva que puede producir la pérdida total del ojo.

### **1.2.10.7 Hueso e infecciones en articulaciones**

Las infecciones por *P. aeruginosa* en hueso y articulaciones, resultan de la inoculación directa de la bacteria y propagación hematogena a otros sitios de infección primaria. Las infecciones sangre-hueso son observadas con el uso de fármacos IV y en conjunto con tracto urinario o infecciones pélvicas. La bacteria tiene un topismo particular de articulaciones fibrocartilaginosa del esqueleto axial. También causa contagios crónicos como: osteomielitis, usualmente resultado directo de la inoculación en hueso, y es el patógeno más común implicado en osteocondritis después de la herida en pie.

### **1.2.10.8 Infecciones gastrointestinales**

*Pseudomonas aeruginosa* puede producir enfermedades en algunas partes del tracto gastrointestinal desde orofaringe hasta el recto. La infección del tracto gastrointestinal (GI) ocurre primeramente en individuos inmunocomprometidos. El organismo está implicado en infecciones perirectales, diarrea pediátrica, gastroenteritis

típicas y enterocolitis necrozante. El tracto GI también es un sitio muy importante como consecuencia de septicemia por esta bacteria.

#### **1.2.10.9 Infecciones en piel y tejido blando**

*Pseudomonas aeruginosa* puede causar una variedad de infecciones en piel, localizadas y generalizadas. Los factores comunes de predisposición son ruptura del tegumento que puede ser resultado de quemaduras, traumatismo o dermatitis, condiciones de humedad elevada, como es el caso de "oído de nadadores".

#### **1.2.11 TRATAMIENTO Y PROFILAXIS**

Debemos mantener en mente los pocos antimicrobianos que son de utilidad en el tratamiento de las infecciones por esta cepa, particularmente cuando se hacen tratamientos sistémicos (28, 38).

En la terapéutica de *P. aeruginosa* los antibióticos recomendados de primera elección son principalmente aminoglucósidos, en caso de presentar resistencia, los fármacos alternativos son cefalosporinas de tercera generación. En la actualidad ya existen cepas multirresistentes por lo que es aconsejable aplicar cefalosporinas de cuarta generación o carbapenems (11, 44).

También algunos derivados como carbenicilina y ticarcilina son agentes terapéuticos que pueden ser utilizados porque cruzan la membrana y son relativamente resistentes a la  $\beta$ -lactamasa (1).

No obstante la prevención de la colonización, la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento, así como el control de la enfermedad primaria son los factores en la sobrevida de los pacientes con infecciones por *P. aeruginosa* (28).

Para tener un control de este tipo de microorganismo en los centros hospitalarios y evitar en gran medida las infecciones; lo que se recomienda es esterilizar adecuadamente todo el material quirúrgico así como sanitizar las salas operatorias. Posterior a esto, se deben hacer revisiones periódicas para comprobar su erradicación (13).

### **1.2.12 RESISTENCIA Y ESTRUCTURAS MEMBRANALES DE *P. aeruginosa***

Muchos antibióticos muestran una alta toxicidad hacia las bacterias Gram-positivas pero en ocasiones para las Gram-negativas solo son tóxicos en altas concentraciones. Sin embargo los sistemas celulares de las bacterias Gram-negativas son tan sensibles como las Gram-positivas. La resistencia antibacterial probablemente se deba a la producción de enzimas o a que las capas exteriores de la bacteria prevengan el acceso de los antibióticos a los sitios de acción. Ejemplos de antibióticos que pueden ser inactivos son: kanamicina, neomicina, estreptomycinina, cefalosporina y penicilina. Se tiene evidencia de que la resistencia de muchas Gram negativas como *P. aeruginosa* se debe a la composición de sus paredes.

El papel de la mureína es impedir al deoxicolato alcanzar su sitio de acción en la membrana. La barrera más importante de penetración son las capas exteriores de la membrana debido a sus componentes lipopolisacáridos y lipoproteínas. Por ejemplo Hamilton (1980) demostró que *P. aeruginosa* puede formar esferoplastos debido a varios agentes como gramicidina y bromuro de cetiltrimetilamonio que ataca a la membrana citoplasmática. Sin embargo la cantidad de estos agentes antibacterianos es limitada ya que también se pueden encontrar bacterias intactas (6).

La membrana externa de las bacterias Gram-negativas (como *P. aeruginosa*) es semipermeable y permite la difusión de pequeños solutos, hidrofílicos y tiene una muy baja permeabilidad a componentes hidrofóbicos. Las propiedades de permeabilidad de esta membrana son determinados mayormente por las propiedades de las proteínas formadoras de poro y de los sistemas específicos de transporte que tienen muchas Gram-negativas. En la bacteria el antibiótico está localizado incidiendo en la membrana externa y estos componentes tienen que atravesarla para ser efectivos, por lo tanto la sensibilidad de las bacterias Gram negativas a los antibióticos está influenciado por las propiedades de permeabilidad de los canales presentes en la membrana externa (42). Probablemente la resistencia antibacterial se deba a la producción de enzimas o que las capas exteriores de la bacteria prevengan el acceso de los antibióticos a los sitios de acción (47).

### 1.2.12.1 Organización de la pared y la membrana

La bacteria se limita a través de dos membranas de doble capa onduladas de 7 nm aproximadamente de ancho separada por una región electro-transparente. El interior de estas es la membrana citoplasmática mientras que la región externa es considerada como parte de la pared, llamada membrana externa que consiste de fosfolípidos y lipopolisacáridos, en la figura número 2 puede observarse la disposición de estos componentes.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Este organismo requiere de iones de sodio para el crecimiento y el metabolismo, además de otros cationes para mantener la célula integra (6, 42).

#### **1.2.12.2 Membrana citoplasmática**

Mientras algunas de las proteínas de la membrana pueden ser estructurales, otros deben ser fragmentados por medio de enzimas. La membrana citoplasmática es la principal barrera permeable de la bacteria y se lleva a cabo el transporte activo, también es el sitio donde se lleva a cabo la fosforilación oxidativa y la replicación cromosomal, este juega un papel importante en la formación y la biosíntesis de polímeros de la pared, en la síntesis de proteínas y replicación del DNA. En figura 2 podemos ver que la membrana citoplasmática esta formada de fosfolípidos y un complejo proteínico (6, 14).

#### **1.2.12.3 Mucopéptido**

Removiendo la capa exterior de la membrana citoplasmática el siguiente componente estructural es el mucopéptido y además existe una región periplásmica entre estas dos (observe Fig. 2). Una de las principales funciones de la capa mucopeptídica es la de conferir forma y resistencia mecánica bacteriana desde la cual puede haber formación de protoplasmas e inestabilidad osmótica. Este juega un papel importante en el control de la permeabilidad de la capa externa de la pared bacteriana por lo que ambos forman una barrera semipermeable (6).

#### **1.2.12.4 Area periplásmica**

Esta área esta ligada a ambos lados de la membrana citoplasmática y a la capa de la membrana externa.

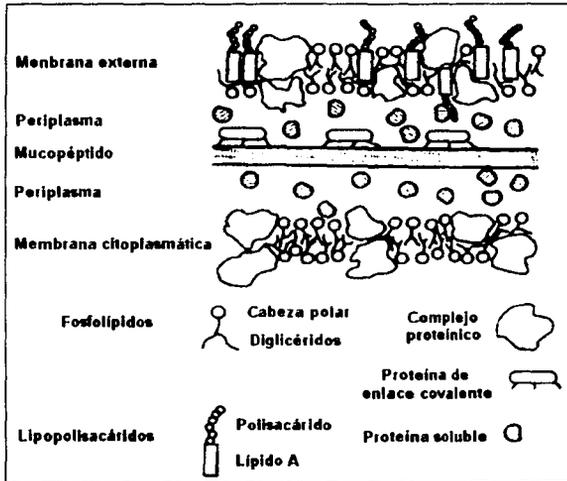
En muchos organismos, las proteínas enlazadas están asociadas con el transporte de aminoácidos y otros nutrientes bacterianos los cuales se localizan en la región periplásmica. La otra capa de la pared, sólo deja pasar a las moléculas de bajo peso molecular (9, 6).

#### 1.2.12.5 Membrana externa

La membrana externa consiste de lipoproteínas y lipopolisacáridos. La doble capa membranal externa es la responsable de muchas de las propiedades que protegen a la bacteria . Este tiene un papel importante en el transporte de metabolitos dentro de la célula además de tener algunos efectos en la adsorción de bacteriófagos, y de ser responsable de la respuesta antigénica y serológica del organismo.

#### 1.2.12.6 Componentes Lipoprotéicos, Lipídicos y Lipopolisacáridos.

Las lipoproteínas de *P. aeruginosa* se encuentran en pequeñas cantidades en las capas de la membrana externa . Los lípidos se localizan en la membrana citoplasmática y 90% de estos son fosfolípidos. Los lipopolisacáridos están en grandes cantidades en la membrana externa y estos juegan un papel importante en la respuesta de la bacteria al medio ambiente (ver Fig. 2) (6).



**Figura 2.** Estructuras membranales de *Pseudomonas*. En esta figura se observa la disposición de los componentes de la membrana citoplasmática y de la membrana externa de *Pseudomonas*.

### 1.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La ultraestructura bacteriana fue demostrada solamente después del desarrollo del microscopio electrónico, que tiene un poder de resolución de aproximadamente 0.001  $\mu\text{m}$ , es decir, unas doscientas veces el del microscopio óptico. El microscopio electrónico de transmisión (TEM) desarrolla una imagen bidimensional resultado de la variable densidad a los electrones (poder de detención) de la muestra interpuesta en el haz de luz de electrones. Los preparados deben fijarse, teñirse y secarse.

Las técnicas mejoradas de fijación, inclusión y cortes delgados, han permitido gradualmente una mejor definición de los componentes estructurales. El detalle fino de los flagelos y los pelos, así como la envoltura de la célula, la membrana y la estructura fina de su interior, pueden visualizarse tanto por sombreado (es decir, proyección de una solución de un metal pesado electrodenso en forma de chorro, desde un ángulo definido sobre la preparación), o técnicas de tinción negativas. El microscopio electrónico de barrido (SEM) tiene un límite práctico de resolución de aproximadamente  $0.005 \mu\text{m}$  o cinco veces menor que el del TEM. (16, 28).

Las muestras bacterianas deben ser fijadas in situ, evitando así procesos autolíticos cuidando de que el medio de fijación contenga las bacterias lo más "limpias" posibles, por lo que se recomienda lavar con amortiguador de fosfatos previo a la fijación con glutaraldehído, y proceder a realizar la técnica de tinción negativa.

### 1.3.1 TINCIÓN NEGATIVA

Esta técnica, que se emplea para las estructuras ultrafinas, implica la aplicación de soluciones de sales que contienen átomos de metales pesados, como fosfotungstato, fosfosilicato o molibdato de amonio. El material electrodenso es depositado sobre la muestra y forma un contorno delicado y finamente detallado de los componentes estructurales (28). El ácido fosfotúngstico se caracteriza por que tiñe alrededor de la membrana, permitiendo así poder observar en el microscopio electrónico de transmisión estructuras como membrana, flagelo, fimbrias, etc.

### 1.3.2 IMPORTANCIA DEL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO EN MICROBIOLOGÍA

Muchos de los progresos de la biología de los últimos cien años están estrechamente ligados a los avances del microscopio. El perfeccionamiento de este nos ha llevado a microscopios más sofisticado como el microscopio electrónico, que permite el examen directo de un nivel de estructura más fino que cualquier otro instrumento. Como resultado de las nuevas observaciones facilitadas por el microscopio electrónico, con el que se ha extendido enormemente nuestro conocimiento de la organización de los tejidos de las plantas y animales, además se han diversificado radicalmente muchas de nuestras ideas acerca del modo en que se han constituido las células y de como funcionan (18).

El conocer con detalle la ultraestructura de muchos microorganismos patógenos para el hombre ha permitido la elaboración de compuestos que inhiban su crecimiento, así como determinar a que nivel pueden afectar estos al patógeno. El objetivo de este trabajo es saber si *Caléndula officinalis* produce algún daño físico en la estructura de *Pseudomonas aeruginosa*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad antiséptica de *Caléndula officinalis* en *Pseudomonas aeruginosa*, evidenciado por medio de microscopía electrónica.

#### 2.1.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener el extracto crudo de *Caléndula officinalis* por medio de etanol 75°.
- Liofilizar el extracto de *Caléndula officinalis*.
- Enfrentar el extracto con *Pseudomonas aeruginosa* y observar su inhibición.
- Determinar si el efecto inhibitorio del extracto contra *Pseudomonas aeruginosa* es bacteriostático o bactericida.
- Utilizar el método de MTT (3-[4,5-dietiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoliobromida; azul de tiazolil) para determinar la inhibición.
- Evidenciar el daño producido por el extracto de *Caléndula officinalis* en *Pseudomonas aeruginosa* por medio de microscopía electrónica de transmisión.

## 2.2 JUSTIFICACIÓN

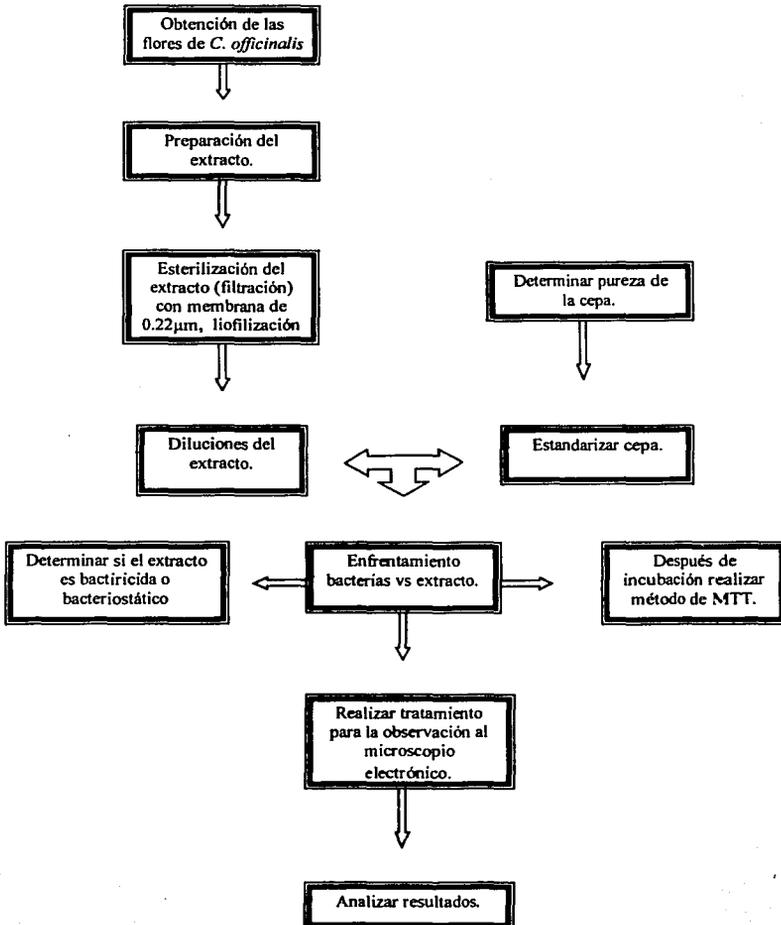
Las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* ocurren comúnmente en pacientes hospitalizados y representa una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes comprometidos por otras enfermedades (48).

*P. aeruginosa* es responsable del 10% de todas las infecciones hospitalarias observadas, 11% de todos los microorganismos aislados en sangre, y aproximadamente 4% de las epidemias hospitalarias. En servicios especializados, quemados o pacientes cancerosos, *P. aeruginosa* puede causar el 30% de todas las infecciones (30).

Muchos agentes antimicrobianos son inefectivos para el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa*, ya que es una bacteria que presenta multirresistencia a los antibióticos debido al mal uso de los mismos lo que ha originado que esta bacteria presente plásmidos de resistencia, por esta razón es que pacientes que sufren infecciones por *P. aeruginosa* pasan mucho tiempo incapacitados e incluso corren el riesgo de morir, ya que esta bacteria puede diseminarse a tejidos más importantes.

Por lo que los extractos de *Caléndula officinalis* pueden inhibir a bacterias patógenas como *Pseudomonas aeruginosa* y representar una alternativa para su tratamiento.

## DIAGRAMA: RESUMEN DE METODOLOGÍA



### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 OBTENCIÓN DE LAS FLORES DE *Caléndula officinalis*.

En Febrero del año 2000 se realizó un cultivo de la planta, sembrando cepellones en un área de 100 m<sup>2</sup> en la F.E.S.-Cauatitlán campo-4. En los meses de mayo a agosto se recolectaron las flores ligulares desarrolladas y se secaron los pétalos en una estufa a 56°C el tiempo necesario.

#### 3.2 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE *Caléndula officinalis*.

Se pesaron 5 g de los pétalos de la flor, agregando 500 ml. de etanol 75%, dejando en la obscuridad por 10 días con agitación diaria, realizando una filtración previa utilizando papel filtro (para eliminar impurezas de tamaño grande), esterilizando por filtración con membranas de 0.8, 0.45 y 0.22µ, y liofilizando (ver detalles de liofilización en el apéndice). Se elaboraron diluciones del extracto con SSF estéril como se muestra en la tabla 2:

**Tabla 2:** 3.3 DILUCIONES DEL EXTRACTO DE *Caléndula officinalis*.

Extracto ( ml )	Extracto ( mg )	SSF ( ml )	Dilución (%)
1	3.6	9	10
1.5	5.4	8.5	15
2.0	7.2	8.0	20
3.0	10.8	7.0	30

Para la prueba de esterilidad del extracto se tomo 3ml. e incubaron a 37° C durante 24 hrs, transcurrido el tiempo, se sembró 100 µl en agar sangre incubando a 37° C durante 24 hrs.

### **3.4 PURIFICACIÓN DE LA CEPA DE *Pseudomonas aeruginosa***

Se reactivo la cepa ATCC 15442 de *Pseudomonas aeruginosa*, sembrando en agar sangre e incubando a 37°C durante 24hrs. Para determinar pureza e identificación se realizaron las siguientes pruebas:

Gram (gram negativo)

Catalasa (+).

Oxidasa (+).

Reducción de nitratos a nitritos (+).

Acidificación de carbohidratos (OF) (glucosa) (oxidativo).

Descarboxilación de Lisina (-).

Producción de ureasa (+).

También se observó la pigmentación característica de la bacteria como piocianina y pioverdina que producen una coloración verde-azul y verde-amarillo respectivamente.

### **3.5 ESTANDARIZACIÓN DE LA CEPA DE *Pseudomonas aeruginosa***

Se estandarizaron 55 ml de caldo BHI con *Pseudomonas aeruginosa* comparando con el 0.5 del nefelometro de Mac Farland.

### 3.6 ENFRENTAMIENTO BACTERIAS-EXTRACTO (prueba cualitativa)

A cuatro tubos se les adicionó 5 ml de la cepa estandarizada más 5 ml del extracto al 10, 15, 20, 30% respectivamente y a un quinto tubo se le agregó 5 ml de la cepa estandarizada con 5 ml. de caldo BHI representando el control positivo. Para el control negativo se utilizó un tubo con 10 ml. de SSF. Toda la prueba fue elaborada por duplicado e incubando a 37° C durante 24 hrs.

### 3.7 MÉTODO DE MTT (3-[4,5-dietiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoliobromida; azul de tiazolil) (prueba cuantitativa)

El método de MTT nos indica la presencia de bacterias viables, debido a que estas producen una deshidrogenasa capaz de reducir el MTT a formazan cambiando el color de amarillo a violeta detectando este cambio espectrofotométricamente (5, 40). Debido a la sensibilidad y facilidad del método se decidió realizarlo, por lo que se procedió de la siguiente forma:

Una vez efectuado el enfrentamiento, a una placa de 96 pozos se adicionó 100 µl de la bacteria tratada con el extracto al 10, 15, 20, 30 % respectivamente, haciendolo por duplicado utilizando 8 pozos. De la misma forma fue agregado el control positivo (bacteria en caldo BHI) y el control negativo (SSF). Haciendo todo por duplicado. Se agregó a cada pozo 10 µl de MTT, incubando por 3 hrs a 37°C, adicionando 40 µl de ácido isopropílico, manteniendo en congelación durante 24 hrs, al final se utilizó un lector de ELISA el cuál produjo lecturas de absorbancia obtenidas a 560 nm.

### **3.8 PRUEBA PARA DETERMINAR SI EL EXTRACTO ES BACTERICIDA O BACTERIOSTÁTICO.**

Después de la prueba bacteria-extracto, se tomaron 10µl. de c/u de los tubos de las diluciones así como los controles y se sembraron en placas de agar sangre, difundiendo completamente con una varilla de vidrio, haciendo por duplicado la prueba e incubando a 37° C durante 24 hrs. Transcurrido el tiempo se contaron UFC de cada placa.

### **3.9 PREPARACIÓN PARA LA OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN.**

#### **3.9.1 FIJACIÓN**

Una vez realizado el enfrentamiento bacteria-extracto se centrifugo cada uno de los tubos a 2000 rpm durante 10 min., eliminando el sobrenadante y lavando tres veces con SSF. Se agregó 0.5 ml. de SSF mas dos gotas de glutaraldehído para fijar la muestra, manteniendo en reposo durante media hora. Se realizó una segunda centrifugación con las mismas condiciones ( 2000 rpm por 10 min) desechando el sobrenadante, al final se adicionó 0.5 ml de SSF.

• Toda la metodología anterior se realizó en condiciones de esterilidad

#### **3.9.2 TINCIÓN NEGATIVA**

Para la tinción negativa se resuspendió la muestra fijada agregando una gota de esta en una rejilla, (que previamente fue preparada con membrana plástica de fomvar para adsorber la muestra bacteriana a ésta) manteniendo en reposo durante 20 min.

Transcurrido el tiempo fue colocada con mucho cuidado la rejilla en una gota de agua destilada para eliminar exceso de muestra y evitar saturación. Se transfirió la rejilla a una gota de ácido fosfotúngstico a pH de 2.5, 7.1 y 10.5 para elegir el que producía mejor contraste, dejando en reposo a 1, 2, 3 y 4 min. determinando así el tiempo de tinción más adecuado para ésta bacteria. Una vez determinado el pH y el tiempo de tinción, se procedió a realizar la tinción negativa con ácido fosfotúngstico y las rejillas así obtenidas, se sacan y se observan en el microscopio electrónico de transmisión JEOL 100S, tomando fotos de bacterias en diferentes campos. Es importante mencionar que las bacterias control negativo (*P. aeruginosa* sin tratamiento) se procesaron también de esta manera.

**NOTA:** El material y equipo utilizado en este trabajo se menciona en el apéndice, así como la preparación de reactivos.

### 3.8 RESULTADOS

El extracto etanólico de *Caléndula officinalis* representa un problema para el enfrentamiento con *Pseudomonas aeruginosa*, debido a que el etanol es capaz de inhibir a dicha bacteria. por lo que se realizó una corrida de liofilización por medio del cuál se elimina el etanol y los resultados de inhibición seran exclusivos de los activos de la planta. Al término de la liofilización observamos un limitado rendimiento del extracto ya que se obtuvieron 3.6 mg / ml lo que hace pensar en una posibilidad de concentrar el extracto antes del secado por sublimación. sin embargo en los resultados obtenidos del enfrentamiento bacterias y extracto se observo que en la técnica en tubo o cualitativa, *P. aeruginosa* fue inhibida a partir de la dilución al 15 % equivalente a 5.4 mg del extracto (ver Tabla 2 ). mientras que en el método de MTT en microplaca o cuantitativa, *P. aeruginosa* fue inhibida en todas las diluciones. Para que esta prueba fuera cuantitativa leimos la absorbancia de las muestras a 560 nm. en un lector ELISA (para observar los resultados ver Tabla 3), pero como la prueba se realizó por duplicado, determinamos el promedio de ambas lecturas, calculando las medias de cada dilución de los controles positivo y negativo, con el propósito de tener un sólo resultado representativo de cada dilución. (ver Tabla 4), en esta misma tabla aparece la desviación estándar promedio (método útil para determinar la variación de los datos y por ende la precisión en la experimentación así como la reproductibilidad (48)) y el intervalo de confianza con dos desviaciones estándar (el cuál nos indica que el intervalo contendrá el 95 % de los valores de la media, y los que estén fuera de este serán datos no confiables y por lo tanto errores en el procedimiento (48)).

**Tabla 2:** Diluciones del extracto de *Caléndula officinalis*.

Extracto ( ml )	Extracto ( mg )	SSF ( ml )	Dilución (%)
1	3.6	9	10
1.5	5.4	8.5	15
2.0	7.2	8.0	20
3.0	10.8	7.0	30

**Tabla 3 :** Lecturas de absorbancia del efecto inhibitorio cuantitativo del extracto de *Caléndula officinalis* a diferentes diluciones contra *Pseudomonas aeruginosa* (por duplicado). Método de MTT.

	Control (-)		Control (+)		10%		15%		20%		30%	
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2
A	0.11	0.037	2.629	2.661	0.61	0.568	0.453	0.611	0.548	0.497	0.497	0.558
B	0.24	0.14	2.717	2.483	0.65	0.568	0.628	0.499	0.533	0.65	0.495	0.531
C	0.237	0.097	3.826	2.645	0.671	0.626	0.618	0.665	0.609	0.7	0.519	0.524
D	0.217	0.082	2.602	4.128	0.708	0.74	0.684	0.594	0.647	0.699	0.527	0.582
E	0.076	0.115	4.162	3.394	0.821	0.806	0.588	0.58	0.619	0.663	0.544	0.665
F	0.147	0.133	2.356	3.413	0.805	0.677	0.588	0.574	0.683	0.667	0.558	0.707
G	0.187	0.069	4.338	3.008	0.751	0.662	0.566	0.491	0.678	0.63	0.508	0.602
H	0.18	0.04	2.991	2.33	0.585	0.502	0.535	0.429	0.487	0.469	0.508	0.751
media	0.1742	0.0891	3.202	3	0.7	0.6436	0.5825	0.555	0.6005	0.6218	0.5195	0.615

**Tabla 4 :** Promedio de las absorbancias del método de MTT en microplaca del enfrentamiento de *Caléndula officinalis* y *Pseudomonas aeruginosa*, así como la media promedio, la desviación estándar promedio y el intervalo de confianza con dos desviaciones estándar.

	Control (-) promedio	Control (+) promedio	10 % promedio	15 % promedio	20 % promedio	30 % promedio
A	0.073	2.645	0.589	0.532	0.522	0.527
B	0.19	2.6	0.609	0.563	0.591	0.513
C	0.167	3.235	0.648	0.6415	0.654	0.521
D	0.1495	3.365	0.724	0.639	0.673	0.554
E	0.095	3.778	0.813	0.584	0.641	0.604
F	0.14	2.884	0.741	0.581	0.675	0.632
G	0.128	3.673	0.706	0.528	0.654	0.555
H	0.11	2.66	0.543	0.482	0.478	0.629
$\bar{X}_p$	0.1316	3.1	0.6718	0.5687	0.6109	0.5668
$S_p$	$5.75 \times 10^{-3}$	0.6938	0.0991	0.0759	0.0692	0.0626
$\bar{X} \pm 2S$ (I. C)	0.1201 0.1431	1.7124 4.487	0.4806 0.8628	0.4167 0.7203	0.4725 0.7493	0.442 0.6924

 $\bar{X}_p$  = media promedio. $S_p$  = desviación estándar promedio. $\bar{X} \pm 2S$  (I. C) = Intervalo de confianza con dos desviaciones estándar.

Para corroborar con los resultados de la Tabla 4 se realizó una gráfica en la que se representa el porcentaje de inhibición comparado con el de crecimiento en función del porcentaje de las diluciones del extracto de *C. officinalis* enfrentado con *P. aeruginosa* (ver Gráfica 1). Para obtener el porcentaje de crecimiento de cada dilución, se multiplicó la media promedio por 100% entre 3.1 que fue la media promedio del control positivo y para determinar el porcentaje de inhibición únicamente se calculó la diferencia de 100 (que es el 100 % de crecimiento) menos el porcentaje de crecimiento de cada una de las diluciones (ver Tabla 5 y 6).

**Tabla 5:** Porcentaje de crecimiento del enfrentamiento de *Caléndula officinalis* contra *Pseudomonas aeruginosa* por el método de MTT en microplaca.

Diluciones	Control (+)	10 %	15 %	20 %	30 %
% de crecimiento	100	21.60	18.30	19.70	18.20

El % de crecimiento se determinó de la siguiente forma :

$$\% \text{ de crecimiento} = \frac{(\text{medias promedio de las dil.}) (100\%)}{3.1}$$

3.1 = media promedio del C (+)

**Tabla 6 :** Porcentaje de inhibición del enfrentamiento de *Caléndula officinalis* contra *Pseudomonas aeruginosa* por el método de MTT en microplaca.

Diluciones	Control (+)	10 %	15 %	20 %	30 %
% de inhibición	0	78.40	81.70	80.30	81.80

El % de inhibición se determinó de la siguiente forma :

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \% \text{ de crecimiento de cada dilución.}$$

En la prueba para determinar si el extracto es bactericida o bacteriostático encontramos que en la dilución al 10 % *C. Officinalis* produce un efecto bacteriostático contra *P. officinalis*, ya que después de la incubación el número de UFC en la placa de agar sangre fueron incontables, pero en las diluciones al 15, 20 y 30 % no hubo crecimiento de bacterias, por lo que *C. officinalis* ha estas concentraciones se comporta como bactericida contra *P. aeruginosa* (recordando que *P. aeruginosa* fue utilizada en todas las pruebas estandarizada con el 0.5 del nefelometro de Mac Farland) (ver Tabla 7).

**Tabla 7:** Resultados de la determinación del efecto bactericida o bacteriostático del extracto de *Caléndula officinalis* con *Pseudomonas aeruginosa*.

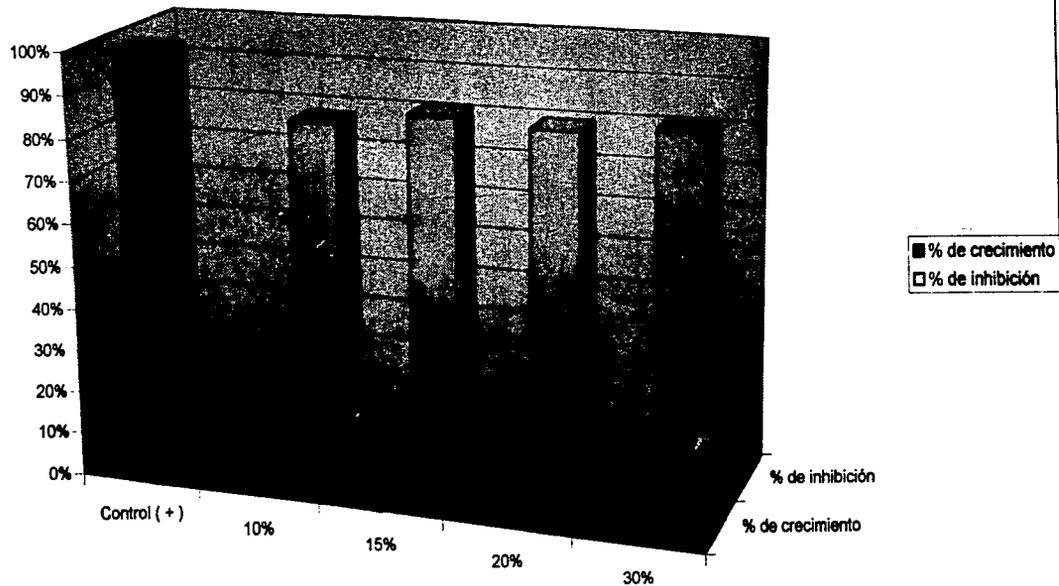
Diluciones	Control (-)	Control (+)	10 %	15 %	20 %	30 %
No. de colonias	0	Incontables	Incontables	0	0	0

En la preparación previa a la observación al microscopio electrónico se consideraron varios aspectos para lograr una buena visualización de las bacterias, tales como la variación en el pH del ácido fosfotúngstico para lograr un mejor contraste en la tinción negativa, así como el tiempo de contacto de la *Pseudomonas aeruginosa* con este reactivo para evitar que la tinción excesiva provocara una disminución en la definición de la estructura bacteriana, encontrando que las condiciones óptimas para esta bacteria fueron : pH = 7.2 y 1 min de tiempo de contacto.

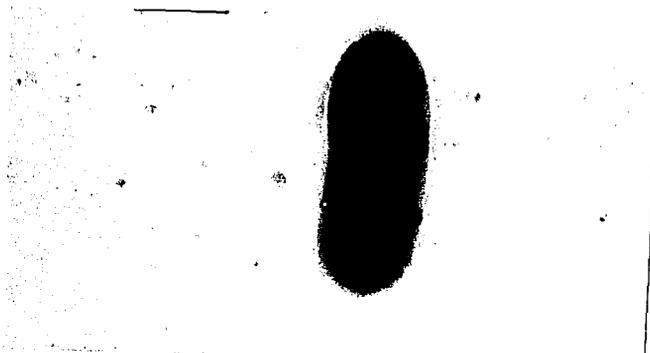
Los resultados fueron satisfactorios debido a que se observan diferencias significativas en las muestras tratadas y las no tratadas. En las fotografías 1, 3, 5, y 7

(bacterias control ) se pueden ver estructuras bien definidas de la bacteria, al contrario de las fotografías 2, 4, 6 y 8 en las que además de no tener una estructura normal se observan protuberancias considerables.

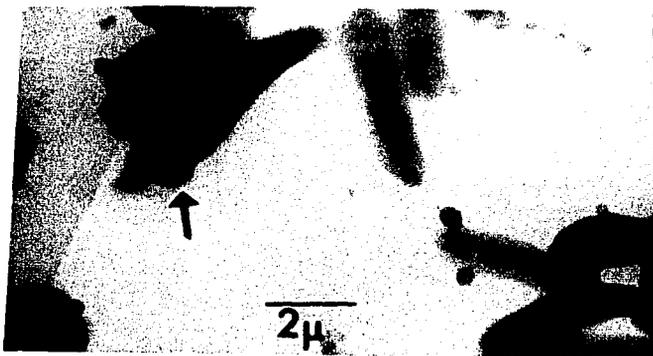
Gráfica que muestra el efecto del extracto de *Caléndula officinalis* a diferentes diluciones contra *Pseudomonas aeruginosa*, técnica en microplaca.



Determinación del efecto de *C. officinalis* en *P. aeruginosa*.



**Fotografía 1** Microfotografía electrónica de transmisión con tinción negativa (10,000 magnificaciones), de *Pseudomonas aeruginosa* control. Nótese la estructura definida de la bacteria. Fotografía tomada por el Tec. Rodolfo Robles Gómez.

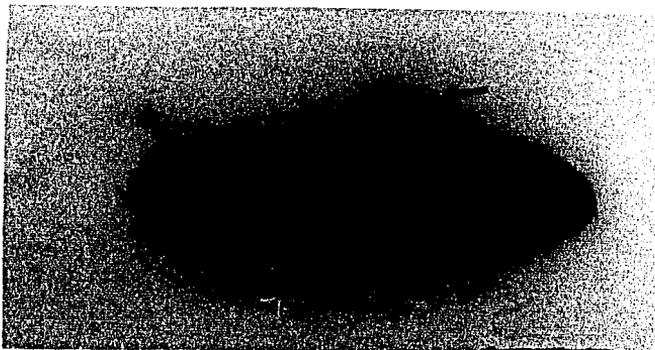


**Fotografía 2** Microfotografía electrónica de transmisión con tinción negativa (7,000 magnificaciones), de *Pseudomonas aeruginosa* tratada con el extracto de *Caléndula officinalis* al 10%. Obsérvese las protuberancias que presentan algunas de las bacterias. Fotografía tomada por M. en C. Sofia González Gallardo.

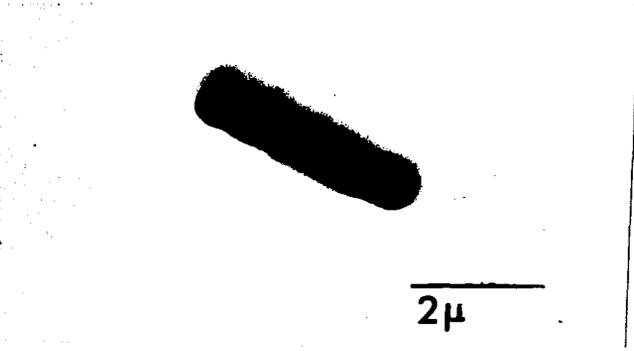
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



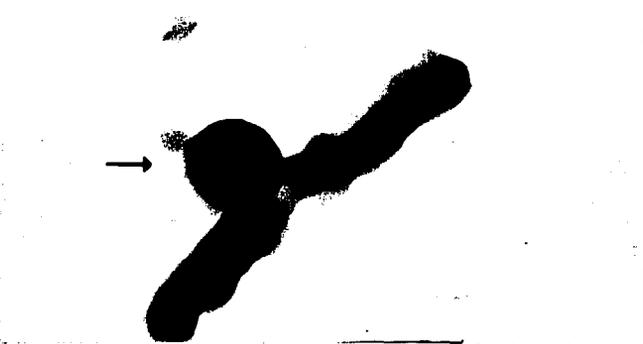
**Fotografía 3** Microfotografía electrónica de transmisión con tinción negativa (10,000 magnificaciones), de *Pseudomonas aeruginosa* control. Ambas bacterias presentan estructuras normales. Fotografía tomada por el Tec. Rodolfo Robles Gómez..



**Fotografía 4** Microfotografía electrónica de transmisión con tinción negativa (10,000 magnificaciones y aumentada en la impresión), de *Pseudomonas aeruginosa* tratada con el extracto de *Caléndula officinalis* al 15 %. Obsérvese la protuberancia que se presenta en la parte superior de la bacteria. Fotografía tomada por M. en C. Sofía González Gallardo.



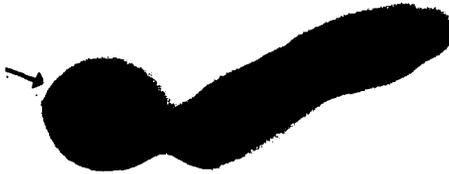
**Fotografía 5** Microfotografía electrónica de transmisión con tinción negativa (10,000 magnificaciones) de *Pseudomonas aeruginosa* sin tratamiento con *Caléndula officinalis*. No se observa ninguna alteración en la pared. Fotografía tomada por el Tec. Rodolfo Robles Gómez.



**Fotografía 6** Microfotografía electrónica de transmisión con tinción negativa (10,000 magnificaciones) de *Pseudomonas aeruginosa* tratada con el extracto de *Caléndula officinalis*. La bacteria en aparente división presenta una pared no definida, además de una protuberancia considerable. Fotografía tomada por M. en C. Sofía González Gallardo.



**Fotografía 7** Microfotografía electrónica de transmisión con tinción negativa (10,000 magnificaciones), de *Pseudomonas aeruginosa* control. Nótese que la estructura bacteriana se observa definida. Fotografía tomada por el Tec. Rodolfo Robles Gómez.



**Fotografía 8** Microfotografía electrónica de transmisión con tinción negativa (10,000 magnificaciones), de *Pseudomonas aeruginosa* enfrentada con el extracto de *Caléndula officinalis*. Obsérvese una protuberancia muy grande que presenta la bacteria en uno de sus extremos. Fotografía tomada por el Tec. Rodolfo Robles Gómez.

#### 4. DISCUSIÓN

Se ha comprobado que el extracto etanólico de *C. officinalis* es más efectivo en la inhibición de bacterias tales como *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*, en comparación con los extractos acuosos e hidroacetónicos (Dumenil y cols., 1980). Sin embargo debido a que el etanol produce efectos antisépticos, se decidió eliminarlo liofilizando y resuspendiendo el sólido con SSF estéril, con esto aseguramos de que el efecto que se presentó en la bacteria fue debido a los activos de *Caléndula officinalis*. El rendimiento del extracto obtenido después de la liofilización fue de 3.6 mg/ml., el cuál podría considerarse poco a comparación con el reportado por Dumenil y cols., 1980. (50 mg/ml.) sin embargo en el presente trabajo fue suficiente para inhibir a *Pseudomonas aeruginosa* en la prueba cuantitativa (método de MTT), lo que nos hace pensar que las condiciones para el desarrollo de los activos de la planta tales como altitud, temperatura, etc. (45), fueron muy favorables.

En la prueba cualitativa el extracto de *C. officinalis* produce un efecto inhibitorio sobre *P. aeruginosa* a partir de la dilución al 15 % (5.4 mg/ml.) a diferencia de la prueba cuantitativa en la que la inhibición se presenta desde la dilución al 10 % (3.6 mg/ml.), no habiendo diferencias significativas en los porcentajes de inhibición (presentados en la Gráfica 1), por lo que podemos decir que estos últimos datos son más confiables debido a que el método de MTT nos indica la cantidad de bacterias presentes, por que las mitocondrias producen una enzima deshidrogenasa que reduce al MTT a formazan cambiando de color amarillo a violeta (5, 40) el cuál es detectado espectrofotométricamente y los cambios son reproducidos en este caso por un lector ELISA por lo que es un método muy sensible. también ha demostrado ser muy eficiente y rápido en la detección de células viables, como se demuestra en los trabajos para validar la vacuna de BCG realizado y especificado por la Organización Mundial de la Salud (Santam K. Kairo y cols. 1999).

Los intervalos de confianza con dos desviaciones estándar obtenidos de las lecturas espectrofotométricas nos ponen de manifiesto que no hay valores de la media promedio que se encuentren fuera de este intervalo. indicándonos un procedimiento confiable y reproducible.

Los resultados de la prueba cuantitativa son corroborados con la observación de las bacterias en el microscopio electrónico el cuál nos pone en evidencia a las bacterias tratadas con el extracto desde la dilución al 10 % a diferencia de los controles. se observan estructuras afectadas a nivel de la pared celular.

En la determinación del efecto bactericida o bacteriostático observamos que a diluciones del 15, 20, y 30 % las bacterias tratadas ya no crecieron en agar sangre. mientras que con el extracto al 10 % las colonias fueron incontables, por lo que podemos decir que *Caléndula officinalis* produce un efecto bacteriostático al 10 % mientras que a partir de la dilución al 15 % es bactericida sobre *Pseudomonas aeruginosa*, demostrando que ha bajas concentraciones el extracto produce un efecto bactericida, siendo esta una cuestión muy conveniente en el aspecto económico principalmente.

Con respecto a la microscopia electrónica podemos mencionar que TEM nos puso de manifiesto el daño producido por *Caléndula officinalis* en *Pseudomonas aeruginosa*, debido a que las fotografías nos revelan deformidades en la estructura de las bacterias tratadas, tales como protuberancias de formas esféricas, lo que nos hace pensar en esferoplastos. ya que estos se presentan en bacterias gramnegativas que han sido tratadas con agentes como lisozima que ataca al péptidoglucano hidrolizando el enlace que une el ácido N-acetilmurámico con el carbono cuatro de la N-acetilglucosamina, o las penicilinas que inhiben la síntesis de peptidoglucano y son capaces de alterar la pared de la bacteria conservando gran parte de esta, reteniendo los componentes de la

membrana externa pero dando lugar ha esta forma esférica peculiar (35), por lo antes mencionado deducimos que *Caléndula officinalis* produce el mismo efecto que la lisozima o la penicilina sin saber aun el mecanismo de acción de la planta. Cabe mencionar que no se han realizado trabajos al respecto por lo que se sugiere un estudio más a fondo dirigido al daño que provoca *C. officinalis* en *Pseudomonas aeruginosa*.

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria de importancia médica en pacientes comprometidos inmunológicamente por lo tanto el efecto inhibitorio que causa el extracto de *Caléndula officinalis* en esta bacteria.. podría proponerse como una alternativa de tratamiento local de heridas infectadas en estos enfermos.

## 5. CONCLUSIONES

- Se obtuvo un extracto etanólico de *Caléndula officinalis*.
- *C. officinalis* ejerce un efecto inhibitorio sobre *P.aeruginosa* en la prueba cualitativa a partir de la dilución al 15 % del extracto.
- El método de MTT demostró la inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* en la primera dilución del extracto de *Caléndula officinalis*.
- El extracto es bacteriostático sobre la bacteria al 10 % de su dilución, y bactericida a partir del 15%.
- El microscopio electrónico de transmisión fue de utilidad para evidenciar el daño que produce el extracto sobre la bacteria a nivel de la pared.
- El extracto de *Caléndula officinalis* puede ser una alternativa de tratamiento en heridas quirúrgicas o quemaduras infectadas con *Pseudomonas aeruginosa*.

## 5.1 APÉNDICE

### MATERIAL Y EQUIPO

Autoclave Presto.  
Parrilla con agitador.  
Termómetro.  
Agitadores magnéticos.  
Gradilla.  
Mecheros Bunsen.  
Microscopio óptico Westover.  
Porta objetos y cubre objetos.  
Tubo estándar 0.5 de McFarland.  
Papel filtro.  
Vasos de pp de 100, 500 y 1000 ml.  
Embudo de vidrio.  
Balanza granataria.  
Bomba de vacío.  
Filtro milipore con membrana.  
Tubos de ensaye 100 x 15, 85 x 13 mm  
Estufa bacteriológica Riossa.  
Frascos pequeños con tapa.  
Parafilm.  
Etiquetas  
Matraces Erlenmayer ( 250 ml. y 500 ml.).  
Probetas ( 1 lt., 100 ml. y 500 ml. ).  
Pipetas ( 3, 5, 10 ml.).  
Cajas Petri.  
Micropipetas ( 100 y 1000  $\mu$  ).  
Membranas milipore ( 0.8, 0.45 y 0.022  $\mu$  ).  
Filtro.  
Microscopio electrónico de transmisión ( JEM-1005 ).  
Microscopio electrónico de barrido ( JEOL JSM-25S II ).  
Rejillas porta especímenes.  
Membrana de soporte.  
Centrifuga.  
Refrigerador G.E.  
Secador a punto critico Samdri.  
Fine coat ion sputter JFC-1100.  
Propipetas.  
Placas con 96 pozos fondo plano.  
Elisometro.  
Liofilizadora (Labonco mod. 79 480, labonco mod. 77520, Rotary Vacuum Pumps E2M5).

## REACTIVOS

Reactivos para tinción de Gram.

Etanol (70%, 75%, 80%, 95%, absoluto).

Agua destilada.

Agar Muller-Hilton.

Caldo BHI.

Solución Salina Fisiológica (SSF).

Ácido fosfotúngstico.

Glutaraldehído.

Agar sangre.

MTT.

Ácido isopropílico.

Fenol.

Bióxido de carbono.

Reactivos fotográficos

## MATERIAL BIOLÓGICO

Cepa de *Pseudomonas aeruginosa*  
ATCC 15 442.

Hojas de flor de *Caléndula officinalis*.

## GRAM :

- 1) Se hace un frotis delgado de *Pseudomonas aeruginosa* y se deja secar al aire.
- 2) Se fija la bacteria al portaobjetos, pasandolo a través de la flama de un mechero.
- 3) Se cubre la superficie con solución de cristal violeta.
- 4) Después de 1 min. de exposición con el reactivo anterior se lava con agua destilada.
- 5) Se cubre con solución de yodo durante 1 min. y se lava.
- 6) Se sostiene el frotis entre los dedos pulgar e índice y se cubre la superficie con unas gotas de colorante de alcohol o acetona hasta que no desprenda más color violeta.
- 7) Se lava con agua corriente y se cubre con contratinción de safranina durante 1 min. y se lava
- 8) Se deja secar y se examina el frotis al microscopio (29).

## CATALASA :

- 1) Poner una pequeña porción de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* sobre un porta objetos.

- 2) Añadir unas gotas de  $H_2O_2$ .
- 3) Observar si hay producción de burbujas ( si se produce burbujas la prueba es positiva)

(46)

#### **OXIDASA :**

Utilizando discos comerciales impregnados de tetrametil de p-fenilendiamina (que sustituye al oxígeno como aceptores de electrones). se dispersa una asa de la colonia en la zona con reactivo del papel filtro.

En estado reducido el colorante es incoloro: sin embargo, en presencia de cotocromooxidasa y oxígeno atmosférico, la p-fenilendiamina es oxidada, y forma azul de indofenol, por lo que sí el cambio se presenta en 10 seg. es positivo, pero debe tenerse cuidado de no usarse asas o alambres de acero inoxidable o Nichrome para esta prueba por que productos de oxidación superficial formados al esterilizar el asa o alambre con la llama de un mechero pueden dar como resultado reacciones falso-positivas (29).

#### **REDUCCIÓN DE NITRATOS A NITRITOS.**

Se inocula el medio de nitrato (caldo o agar, extracto de carne, peptona y nitrato de potasio) con un asa de *Pseudomonas aeruginosa* aislada en cultivo puro en agar y se incuba a 35° C durante 24 hrs. Al terminar la incubación, se agrega 1 ml. de cada uno de los reactivos A (alfa-naftilamina, ácido acético 5N al 30%) y B (ácido sulfanílico, ácido acético 5N al 30%) al medio de prueba en ese orden.

La aparición de color rojo en los 30 segundos posteriores al agregado de los reactivos indica la presencia de nitritos (29).

## UREASA.

El caldo de urea de Stuart y el agar urea de Christensen son los medios utilizados con más frecuencia en los laboratorios clínicos para la detección de actividad de ureasa.

Se inocula el caldo con una asa del cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* y se siembra la superficie en pico de flauta de agar con la bacteria. Ambos medios se incuban a 35° C durante 24 hrs.

Los microorganismos que hidrolizan urea pueden dar reacciones positivas rápidas en 1 o 2 hrs.

Caldo Stuart ----- Color rojo en todo el medio indica alcalinización e hidrólisis de urea.

Agar de Christensen --- Hidrolizadores rápidos de urea color rojo en todo el medio. Hidrolizadores lentos de urea color rojo en un principio en pico de flauta que de forma gradual se extiende a todo el medio. No hidrólisis de urea, el medio conserva su color amarillo (29).

## DESCARBOXILACIÓN DE LISINA.

A partir de una colonia bien aislada de la bacteria recuperada previamente en agar de aislamiento primario, se inoculan dos tubos con medio de Moeller, uno con el aminoácido a evaluar ( lisina ) y el otro control sin el aminoácido, se cubren los tubos con aceite mineral estéril hasta 1 cm. Por encima de la superficie y se incuban a 35°C. Durante 24 hrs.

La aparición de color amarillo en el tubo control indica que el microorganismo es viable y que el pH del medio ha disminuido en forma suficiente como para activar la descarboxilación. La reaparición de un color azul – púrpura en el tubo que contiene al aminoácido indica una prueba positiva debido a la liberación de aminas por la reacción de descarboxilación (29).

### ACIDIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS (OXIDACIÓN – FERMENTACIÓN)

Se requieren dos tubos, cada uno inoculado con la bacteria, usando una aguja recta punzando el medio 1 o 2 veces hasta el fondo del tubo. Un tubo de cada par se cubre con una capa de 1 cm. de aceite mineral estéril, dejando el otro tubo abierto al aire. Ambos tubos se incuban a 35° C. y se examinan a diario durante varios días.

La producción de ácidos se detecta por la aparición de un color amarillo. En el caso de m.o. oxidativos, la producción de color puede verse primero cerca de la superficie del medio. Los siguientes son los patrones de reacciones (29):

Tubo abierto	Tubo cerrado	Metabolismo
ácido (amarillo)	alcalino (verde)	oxidativo
ácido (amarillo)	ácido (amarillo)	fermentativo
alcalino (verde)	alcalino (verde)	no sacarolítico

### DENITRIFICACIÓN – FLUORESCENCIA

Se inocula el medio FN( proteasa peptona no. 3 disco, sulfato de magnesio 7 H<sub>2</sub>O, fosfato dipotásico, nitrato de potasio, nitrato de sodio, agar y agua destilada) punzando la profundidad con una suspensión abundante del cultivo y haciendo luego estrias en el pico de flauta. Se incuba a 35° C. durante 24 hrs.

Se examina el tubo en busca de fluorescencia con una fuente de luz ultravioleta (lampara de Wood). Un brillo amarillo – verde constituye una prueba positiva.

La presencia de burbujas de gas en la profundidad del medio indica que se ha producido gas nitrógeno por denitrificación (29).

### LIOFILIZACIÓN :

1) Colocar 1 ml. del extracto ( estéril por filtración ) en un vial de 5 ml.

2) Congelar para posteriormente liofilizar a los siguientes segmentos:

Segmento 1. -34 °C durante 3 hrs.

Segmento 2. 10 °C durante 10.1 hrs.

Segmento 3. 30 °C durante 7 hrs.

3) Terminada la corrida se sacan los viales y se encasquillan.

### PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS :

#### Agar BHI ( Bioxon de México, S.A. de C.V. )

- 1) Disolver 37 g. de material deshidratado en 1 lt. de agua destilada.
- 2) Esterilizar en autoclave a 121°C y 15 libras de presión de vapor durante 15 min.
- 3) Distribuir en cajas petri.

#### Agar Sangre ( Bioxon de México, S.A. de C.V. )

- 1) Suspender 40 g. de polvo en 1 lt. de agua destilada.
- 2) Dejar reposar durante 5 min. y mezclar bien hasta obtener una suspensión uniforme.
- 3) Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un min.
- 4) Agregar la sangre de carnero al 5%.
- 5) Esterilizar a 121°C a 15 libras de presión, (en porciones de 100 ml. ) durante 20 min. y distribuir en placas.

Caldo BHI ( Bioxon de México, S.A de C. V. )

- 1) Disolver 37 g. de material deshidratado en 1 lt. de agua destilada.
- 2) Distribuir en tubos.
- 3) Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 libras de presión de vapor durante 15 min.

MTT ( 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolobromida; Tiazolil azul).

- 1) Disolver 5mg/ml de MTT en RPMI-1640 rojo de fenol.
- 2) Filtrar con membrana de 0.2 µm.
- 3) Guardar a una temperatura de 4°C ( 3.2 ).

SSF estéril

- 1) Por cada 100 ml de solución agregar 850 mg. de NaCl.
- 2) Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 libras de presión, durante 15 min.

Ácido fosfotúngstico (AFT).

El ácido fosfotúngstico es una solución al 2 % ajustada al pH deseado mediante NaOH 1N.

Glutaraldehído.

Buffer: Sol. A.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  0.2M  $\longrightarrow$  35.61g.

Disolver en agua destilada hasta un volumen final de 1000 ml.

Sol. B.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  0.2 M  $\longrightarrow$  31.21 g.

Disolver en agua destilada hasta un volumen final de 1000 ml.

Para preparar 50 ml. de solución amortiguadora pH = 7.2, 0.2 M mezclar:

36 ml. de la sol. A + 14 ml. de la sol. B

Fijador: 50ml de Amortiguador de fosfatos al 0.2 M

6.0ml. de Glutaraldehído en agua al 25 %.

44 ml. de agua destilada.

Concentración final del aldehído 1.5 %

## 5.2 REFERENCIAS

1. Bert, F. I. "Comparative activity of B-lactams against *Pseudomonas aeruginosa* according to resistance fenotypes", en: Pathologic Biologic. 1996; **44**(6), 329-332.
2. Boyd, R. "Medical microbiology". 3ª edición. Little Brow. U.S.A. 1984. 753.
3. Brock, T. D. "Microbiología". 2ª edición. Prentice-Hall. U.S.A 1989. 231-411.
4. Burnet, B. "*Caléndula officinalis*", en: Mother Earth News. U.S.A. 2001; **184**, 29-32.
5. Carmichael, J. "Manual de compuestos orgánicos bioquímicos para investigación y reactivos de diagnóstico". Sigma Chemical Company. 1995. 1671.
6. Clark, P. H. y Richman, M. H. "Genetics and biochemistry of *Pseudomonas*". 3ª edición. John Wiley and Sons. England. 1985. 37-60.
7. Della, R., Tubaro, A., Sosa, S., Becker, H. y Saar, S. "The role of triterpenoids in the tropical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers", en: Planta Medica. 1994; **60** (6), 516-520.
8. Davis. E. Charles. "Disease and medical microbiology". W. S. Sanders. 2ª edición. Philadelphia. 1986; 162.
9. Delaat, Adrian. "Microbiología". 2ª edición. Interamericana. México 1983. 176-181.
10. Dumenil, G., Chemli, R. y Balansard, G. "Evaluation of antibacterial properties of *Calendula officinalis* flowers and mother homeopathic tinctures of *Calendula officinalis*", en: Annales Pharmaceutiques Francaises. 1980; **38** (6), 493-499.

11. Drusano, G. L., Lowbury, J., Edward y Stainer, R. Y. "Emergence of resistance to carbapenem antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*", en: Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1992; 24 (Supl. A) : 161-167.
12. "Farmacopea Homeopática de los Estados Unidos Mexicanos". 3ª edición. México 1998. 75.
13. Freeman, A. Bob. "Tratado de microbiología de Burrows". 21ª edición. México 1983. 613-615.
14. Gall, Enrica., Silver, Simon y Withalt, Bernard. "*Pseudomonas* molecular biology and biotechnology", en: American Society for Microbiology. 1992; 18, 146-152.
15. González, C.A. "Actualización de farmacología terapéutica". 3ª edición Interamericana. Argentina. 1985. 126.
16. González, F. Rafael. "Técnicas de microscopía electrónica en biología". Aguilar, Madrid España 1989. 127.
17. Gradwohl, S. A. "Métodos y diagnósticos de laboratorio clínico". 8ª edición. Médica Panamericana. Argentina. 1983; 2 (5), 1777-1806.
18. Grimstone, A.V. "El microscopio electrónico en biología". Omega. Barcelona, España 1981. 1, 14.
19. Halloran, Kathleen. "*Calendula officinalis* flowers", en: Organic Gardening. U.S.A. 2000; 47, 21.
20. <http://www.Calendula> (marigold)-Mother Nature.com.HealthEncyclopedia.

21. <http://www.c2000Kennethtodar@mailto:Kgtodar@factsaff.wisc.edu>, University of Wisconsin Madison.
22. <http://www.members.tripod.es/dbg/hierbas-1.html>
23. <http://www.mexicodesconocido.com.mx/hierbas/2056.html>.
24. [http://www.paisvirtual.com/salud/medicina/plantas/formas de uso.html](http://www.paisvirtual.com/salud/medicina/plantas/formas%20de%20uso.html).
25. <http://www.paisvirtual.com/salud/medicina/plantas/constituyentes.htm>
26. Jarvis, W. R. y Martone, W. J. "**Pathogenic prevail in infections intra-hospital**". J. Antimicrobial Chemother. 1991. **29** (suppl A): 19-24.
27. Jawets, Ernest. "**Review of medical microbiology**". 17ª edición. Apleton Alanch. Conneticut, U.S.A. 1987. 608.
28. Joklik, Wolfgangik. "**Microbiología**". 18ª edición. Panamericana. Buenos Aires, Argentina 1993. 728-732.
29. Koneman, W. Elmer., Stephen, D. Allen. y Dowell, V.R. "**Diagnostico microbiológico**". 2ª reimpresión Medica Panamericana. México 1998. 158-169,533.
30. Méndez, Francisco. "**Microbiología médica**". Asociación Mexicana de Profesores de Microbiología y Parasitología en Escuelas de Medicina. México 1981. 520-527.
31. Moody, J. A. y Peterson, L. R. "**Antimicrobial resistance in the E.E.U.U status report**", en: Journal of Pharmacy and Pharmacology. U.S.A. 1996; **20**: 30-37.

32. Murray, R. G. **"Bergey's manual of sistematic bacteriology"**. Williams and Wilkins. Baltimore U.S.A. 1984. 165
33. Ponce Samuel. **"Manual de prevención y control de infecciones intrahospitalarias"**. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Glaxo 1995; 5 32-33.
34. Popoca, Jovita., Aguilar, Abigail. y Alonso, Daniel. **"Citotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine"**, en: Journal of Ethnopharmacology. 1998; 59, 173-177.
35. Prescott, M. Loring. **"Microbiología"**. 4ª edición. McGraw-Hill. Interamericana. España. 1999. 58.
36. Ramírez, G. A. **"Resistencia antimicrobiana"**. Infectología. México 1997; 4: 171-173.
37. Ramos, A., Edreira, E., Vizoso, A., Betancourt, J. y López, M. **"Genotoxicity of an extract of *Calendula officinalis*"**, en: Journal of Ethnopharmacology. 1998; 61, 49-55.
38. Romero, C. Raúl. **"Microbiología y parasitología humana"**. 2ª edición. Panamericana. México 1999. 332-333.
39. Sanders, C. y Sanders, W. E. **"Microbial resistance to newer generation beta-lactam antibiotics: clinical and laboratory implications"**, en: Journal Infectology. Disease. 1995; 151: 339-343.
40. Santam, K. Kairo., Bedwell, Joanne., Tyler, C. Paul., Carter, Ann y Corbel, J. Michael. **"Development of a tetrazolium sale assay for rapid determination of viability of BCG vaccines"**, en: Vaccine. 1999; 17, 2423-2428.

41. Seeley, W. Harry. "Microbios en acción". 2ª edición. Blume. Madrid, España 1973. 32, 95, 102.
42. Silver, Simon., Trias, Joaquim y Nikaido, Hiroshi. "Pseudomonas biotransformations, pathogenesis and evolving biotechnology". Washington, U.S.A 1990. 319-321.
43. Slack, J. M. "Bacteria and human diseases". Year Book Medical. London 1988. 311.
44. Tomatsu, A. Masuyoshi, Evans, Kelly y Poole, Keith. "Antimicrobial resistance clinical recognition and appropriate therapy", en: Journal. Antibiotics. 1992; 17: 441-448.
45. Trease, E. George y Evans, C. William. "Farmacognosia". 3ª edición. Continental. México 1984.
46. Tuxqui, T. Elizabeth., Cabrera, S. Enequina y Fonseca, S. Edgar. "Actividad antiséptica de *Caléndula officinalis* en cepas de *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y *Candida albicans* in vitro", en: La Homeopatía en México. 1996, 2, 35-46.
47. Voutinas, D. y Mavroudis, T. "Comparison of it activity in vitro in Cefepim front cultivate multiresistances of *Pseudomonas aeruginosa*", en: Microbial Infectology. 1994; 8, 917-919.
48. Wayne, W. Daniel. "Bioestadística" 35ª edición. Limusa Noriega. México 1990. 139-142.
49. Wise, R. Lockley. "The pharmacokinetics and tissue penetration of impenem", en: Journal Antimicrobial Chemother, 1992; 18: (suppl. E). 93-105.

50. Youmans, G. P., Peterson, P. M. y Samoners, H. M. "Manual de infectología". 2ª edición. Interamericana. México 1982; 2: 842-843
51. Zahra, Amirghofran., Azadbakht, Mohammed y Karimi, H. Mohammed. "Evaluation the immunomodulatory effects of five herbal plants", en: Journal of Ethnopharmacology. 2000; 72: 167-172.