



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL
EXTRACTO DE *Styrax benzoin Dryander* (BENJUÍ) EN 10
BACTERIAS QUE COMUNMENTE SE ASOCIAN A INFECCIONES
DE HERIDAS HUMANAS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ALEJANDRA JAZMÍN MURILLO SALGADO

ASESORES: M.V.Z GERARDO CRUZ JIMÉNEZ

M.V.Z. JOSE ANTONIO LICEA VEGA

M. EN C. SOFÍA GONZALEZ GALLARDO



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.

AGRADECIMIENTOS

A ti Mamá Olivia Salgado Longines te agradezco primero el haberme permitido estar en tu vida, gracias por cuidarme y educarme, gracias por desvelarte conmigo cuando ya no podía más. Tú siempre me has alentado a seguir adelante, a nunca conformarme y a que si se puede hacer 1000 cosas todos los días para salir adelante. Esta es una meta más que logro que también te pertenece. Gracias por todo el amor que me sigues dando. **TE AMO MAMI**

A ti Papá Alejandro Murillo Diosdado no tengo palabras para decirte que te estoy infinitamente agradecida por siempre darme lo mejor, por todo el apoyo que siempre me has dado y porque nunca escatimaste recurso alguno para mi. Esta es una meta más que cumplo y sin ti no la hubiera logrado. **TE AMO PAPÁ**

A mis hermanos Olivia, Alejandro y Axel, ustedes son el motor de mi vida y por ustedes siempre trato de ser mejor cada día para ser un ejemplo y enseñarles que en la vida si uno se lo propone siempre puede terminarlo todo. **LOS QUIERO**

A mis abuelitos: Mami Cruz y Papi Artemio: Gracias por enseñarnos que no importa cuan grande sea la familia, siempre caben más. Gracias por dejar toda esta familia y unirnos a todos y personalmente gracias por aguantarme, cuidarme, por contarme sus historias de vida y por darme siempre amor y consejos. **LOS AMO**

A mis Abuelitos: Abue Lupita gracias por siempre hablar conmigo y tratar de llevarme por el buen camino aunque creo que ya no tengo remedio jeje. Gracias por todos los consejos que me has dado y gracias por ser como eres. Abuelito Pedro gracias por enseñarme a decir mis primeras palabras impropias. **LOS AMO**

No tengo palabras para agradecer a todos mis tíos, tías, primos (Murillo's y Salgado's) todo el cariño, el apoyo y compañía que siempre me han brindado en las buenas y en las malas, a ti Tía Rosy y Tía Cecy por el apoyo que me brindaron. A las tiki-tiki las amo a todas y Tío Román, ni modo ya eres Salgado. Si omito a alguien es porque son demasiados y ya no tengo espacio pero a todos los quiero.

A Extractos Sigma por el apoyo y colaboración en esta proyecto

M.V.Z Gerardo Cruz Jiménez gracias por sus consejos, su paciencia, su entusiasmo, su apoyo, comprensión y sobre todo gracias por todos esos conocimientos que me transmitió durante mi estancia en el laboratorio. Nunca lo voy a olvidar. Para usted mi admiración y mi respeto por siempre.

M.V.Z José Antonio Licea Vega por su colaboración en este proyecto, por todo el apoyo y los consejos que me dio.

M. en C. Sofía González Gallardo por su apoyo, su plática y enorme ayuda en microscopía, sin usted nunca lo habría logrado.

A Juan Salas (QFB 29) por siempre quererme tanto, Guty (QFB 30), Miguel, Rubén (IQ 29), Bellota, Limón, Shamaka, Cintia Villalobos, Eva, Liz, Alma. A todos los malagradecidos en especial a Cristian, Toto y Miguel. A todos mis compañeros, amigos y hermanas del tocho de la generación QFB 31 por hacer mi estancia en la universidad más divertida y menos estresante.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 10 de Microbiología de la Unidad de Posgrado, Sra. Erika, Rubén, Ivonne, Julia, Alex, Belem, Ulises, Bere, Lulú, Diana, Carlos, Diego y Jan. Los aprecio y quiero mucho.

A Don Martín, que sin usted estaría perdida quien sabe donde, Gracias por estar siempre que lo necesitábamos.

A ti Lulú porque te has convertido en una persona muy importante en mi vida, gracias por escucharme y divertirme conmigo, gracias por esos momentos tan valiosos que me has brindado. Te quiero en mi vida por mucho tiempo más y ahora eres como mi hermana (bien). **TE QUIERO**

A la Familia Chombo Cano gracias por recibirme en su casa con las puertas abiertas y siempre con una sonrisa. **LOS QUIERO**

A ti Cesar David Chombo Cano gracias por aparecerte en las canchas sin pedirlo y en mi vida sin esperarlo. Te has convertido en la persona más importante en mi vida desde hace 4 años, gracias por todos los momentos en que has estado conmigo apoyándome en las buenas y en las malas, gracias por tu amor, tu infiniita paciencia y tu comprensión. Gracias por tu apoyo y ayuda incondicional. Te quiero a mi lado por siempre. Te extraño siempre. **TE AMO CHOMBO**

Las amigas que se convierten en tus hermanas, las escoge el corazón. Y mis hermanas son Bere y Lulú.

Finalmente a la Universidad Autónoma de México por haberme dejado pertenecer a ella tantos años, por mi formación profesional, por educación de calidad y por hacer la diferencia.

DEDICATORIAS

A mis Papas, son ustedes quienes se merecen también este triunfo, gracias por ser mis guías y consejeros, por ser un ejemplo para mí. LOS AMO

- El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir. Albert Einstein (1879-1955)

EN MEMORIA DE:
JESÚS ALBERTO HERNÁNDEZ POR SIEMPRE SALGADO.
GRACIAS POR SER MI PRIMO Y BAILAR CONMIGO.
TE AMO TOBAS.



ÍNDICE GENERAL

	PAG.
Índice General.....	I
Índice de imágenes.....	IV
Índice de tablas.....	VI
Índice de gráficas.....	VII
Lista de abreviaturas	IX

	PAG.
Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
1.1 Anatomía de la piel.....	3
1.1.1 Epidermis.....	4
1.1.2 Dermis.....	4
1.1.3 Capa de grasa subcutánea.....	5
1.2 Heridas	6
1.3 Infecciones en heridas y abscesos.....	9
1.4 Colonización.....	9
1.5 Características de los microorganismos aislados en heridas.....	10
1.5.1 Bacterias Gram Positivo.....	10
1.5.2 Estructura básica.....	10
1.5.3 <i>Staphylococcus aureus</i> como causante de infecciones.....	11
1.5.4 <i>Staphylococcus epidermidis</i> como causante de infecciones.....	12
1.6 Infecciones en piel causadas por <i>Streptococcus</i>	13
1.6.1 <i>Streptococcus pyogenes</i> como causante de infecciones.....	14
1.6.2 <i>Streptococcus agalactiae</i> como causante de infecciones.....	15
1.6.3 <i>Enterococcus faecalis</i> como causante de infecciones.....	16
1.7 Bacterias Gram Negativo.....	18
1.7.1 Estructura básica.....	18
1.7.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> como causante de infecciones.....	18
1.8 Infecciones en piel causadas por Enterobacterias.....	19
1.8.1 <i>Escherichia coli</i> como causante de infecciones.....	19
1.8.2 <i>Enterobacter aerogenes</i> como causante de infecciones.....	20
1.8.3 <i>Proteus mirabilis</i> como causante de infecciones.....	20
1.8.4 <i>Klebsiella pneumoniae</i> como causante de infecciones.....	21



1.9	Herbolaria.....	23
1.10	Benjuí.....	24
1.10.1	Nombre científico.....	24
1.10.2	Antecedentes.....	24
1.10.3	Descripción botánica.....	24
1.10.4	Parte utilizada.....	25
1.10.5	Hábitat.....	26
1.10.6	Composición química.....	27
1.10.7	Acciones farmacológicas.....	27
1.11	Efectos adversos y/o tóxicos.....	27
1.12	Justificación.....	28
1.13	Hipótesis.....	28
2.	Objetivo General.....	29
2.1	Objetivos particulares.....	29
3.	Material y métodos.....	30
3.1	Diagrama general de trabajo.....	30
3.2	Obtención del extracto de <i>Styrax benzoin Dryand</i>	31
3.3	Preparación de la solución de trabajo de <i>Styrax benzoin Dryand</i>	31
3.4	Determinación de la concentración de la solución de trabajo.....	31
3.5	Prueba de esterilidad para la solución de trabajo.....	32
3.6	Identificación de bacterias.....	32
3.7	Preparación del ensayo en microplaca con el extracto de <i>Styrax benzoin Dryand</i>	32
3.7.1	Preparación de material.....	32
3.7.2	Ensayo en microplaca.....	33
3.7.3	Prueba de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol).....	35
3.7.4	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	35
3.7.5	Ensayo bactericida – bacteriostático.....	35
3.7.6	Interpretación de los resultados para determinar efecto bactericida – bacteriostático.....	37
4.	Resultados.....	38
4.1	Aislamiento e identificación de bacterias.....	38
4.2	Extracto de <i>Styrax benzoin Dryand</i>	39
4.3	Esterilidad del extracto.....	39



4.4 Solubilidad del extracto.....	39
4.5 Evaluación del efecto inhibitorio del extracto de <i>Styrax benzoin</i> <i>Dryand.</i> sobre las bacterias seleccionadas.....	40
4.6 Resultados del efecto bactericida-bacteriostático del extracto de <i>Styrax benzoin Dryand.</i> en 10 géneros bacterianos.....	48
4.7 Observaciones obtenidas en Microscopio Electrónico de Transmisión (MET).....	54
4.7.1 <i>Enterococcus faecalis</i> tratado con extracto de <i>Styrax</i> <i>benzoin Dryand.</i>	54
4.7.2 <i>Escherichia coli</i> tratada con extracto de <i>Styrax benzoin</i> <i>Dryand.</i>	55
5. Discusión de resultados.....	56
6. Conclusiones.....	62
7. Sugerencias.....	63
8. Apéndices.....	64
8.1 Microscopía Electrónica de Transmisión.....	64
8.1.1 Microscopio electrónico.....	64
8.1.2 Preparación de material.....	65
8.1.3 Preparación de las bacterias para Microscopía Electrónica.....	66
8.1.4 Preparación de las rejillas con membrana Fomvar.....	66
8.1.5 Técnica de tinción negativa.....	67
8.2 Tinción de Gram.....	68
8.3 Material, Equipo y Reactivos.....	68
8.4 Preparación de medios de cultivo.....	70
8.5 Preparación de reactivos.....	70
9. Referencias.....	71



ÍNDICE DE IMÁGENES

	PAG.
Imagen (1): Anatomía de la piel.....	3
Imagen (2): Capas de la piel.....	3
Imagen (3): <i>Staphylococcus aureus</i> en agar SM.....	11
Imagen (4): <i>Staphylococcus epidermidis</i> en agar SM.....	12
Imagen (5): <i>Streptococcus</i> β -hemolíticos en AS.....	13
Imagen (6): <i>Streptococcus pyogenes</i> (Gpo A) en AS.....	14
Imagen (7): <i>Streptococcus agalactiae</i> (Gpo B) en AS.....	15
Imagen (8): <i>Enterococcus faecalis</i> en AS.....	16
Imagen (9): <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en agar Cetrimida.....	17
Imagen (10): <i>Escherichia coli</i> en MC.....	19
Imagen (11): <i>Enterobacter aerogenes</i> en agar EMB.....	20
Imagen (12): <i>Proteus mirabilis</i> en agar Base Sangre.....	20
Imagen (13): <i>Klebsiella pneumoniae</i> en MC.....	21
Imagen (14): Hojas y flores de <i>Styrax Benzoin Dryander</i>	24
Imagen (15): Hojas y flores de <i>Styrax Benzoin Dryander</i>	24
Imagen (16): Distribución geográfica de las especies botánicas pertenecientes al género <i>Styrax</i>	26
Imagen (17): Ensayo en microplaca.....	33
Imagen (18): Ensayo en microplaca.....	33
Imagen (19): Diluciones para la microplaca.....	34
Imagen (20): Técnica de sembrado para el ensayo bactericida-bacteriostático.....	36
Imagen (21): Técnica de sembrado para el ensayo bactericida-bacteriostático de <i>Proteus mirabilis</i>	36
Imagen (22): Agar BHI después de incubación sin crecimiento de microorganismos.....	39
Imagen (23): Resultados para <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Streptococcus pyogenes</i> con el extracto; lectura con MTT dilución en microplaca.....	41
Imagen (24): Resultados para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Proteus mirabilis</i> con el extracto; lectura con MTT dilución en microplaca.....	42
Imagen (25): Resultados para <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Streptococcus agalactiae</i> con el extracto; lectura con MTT dilución en microplaca.....	42
Imagen (26): Resultados para <i>Enterobacter aerogenes</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>	



	con el extracto; lectura con MTT dilución en microplaca.....	42
Imagen (27):	Ensayo bactericida bacteriostático de <i>Staphylococcus aureus</i>	48
Imagen (28):	Ensayo bactericida bacteriostático de <i>Staphylococcus epidermidis</i> ...	49
Imagen (29):	Ensayo bactericida bacteriostático de <i>Escherichia coli</i>	49
Imagen (30):	Ensayo bactericida bacteriostático de <i>Streptococcus pyogenes</i>	50
Imagen (31):	Ensayo bactericida bacteriostático de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
Imagen (32):	Ensayo bactericida bacteriostático de <i>Proteus mirabilis</i>	51
Imagen (33):	Ensayo bactericida bacteriostático de <i>Enterococcus faecalis</i>	51
Imagen (34):	Ensayo bactericida bacteriostático de <i>Streptococcus agalactiae</i>	52
Imagen (35):	Ensayo bactericida bacteriostático de <i>Enterobacter aerogenes</i>	52
Imagen (36):	Ensayo bactericida bacteriostático de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	53
Imagen (37):	Microfotografías electrónica de transmisión de <i>Enterococcus faecalis</i>	54
Imagen (38):	Microfotografías electrónica de transmisión de <i>Escherichia coli</i>	55
Imagen (39):	Proceso de reducción del MTT.....	59
Imagen (40):	Fotografía del Microscopio Electrónico de Transmisión.....	64
Imagen (41)	Microscopio electrónico de transmisión.....	65
Imagen (42):	Rejillas con membrana Fomvar.....	66
Imagen (43):	Técnica de tinción negativa.....	67



ÍNDICE DE TABLAS

	PAG.
Tabla (1): Funciones cutáneas de la piel.....	6
Tabla (2): Especies bacterianos más frecuentemente aislados en 392 muestras de pacientes quemados.....	8
Tabla (3): Ejemplos de infecciones causadas por bacterias Gram (+) y tratamientos.....	17
Tabla (4): Ejemplos de infecciones causadas por bacterias Gram (-) y tratamientos.....	22
Tabla (5): Clasificación científica del <i>Styrax Benzoin Dryander</i>	25
Tabla (6): Distribución geográfica de las especies botánicas pertenecientes al género <i>Styrax</i>	26
Tabla (7) Ensayo en microplaca.....	34
Tabla (8): Identificación de bacterias Gram positivas (<i>Staphylococcus</i>).....	38
Tabla (9): Identificación de bacterias Gram positivas (<i>Streptococcus</i>).....	38
Tabla (10): Identificación de bacterias Gram negativas.....	38
Tabla (11): Tabla simplificada de las CMI's del extracto de <i>Styrax benzoin Dryand.</i> en 10 géneros bacterianos.....	40
Tabla (12): Tabla a detalle de los resultados cuantitativos obtenidos de la lectura en la microplaca.....	41
Tabla (13): Comparación de las CMI's para el extracto de <i>Styrax benzoin Dryand.</i> y <i>Salvia officinalis</i>	59



ÍNDICE DE GRÁFICAS

	PAG.
Gráfica (1): Porcentaje de sensibilidad de diferentes antibióticos utilizados en muestras de exudado faríngeo con presencia de <i>Streptococcus pyogenes</i>	15
Gráfica (2): Representación gráfica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de <i>Styrax benzoin Dryand.</i> en <i>Staphylococcus aureus</i>	43
Gráfica (3): Representación gráfica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de <i>Styrax benzoin Dryand.</i> en <i>Staphylococcus epidermidis</i>	43
Gráfica (4): Representación gráfica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de <i>Styrax benzoin Dryand.</i> en <i>Escherichia coli</i>	44
Gráfica (5): Representación gráfica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de <i>Styrax benzoin Dryand.</i> en <i>Streptococcus pyogenes</i>	44
Gráfica (6): Representación gráfica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de <i>Styrax benzoin Dryand.</i> en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45
Gráfica (7): Representación gráfica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de <i>Styrax benzoin Dryand.</i> en <i>Proteus mirabilis</i>	45
Gráfica (8): Representación gráfica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de <i>Styrax benzoin Dryand.</i> en <i>Enterococcus faecalis</i>	46
Gráfica (9): Representación gráfica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de <i>Styrax benzoin Dryand.</i> en <i>Streptococcus agalactiae</i>	46
Gráfica (10): Representación gráfica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de <i>Styrax benzoin Dryand.</i> en <i>Enterobacter aerogenes</i>	47
Gráfica (11): Representación gráfica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de <i>Styrax benzoin Dryand.</i> en <i>Klebsiella pneumoniae</i>	47
Gráfica (12): Porcentaje de incidencia de infecciones nosocomiales en algunas regiones del mundo.....	56



Gráfica (13): Porcentaje de infecciones nosocomiales por entidad federativa.

México 2006..... 56



LISTA DE ABREVIATURAS

CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMI's	Concentraciones mínimas inhibitorias
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (Sal de Tetrazolium)
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
AS	Agar Sangre
AMC	Agar Mac Conkey
EMB	Eosina Azul de Metileno (Medio de cultivo)
BHI	Infusión Cerebro Corazón (Medio de cultivo)
SSF	Solución Salina Fisiológica
SSFE	Solución Salina Fisiológica Estéril
PBS	Solución Buffer de Fosfatos
DMSO	Dimetilsulfóxido
NaCl	Cloruro de Sodio
AFT	Ácido Fosfotúngstico
mg	miligramos
µg	microgramos
ml	mililitros
µl	microlitros

RESUMEN

Los abscesos cutáneos y de tejido blando e infecciones de quistes pueden ser causados por bacterias aerobias y anaerobias y están entre las más comunes y a veces llegan a convertirse en serias complicaciones locales y sistémicas. Estas infecciones pueden ser potencialmente peligrosas y pueden tener un rápido progreso. Su temprano reconocimiento y un manejo médico y quirúrgico apropiado son por lo tanto de primera importancia.

Los organismos más comunes que se involucran en infecciones de piel y tejido blando son *S. aureus* y *Streptococcus* Grupo A y con menos frecuencia *Enterobacter* y *E. coli*.

Las infecciones anaerobias de la piel y tejido blando frecuentemente ocurren en áreas del cuerpo que han sido comprometidas o perjudicadas por un cuerpo extraño, el trauma o la cirugía. Como la microflora local por lo general es responsable de estas infecciones, los sitios anatómicos que están sujetos a la contaminación fecal u oral son en particular los de mayor riesgo.

Los antimicrobianos deben cubrir la mayoría de los microorganismos aislados de pacientes con infecciones en heridas y su presencia debe ser anticipada por terapias dadas. Los antimicrobianos apropiados incluyen clindamicina, metronidazol, cefoxitin, carbapenem (imipenem, meropenem, ertapenem); o combinación de inhibidores de beta-lactamasa (ácido clavulínico, tazobactam) y penicilinas (amoxicilina, ticarcilina, piperacilina)

En infecciones estafilocócicas el antibiótico de elección es la oxacilina y en pacientes alérgicos son administrados los macrólidos o vancomicina.

En infecciones con bacilos aerobios Gramnegativos los antibióticos de elección son los aminoglucósidos, quinolonas o cefalosporinas de cuarta generación (ceftazidime, cefepime).^(21, 22)

El objetivo principal de este trabajo fue determinar el efecto inhibitorio del extracto de *Styrax Benzoin Dryand.* en 10 bacterias que comúnmente se asocian a infecciones de heridas utilizando el método de Mosmann y Microscopía Electrónica de Transmisión. Las bacterias que se utilizaron en este trabajo son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se realizó la esterilización del extracto proporcionado por Extractos Sigma S.A de C.V mediante la filtración empleando una membrana millipore de celulosa de 0.45 µm verificando la prueba de esterilidad mediante un sembrado en una placa de agar BHI, obteniéndose un resultado negativo de crecimiento microbiano. Posteriormente el extracto se sometió a desecación total en horno Pasteur a una temperatura de 45 °C, se recolectó la materia seca, se pesó y se colocó en un frasco ámbar estéril. Una vez obtenida la materia seca, se pesó un gramo de esta y se le agregaron 5 ml de DMSO y 25 ml de SSF estéril con agitación constante en un vortex (solución de trabajo). Con esta solución de trabajo se realizaron ensayos con las bacterias antes mencionadas en microplacas utilizando el método de Mosmann, después se determinó el efecto bactericida-bacteriostático mediante una prueba cualitativa en placas de



agar BHI. Finalmente el daño producido a las bacterias tratadas con el extracto de *Styrax Benzoin Dryand.* fue evidenciado mediante Microscopía Electrónica de Transmisión.

De las diez bacterias usadas, el 100% de ellas resultaron sensibles al extracto de *Styrax Benzoin Dryand.* con diferencias en la MIC. El 40% (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter aerogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*) tuvieron una MIC de 3330 µg/100µl; 30% (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Klebsiella pneumoniae*) tuvieron una MIC por encima de 400 µg/100µl y el 30% restante (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* y *Enterococcus faecalis*) presentaron una MIC por debajo de 53 µg/100µl.

El *Styrax Benzoin Dryand.* logró inhibir al 100% de las bacterias que se utilizaron con diferencias en las MIC's.

De las bacterias estudiadas, sólo se le realizó la MET a 2 (20%) de ellas, *Streptococcus faecalis* y *Escherichia coli*, en ambos se observan las alteraciones producidas por el extracto de *Styrax Benzoin Dryand.*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANATOMÍA DE LA PIEL

La piel es el órgano más extenso del cuerpo al que recubre en su totalidad, tiene una superficie media de 1,6 m² y un peso de aproximadamente 4 kg (Imagen 1). Actúa como escudo protector contra el calor, la luz, lesiones e infecciones y cumple con las siguientes funciones:

- Regula la temperatura corporal.
- Almacena agua y grasa.
- Es un órgano sensorial.
- Evita la pérdida de agua.
- Previene la entrada de bacterias. (7, 8)

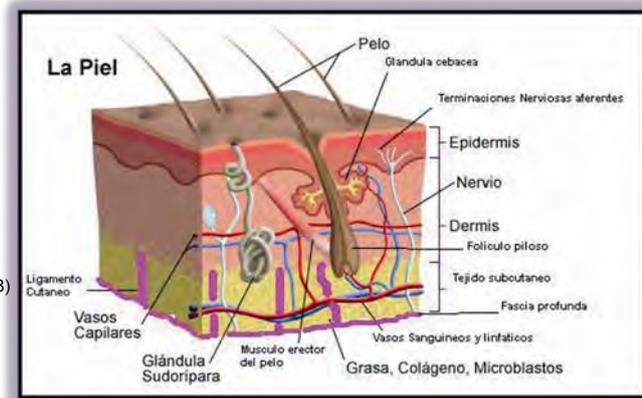


IMAGEN (1): Anatomía de la piel

La piel está compuesta por las siguientes capas, cada una de ellas desempeña distintas funciones (Imagen 2): (43, 44)

- Epidermis.
- Dermis (tejido conectivo).
- Capa de grasa subcutánea (tejido graso).

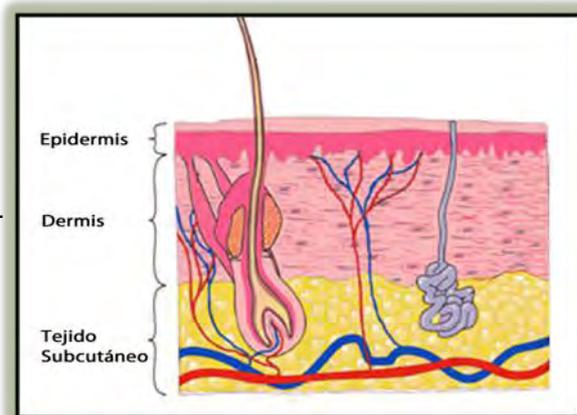


IMAGEN (2): Capas de la piel que la constituyen



1.1.1 EPIDERMIS

La epidermis es la capa externa delgada de la piel y está constituida por un epitelio escamoso estratificado y queratinizado que tiene un grosor de 0,4 a 1,5 mm. Contiene cuatro tipos principales de células: queratinocitos (90 %), melanocitos (8 %), células de Langerhans y células de Merkel. La epidermis está compuesta por los cinco estratos siguientes:

- **Estrato basal**

El estrato basal es la capa más profunda de la epidermis que consiste en una sola capa de queratinocitos cúbicos o cilíndricos, algunos de los cuales son células madre, que están en división celular constante para producir continuamente nuevos queratinocitos que reemplazan a los antiguos que se desprenden de la superficie cutánea. Melanocitos; células de Langerhans y de Merkel que se hallan dispersos entre los queratinocitos del estrato basal. ^(43, 44)

- **Estrato espinoso**

Contiene ocho a 10 capas de queratinocitos poliédricos que están estrechamente unidas; incluyen prolongaciones de células de Langerhans y melanocitos.

- **Estrato granuloso**

Localizado en la parte central de la epidermis, consta de tres a cinco capas de queratinocitos aplanados en los que ocurre apoptosis, los organelos ya están en degeneración; las células contienen la proteína queratohialina, que organiza los filamentos intermedios en haces gruesos, y gránulos laminares, que liberan una secreción rica en lípidos, el cual llena los espacios entre las células y funciona como un sellador retrasando la pérdida de líquidos corporales y la entrada de materiales extraños. ^(43, 44)

- **Estrato lúcido**

Se encuentra sólo en la piel de las yemas de los dedos, palmas de las manos y plantas de los pies. Consta de tres a cinco capas de queratinocitos transparentes, planos y muertos con filamentos intermedios muy apiñados y poseen una membrana plasmática engrosada. ^(43, 44)

- **Estrato córneo**

Está constituido por 25 a 30 capas de queratinocitos muertos y planos, que contienen filamentos intermedios en íntima aposición, queratohialina y gránulos laminares. Estas células se desprenden (descaman) constantemente y las sustituyen otras de estratos más profundos. El estrato córneo sirve como barrera impermeable efectiva y también protege de lesiones y microbios. ^(43, 44)

1.1.2 DERMIS

La dermis representa un tejido fibro-elástico, formado por una red de colágeno y fibras elásticas.

La dermis se mantiene unida por una proteína denominada colágeno, compuesta por fibroblastos. En esta capa se encuentran los receptores del dolor y del tacto. ^(43, 44)

La dermis es la capa media de la piel. La dermis está compuesta por lo siguiente:

- Vasos sanguíneos.
- Vasos linfáticos.
- Folículos pilosos.
- Glándulas sudoríparas.
- Fibras de colágeno, elásticas y reticular.
- Células (Fibroblastos, mastocitos y macrófagos).
- Nervios.

La dermis reticular es más rica en colágeno y fibras elásticas. Las fibras elásticas son esenciales para las propiedades retráctiles de la piel y solo representan un 2-4% de los constituyentes de la dermis.

El fibroblasto es una célula muy abundante y tiene como misión la fabricación de los elementos fibrosos de la dermis, especialmente una proteína sintetizada llamada colágeno. ^(43, 44)

1.1.3 CAPA DE GRASA SUBCUTÁNEA (HIPODERMIS)

La capa subcutánea es la capa más profunda de la piel. Está compuesta por una red de células de colágeno y grasa, que ayuda a conservar el calor corporal y protege al cuerpo contra lesiones puesto que amortigua los impactos. ^(7, 8)

La piel tiene múltiples funciones (Tabla 1) que son desarrolladas por las diferentes estructuras, células y anexos que la componen. Entre las funciones destaca la función inmunológica y la función barrera. La función inmune se realiza por la inmunidad natural y la adaptada. La función barrera impide la entrada de sustancias u organismos del exterior y la pérdida desde el interior también el filtro de la radiación ultravioleta. Entre otras funciones destacan la función reparadora de heridas, úlceras y del daño celular producido por la radiación ultravioleta, las funciones vasculares nutritivas y reguladoras de temperatura, las funciones sensitivas, de comunicación y las funciones de relación o atención. ^(7, 42)



TABLA (1): Funciones cutáneas de la piel

FUNCIÓN	MECANISMO	ACCIÓN	SITUACIÓN DEFECTUOSA
Inmunes	Inmunidad natural, adaptada	Prevenir infecciones fúngicas, bacterianas, víricas, enfermedades autoinmunes, neoplasias	Infecciones, enfermedades autoinmunes, neoplasias cutáneas
Barrera	Estrato córneo, epidermis, melanina	Prevenir la infección, absorción y deshidratación, filtrar la radiación ultravioleta	Infecciones bacterianas de repetición, absorción de sustancias químicas, deshidratación, cáncer cutáneo.
Reparadora	Fibroblastos	Curación de heridas y úlceras cutáneas, reparar el daño celular por ultravioleta	Úlceras cutáneas, queloides, neoplasias cutáneas
Vasculares	Circulación hemática y linfática	Nutritiva y regulación de la temperatura drenaje linfático	Infarto, insuficiencia venosa, vasculitis, vasculopatía, linfedema
Comunicación	Fibras nerviosas aferentes y eferentes	Conducción de estímulos nerviosos, secreción de citocinas	Hiper e hiposensibilidad, prurito, hiperhidrosis, síndromes neurológicos, control de la temperatura
Atención	Visual, olfativa	Pigmentación, distribución del pelo, sudoración	Fotoenvejecimiento, vitiligo, alopecia, halitosis, bromhidrosis

Tomado de (8)

1.2 HERIDAS

Se define la palabra herida como cualquier ruptura de la superficie externa o interna del cuerpo que produce separación de tejidos y está causada por una fuerza o agente lesionante externo.⁽¹⁾

Las infecciones bacterianas en heridas, representan actualmente un problema de magnitud considerable ya que al presentarse y no atenderse oportunamente se pueden desencadenar trastornos locales y sistémicos que van desde retraso en la curación, hasta deformaciones.

Las infecciones de heridas pueden ser endógenas o exógenas. Las exógenas son las asociadas a traumas, mordeduras de animales, quemaduras o de cuerpos extraños en la mucosa o en la piel. Estas lesiones frecuentemente son colonizadas por bacterias ambientales.⁽¹⁵⁾

Las heridas y abscesos endógenos se pueden asociar con apendicitis, celulitis, infecciones dentales, artritis séptica, osteomielitis, sinusitis, etc.; Así como por intervenciones quirúrgicas, y uso de prótesis donde generalmente estas heridas son causadas por bacterias anaeróbicas.

Los microorganismos que se logran identificar nos dicen la localización anatómica de la infección, y sobre todo el grado de contaminación. Las heridas traumáticas generalmente se

colonizan con microorganismos aerobios como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* grupo A y D (*Enterococcus*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinobacter* spp, *Flavobacterium*, Enterobacterias; *Escherichia coli*, *Proteus* spp, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Providencia* spp.⁽¹⁶⁾

Las bacterias anaeróbicas que llegan a las heridas más profundas pueden ser *Clostridium perfringens* tipo A, *Clostridium septicum* causantes de gangrena gaseosa.

En el caso de quemaduras graves el microorganismo más peligroso es *Pseudomonas aeruginosa* junto con flavobacterias y otros bacilos Gram negativos.

Las infecciones en heridas son divididas dentro de heridas incisionales y heridas profundas y serán consideradas como nosocomiales a todas aquellas que sean adquiridas durante la estancia en hospital, y no nosocomiales a aquellas infecciones que no hayan sido adquiridas dentro del hospital.⁽¹⁾

Las heridas sépticas o infectadas son aquellas en las que una zona está contaminada por bacterias que pueden producir supuración o destrucción de tejidos.

Las heridas pueden ser clasificadas en tres tipos fundamentales: heridas quirúrgicas, heridas no quirúrgicas y heridas por quemaduras.

***HERIDAS QUIRÚRGICAS:** Estas son infectadas por organismos introducidos al tejido durante los procesos operatorios cuyo origen es la flora cutánea residente del paciente; las bacterias toleradas en el aire son de poca consecuencia en la etiología. Los factores más importantes en la infección de estas heridas son: el tipo de operación, la duración, la destreza del cirujano y la resistencia del paciente. En las operaciones se involucran sitios contaminados (intestino, recto, boca, etcétera) y otros estériles; en los primeros el riesgo de infección es mayor.

Algunos factores predisponentes de heridas infectadas incluyen la edad avanzada, los estados de mala nutrición, focos de infección distantes, *diabetes mellitus*, deficiencia renal y terapia con corticoesteroides. Muchas heridas infectadas aparecen de 3-7 días postcirugía; algunas en forma temprana (24-48 horas) son comúnmente causadas por *Streptococcus* del grupo "A" o por especies de *Clostridium*. La infección causada por *Staphylococcus aureus* generalmente de 4-6 días y de una semana o más para los gérmenes Gram negativos.⁽¹⁴⁾

***HERIDAS NO QUIRÚRGICAS:** Son comunes de infección nosocomial e incluyen: sitios de inyección, úlcera de decúbito, úlceras cutáneas, resultado de enfermedades oclusivas venosas o arteriales. En general los patógenos son similares a las infecciones de heridas quirúrgicas.



*HERIDAS POR QUEMADURAS: Indudablemente, el paciente quemado se encuentra dentro de los sujetos comprometidos, que por su situación son fácilmente colonizados por organismos oportunistas, propios de su flora o provenientes de otras fuentes. El siguiente estudio nos muestra los géneros y especies bacterianos más frecuentes. ⁽¹⁴⁾

TABLA (2): Especies bacterianos más frecuentemente aislados en 392 muestras de pacientes quemados.

Especie	Número	%
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	145	29.8
<i>Staphylococcus aureus</i>	109	22.4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	108	22.2
<i>Escherichia coli</i>	12	2.5
<i>Citrobacter freundii</i>	9	1.9
<i>Citrobacter diversus</i>	3	0.6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	0.6
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0.2
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	1.02
<i>Enterobacter agglomerans</i>	23	4.7
<i>Hafnia alvei</i>	15	3.1
<i>Serratia marcescens</i>	3	0.6
<i>Serratia liquefaciens</i>	17	3.5
<i>Serratia rubidaea</i>	7	1.4
<i>Proteus mirabilis</i>	18	3.7
<i>Proteus vulgaris</i>	5	1.02
<i>Proteus rettgeri</i>	1	0.2
<i>Morganella morganii</i>	2	0.4

NOTA: Este estudio se realizó en el Hospital Rubén Leñero
(Cruz G. et al. 1994)

El 85% de las heridas quirúrgicas infectadas se adquiere a nivel hospitalario. Se debe hacer énfasis en el mantenimiento de la esterilidad en el quirófano e insistir en las técnicas quirúrgicas que disminuyen el trauma al tejido.

Las quemaduras que ocupan una superficie corporal amplia pueden causar la muerte, producida comúnmente por procesos infecciosos agregados. Estas infecciones ocupan un lugar predominante por su frecuencia entre las infecciones nosocomiales. ⁽¹⁴⁾

La infección de las lesiones producidas en quemaduras es un problema que se observa en todo el mundo, dicho problema está fuertemente asociado a bacteremia, se sabe que puede causar rechazos de injertos o incluso en casos muy severos causa la muerte. Los microorganismos que con más frecuencia infectan las lesiones por quemaduras son

estreptococos, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, otros bacilos Gram negativos, *Candida* y *Aspergillus*.⁽¹⁷⁾

1.3 INFECCIONES EN HERIDAS Y ABSCESOS

Ocurren como complicaciones de operaciones quirúrgicas, traumatismos o enfermedades que puedan interrumpir la superficie de una mucosa o de la piel. De la naturaleza de la flora infectante dependerá el problema y la localización del proceso.

El trauma facial representa una de las patologías más frecuentes en nuestro medio. En el Servicio de Urgencia de nuestro hospital se realizaron en promedio 30 atenciones mensuales por traumatismos faciales de diversa severidad durante los años 2004 y 2005.⁽³⁴⁾

La flora normal de un área, puede ser modificada por procesos patológicos o agentes microbianos y la flora ambiental permitirá establecer en forma racional los posibles agentes etiológicos. La tinción de Gram le da al microbiólogo la información para asegurar el empleo de los medios, condiciones de cultivo, etc.

Las vesículas y ampollas son lesiones llenas de líquido debido a ciertos microorganismos, estas lesiones son muy características, por lo cual es fácil identificar si son de origen viral o bacteriano, en éste caso la tinción de Gram también proporciona valiosa información acerca del agente etiológico para llevar a cabo una terapia eficaz.⁽¹⁷⁾

1.4 COLONIZACIÓN

La colonización es la presencia de un microorganismo en un hospedero, con crecimiento y multiplicación, pero sin ninguna expresión clínica o respuesta inmune detectada en el hospedero en el tiempo de su aislamiento.⁽¹⁾

La colonización normal en el humano después del nacimiento es un proceso, subsecuentemente generado por el contacto del medio ambiente animado e inanimado logrando un balance estableciendo, subsecuentemente la flora normal.^(15, 18)

En ocasiones esta flora puede provocar una infección cuando las defensas normales sufren un desequilibrio por una terapia inmunomoduladora, o el uso de un dispositivo invasivo, etc. De igual forma esta flora puede alterarse con alguna terapia antimicrobiana, es así como algunos pacientes adquieren infecciones intra hospitalarias o nosocomiales.^(15, 21)



Aunque numerosos microorganismos están en contacto con la superficie cutánea, este ambiente relativamente hostil no es útil para la supervivencia de la mayoría de ellos. Los microorganismos que se encuentran con mayor frecuencia en la superficie cutánea son bacterias grampositivas (p.ej., *Staphylococcus* coagulasa-negativo y, menos a menudo, *S. aureus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium*). *Clostridium perfringens* se aísla en la piel de aproximadamente el 20% de las personas sanas, y los hongos *Candida* y *Malassezia* pueden también localizarse sobre las superficies cutáneas, en especial en las húmedas. Aunque los estreptococos son capaces de localizar la piel de forma transitoria, los ácidos grasos volátiles producidos por *Propionibacterium* anaerobio son tóxicos para estos microorganismos. Debido a su sequedad los bacilos gramnegativos no colonizan de manera permanente la superficie cutánea. ^(17, 18)

1.5 CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS EN HERIDAS

1.5.1 BACTERIAS GRAM POSITIVO

1.5.2 ESTRUCTURA BÁSICA

La estructura básica de las bacterias Gram (+) está constituida principalmente por:

*Peptidoglucano (mucopéptido): Está compuesta por moléculas alternadas de N-acetilglucosamina, además tiene adherido a cada molécula de ac. murámico un tetrapéptido formado por D y L aminoácidos.

*Ácido teicoico: Que son polímeros de fosfatoglicerol y ribitol, se localizan en la capa externa de la pared celular y algunos de estos atraviesan hasta llegar al peptidoglucano. ⁽¹⁾

Los estafilococos han demostrado una gran capacidad para desarrollar resistencia a la mayoría de los antibióticos. Hasta hace poco, el único antibiótico que había permanecido activo de manera uniforme frente a los estafilococos era la vancomicina, el antibiótico de elección en la actualidad para tratar a los estafilococos resistentes a la oxacilina. No obstante, ahora se han encontrado aislamientos de *S. aureus* con una sensibilidad disminuida a la vancomicina, y en los estafilococos coagulasa-negativos se ha observado una resistencia franca a la misma.

El mecanismo de esta resistencia es desconocido; sin embargo, hay evidencias de que los cambios en la síntesis de la pared celular han llevado a una unión reversible de la vancomicina que evita de forma eficaz que la vancomicina interrumpa la síntesis de los peptidoglucanos, y si esto sigue ocurriendo en la naturaleza, los estafilococos se harán muy resistentes a la vancomicina. Esto creará una bacteria muy virulenta que esencialmente no se podrá tratar. ^(18, 22, 26)

1.5.3 *Staphylococcus aureus* COMO CAUSANTE DE INFECCIONES



IMAGEN (3): *Staphylococcus aureus* en agar SM.

El hábitat natural del *Staphylococcus aureus* (Imagen 3) es la superficie corporal. Es una bacteria comensal que está presente en la piel, fosas nasales de la mayoría de las personas sanas. En los neonatos, es frecuente la colonización del ombligo, la piel y la región perianal. La piel actúa a menudo como un vehículo para la propagación de persona a persona, en los hospitales esta es una característica especial y favorable para su transmisión debido a la asistencia estrecha que se presta a los enfermos. *S. aureus* es el patógeno aislado con mayor frecuencia a partir de infecciones de heridas post-operatorias, con un porcentaje de hasta el 10% de las

heridas, y aproximadamente el 15% de los adultos sanos son portadores permanentes de *S. aureus* en la nasofaringe. ⁽¹⁾

Los pacientes de riesgo para enfermedades específicas incluyen a las mujeres menstruales (síndrome del shock tóxico), los lactantes (síndrome de la piel escaldada), niños pequeños con mala higiene personal (impétigo y otras infecciones cutáneas), catéteres intravasculares (bacteremia y endocarditis); pacientes con función respiratoria comprometida o con antecedentes de una infección respiratoria viral (neumonía). ^(18, 27)

TRATAMIENTO

Los antibióticos de elección en las infecciones de las heridas son oxacilina, para los *S. aureus* resistentes a metilina se elige vancomicina con o sin rifampicina y para los *S. aureus* sensibles a metilina se elige penicilina resistente a la penicilinas, también depende del diagnóstico precoz y la reapertura total o parcial de la herida infectada.

Debido a los problemas que existían con los estafilococos resistentes a la penicilina, se desarrollaron penicilinas semisintéticas resistentes a la hidrólisis por β -lactamasas (metilina, nafcilina, oxacilina, dicloxacilina). No obstante, los estafilococos desarrollan también resistencia a estos antibióticos.

Actualmente del 30 al 50% de las cepas de *S. aureus* son resistentes a estas penicilinas semisintéticas. ⁽¹⁸⁾

Deben aplicarse los principios generales del tratamiento de las infecciones (inmovilización, elevación y calor, aplicación de desinfectantes y soluciones antisépticas).

El lavado de manos y la cobertura de la piel expuesta ayuda al personal sanitario a prevenir la infección o la extensión a otros pacientes. ^(1,26)

1.5.4 *Staphylococcus epidermidis* COMO CAUSANTE DE INFECCIONES



IMAGEN (4): *Staphylococcus epidermidis* en agar SM.

Se presenta frecuentemente en la piel de humanos y de animales y en membranas mucosas. Es la causa menos común en infecciones oportunistas y es un mediador de infecciones nosocomiales. *Staphylococcus epidermidis* se puede obtener en una herida ya que es de flora normal. Provoca daño en la piel, separando el estrato granuloso del córneo dando el signo de piel escaldada.^(3, 4)

El *S. epidermidis* (Imagen 4) y otros estafilococos coagulasa negativos representan los mayores componentes de la microflora de la piel y mucosa humana. A pesar de su alta frecuencia como

contaminante, el *S. epidermidis* se ha convertido en un importante patógeno nosocomial, en parte probablemente debido al uso incrementado de dispositivos médicos como catéteres endovenosos de permanencia prolongada. En un estudio de infecciones postoperatorias después de injertos óseos, el mayor número de infecciones del lecho operatorio fueron causadas por *S. epidermidis*, y el 30% de los pacientes con estas infecciones no presentaban factores predisponentes que podían ser correlacionados estadísticamente con un riesgo incrementado de infección.⁽⁵⁾

Los pacientes de riesgo son los que tienen cuerpos extraños (p.ej., sutura, prótesis, soporte o catéteres), ya que producen infección en las heridas quirúrgicas cuando estos cuerpos extraños están presentes.

S. epidermidis es el responsable del 20% de los casos de impétigo, pueden provocar varias enfermedades tales como bacteremia y endocarditis.⁽¹⁸⁾

TRATAMIENTO

La bacteremia por *S. epidermidis* es una condición que no suele poner en riesgo la vida del paciente iniciado el tratamiento en forma oportuna y que conlleva una evolución favorable. En cuanto al tratamiento, el fármaco de elección es la vancomicina.⁽⁵⁾

Los estafilococos desarrollaron una rápida resistencia a los antibióticos después de la introducción de la penicilina, y en la actualidad menos del 10% de las cepas son sensibles este antibiótico; así que los antibióticos de elección para el tratamiento de enfermedades con *S. epidermidis* son oxacilina (u otras penicilinas resistentes a la penicilinasasa) o vancomicina para las cepas resistentes a la oxacilina y generalmente es necesario retirar el cuerpo extraño para que el tratamiento tenga éxito.⁽²⁶⁾

El número de microorganismos necesarios para que se produzca una infección (dosis infectiva) es generalmente elevado, a no ser que exista en la herida un cuerpo extraño. Una limpieza correcta de la herida, y la aplicación de un desinfectante adecuado (p. ej., jabón germicida,

solución de yodo, hexaclorofeno) prevendrá la mayoría de las infecciones en individuos sanos.⁽¹⁸⁾

1.6 INFECCIONES EN PIEL CAUSADAS POR *Streptococcus*

La fuente de infección causada por esta especie suele ser endógena (vías respiratorias altas, fisuras u otras heridas infectadas). Las bacterias también pueden proceder de instrumentos o paños contaminados. Se han descrito epidemias provocadas por portadores de bacterias en las heces, en la faringe o lesiones cutáneas infectadas.

La clasificación de los *Streptococcus* se basa en tres características fundamentales:

a) Por el tipo de hemólisis que presenta en el medio de Agar Sangre:

- Hemólisis tipo α que corresponde a la lisis parcial de los eritrocitos.
- Hemólisis tipo β que corresponde a la lisis completa de los eritrocitos. (Imagen 5)
- Hemólisis tipo γ que corresponde a la ausencia de hemólisis en el medio circundante.

b) Reacciones serológicas (reacciones de Lancefield), que están basadas en la determinación del carbohidrato C.

C) Características físicas y fisiológicas, como la producción de enzimas específicas y la facultad de crecer en sustancias químicas diversas.^(1, 2)

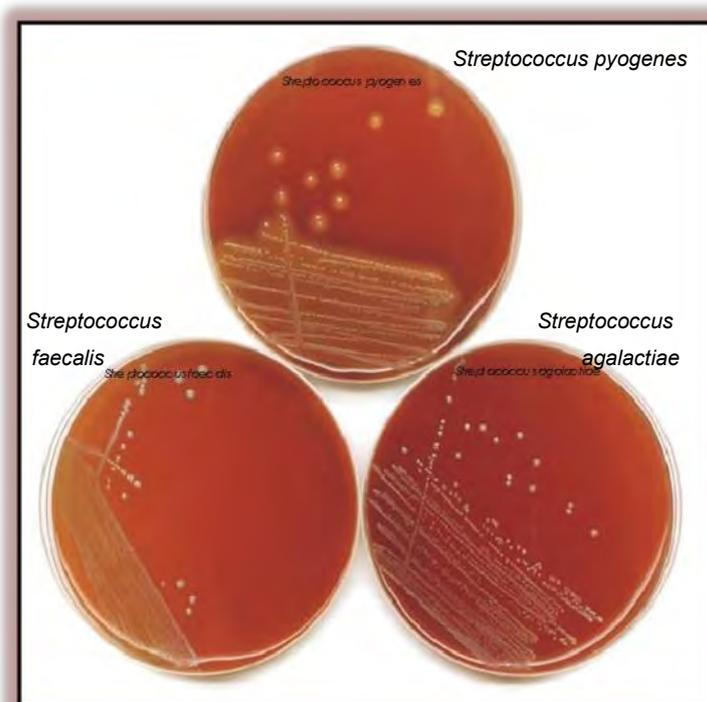


IMAGEN (5): *Streptococcus* β -hemolíticos en AS
(Escorza P. 2007)

1.6.1 *Streptococcus pyogenes* (Grupo A) COMO CAUSANTE DE INFECCIONES



IMAGEN (6): *Streptococcus pyogenes* en AS.

Streptococcus pyogenes (Imagen 6) son llamados del Grupo A ya que ocasionan la completa ruptura de los eritrocitos (beta-hemólisis) y la recuperación de hemoglobina; puede ser encapsulado por lo que resisten a la fagocitosis. ⁽¹⁹⁾

Streptococcus pyogenes habita la piel y las vías respiratorias superiores de los seres humanos. No se considera parte de la flora normal, pero puede existir el estado de portador nasal, faríngeo y a veces, en la mucosa anal. Su presencia en las muestras casi siempre se considera clínicamente importante. Se transmite de persona

a persona por contacto directo con mucosas o secreciones, o por gotitas contaminadas producidas por la tos o estornudos.

S. pyogenes se asocia a muchas importantes enfermedades, la infección más frecuente que produce es la faringitis estreptocócica, también produce varias infecciones de piel como celulitis estreptocócica, impétigo, erisipelas, fascitis necrotizante (gangrena estreptocócica), fiebre escarlatina, síndrome de shock tóxico estreptocócico y artritis donde las articulaciones más afectadas son rodillas 75 %, tobillos 50 %, codos y muñecas. ^(2, 6, 19)

TRATAMIENTO

En un estudio estadístico que se realizó del año 2002 al 2006, se trataron con diferentes antibióticos muestras de exudados faríngeos con desarrollo de *Streptococcus pyogenes*, siendo el antibiótico con mayor porcentaje de sensibilidad penicilina con 82.6 % y los antibióticos con menor sensibilidad vancomicina y trimetoprim/ sulfametoxazol con 55.5 y 29 % respectivamente. ⁽²⁾ (Gráfica 1)

La eritromicina y las cefalosporinas se usan en pacientes alérgicos a la penicilina y se administran antibióticos antiestafilócocos en las infecciones mixtas. *S. pyogenes* es resistente a sulfamidas, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos y licosamidas. ⁽¹⁸⁾

GRÁFICA (1): Porcentaje de sensibilidad de diferentes antibióticos utilizados en muestras de exudado faríngeo con presencia de *Streptococcus pyogenes*.



(Escorza P. 2007)

1.6.2 *Streptococcus agalactiae* (Grupo B) COMO CAUSANTE DE INFECCIONES



IMAGEN (7): *Streptococcus agalactiae* en AS.

S. agalactiae (Imagen 7) se conoce tanto por ser una importante causa de septicemia, neumonía y meningitis en los recién nacidos como por ser causa de enfermedad grave en los adultos. Colonizan de manera asintomática el tracto respiratorio superior y el tracto genitourinario de los adultos. Otras infecciones por streptococos del grupo B son endocarditis, infección del tracto urinario, infección de una herida y bacteremia. ⁽¹⁶⁾

Aunque una infección por *S. agalactiae* normalmente no ocasiona problemas a las mujeres sanas antes del embarazo, la mayor parte de las infecciones de los recién nacidos se adquieren de la madre durante la gestación o en el momento del parto.

Los neonatos tienen un mayor riesgo de infección si:

- Hay una rotura prematura de membranas, un parto prolongado, prematuridad, o una enfermedad materna diseminada por estreptococos del grupo B.
- La madre no tiene anticuerpos específicos de tipo y tiene valores bajos de complemento.

Una de cada cuatro o cinco mujeres embarazadas tiene estreptococos grupo B en el recto o en la vagina, lo que provoca que estén en riesgo de una sepsis posparto. ^(22, 27)

TRATAMIENTO

El tipo de tratamiento para la infección por estreptococo del grupo B se define de acuerdo al momento en que se detecta la presencia del microorganismo. Se realizan dos tipos de tratamientos: si la infección es detectada durante el embarazo, se realiza un tratamiento con antibióticos por vía oral en cualquier edad gestacional en los casos de infección urinaria o vaginitis sintomática, pero si hay cultivos positivos en las últimas semanas de embarazo, se indica un tratamiento preventivo con antibióticos durante el trabajo de parto. ⁽¹⁸⁾

La penicilina G es el fármaco de elección, sin embargo, la CMI que se necesita para inhibir al microorganismo es aproximadamente 10 veces superior a la que se necesita para inhibir a *S. pyogenes*. En los pacientes con infecciones graves se usa una combinación de penicilina y un aminoglucósido; la vancomicina se emplea en los pacientes alérgicos a la penicilina.

En los niños de alto riesgo, se hace tratamiento antibiótico e inmunización pasiva mediante transfusión de sangre con anticuerpos específicos de tipo. ⁽¹⁸⁾

1.6.3 *Enterococcus faecalis* COMO CAUSANTE DE INFECCIONES

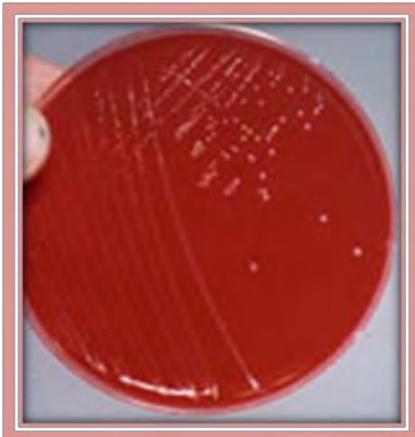


IMAGEN (8): *Enterococcus faecalis* en AS.

Las infecciones causadas por los enterococos son de especial importancia en el hospital debido a la presencia de estos como parte de la flora normal en los aparatos genito-urinario y gastrointestinal.

Los *Enterococcus* son fuente de infección hospitalaria del aparato urinario, aparato intrabdominal o intrapélvica. En la práctica quirúrgica se encuentra casi siempre en infecciones mixtas de heridas o septicemias intraperitoneales y son una de las causas principales de infecciones nosocomiales responsables del 10 % de dichas infecciones.

Las infecciones producidas por *Enterococcus* (Imagen 8) son mucho menos invasivas que las infecciones producidas por *Streptococcus* del grupo A. ^(1, 18)

TRATAMIENTO

El tratamiento de las infecciones graves necesita la combinación de un aminoglucósido con un antibiótico que inhiba la síntesis de la pared celular (penicilina, vancomicina o ampicilina); sin embargo más del 25 % de los enterococos son resistentes a los aminoglucósidos; más del 50 % de algunas especies son resistentes a ampicilina y muchos centros describen que más del 20 % de los enterococos son resistentes a la vancomicina. Se han desarrollado nuevos antibióticos específicamente para tratar los enterococos resistentes a ampicilina y vancomicina. Estos incluyen linezolid, quinupristina/dalfopristina y quinolona seleccionadas. ⁽¹⁸⁾

TABLA (3): Ejemplos de Infecciones causadas por Bacterias Gram positivas y tratamientos

Bacteria	Infecciones	Tratamiento
<i>Staphylococcus aureus</i>	<ul style="list-style-type: none">• Síndrome del shock tóxico• Síndrome de la piel escaldada• Impétigo• Bacteremia• Endocarditis	<ul style="list-style-type: none">• Oxacilina• Vancomicina• Meticilina• Nafcilina• Dicloxacilina
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<ul style="list-style-type: none">• Piel escaldada• Infección en las heridas quirúrgicas• Impétigo• Bacteremia• Endocarditis	<ul style="list-style-type: none">• Vancomicina• Oxacilina
<i>Streptococcus pyogenes</i> (Grupo A)	<ul style="list-style-type: none">• Faringitis estreptocócica• Impétigo• Erisipelas,• Gangrena estreptocócica• Síndrome de shock tóxico• Estreptocócico• Artritis	<ul style="list-style-type: none">• Penicilina• Vancomicina• Trimetoprim/ sulfametoxazol• Eritromicina• Cefalosporinas
<i>Streptococcus agalactiae</i> (Grupo B)	<ul style="list-style-type: none">• Endocarditis• Infección del tracto urinario• Infección de una herida• Bacteremia	<ul style="list-style-type: none">• La penicilina G• Combinación de penicilina con aminoglucósidos• Vancomicina
<i>Enterococcus faecalis</i>	<ul style="list-style-type: none">• Infecciones hospitalarias• Infecciones del aparato intrabdominal o intrapélvica• Septicemias intraperitoneales	<ul style="list-style-type: none">• Combinación de un aminoglucósido con penicilina, vancomicina o ampicilina



1.7 BACTERIAS GRAM NEGATIVO

En las infecciones post-quirúrgicas producidas por *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Proteus* o *Pseudomonas* suelen encontrarse también *Streptococos* anaerobios y *B. fragilis*, ya que tales infecciones son generalmente el resultado de contaminación producida por el contenido intestinal.

1.7.1 ESTRUCTURA BÁSICA

Los bacilos Gram (-) normalmente son microorganismos que no forman esporas, las estructura básica de la pared celular de estos bacilos son de gran importancia y son los responsables de su patogenicidad.

Muchos microorganismos, como *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* presentan una capsula formada por material polisacárido, que se denomina antígeno capsular o también llamado antígeno K. A través de la capsula externa de los organismos móviles penetra una estructura proteica denominada flagelo, portadora del antígeno H. Estructuras superficiales llamadas fimbrias que sobresalen de la capsula o de la pared celular externa facilitan la adherencia a la mucosa de diferentes aparatos. ⁽¹⁾

1.7.2 *Pseudomonas aeruginosa* COMO CAUSANTE DE INFECCIONES



IMAGEN (9): *Pseudomonas aeruginosa* en agar Cetrimida

En la práctica clínica *Pseudomonas aeruginosa* (Imagen 9) es el bacilo más importante de los bacilos Gram (-) no fermentadores, debido a que las infecciones sistémicas figuran entre los de mayor tasa de mortalidad; dado que el género y la especie de *P. aeruginosa* (Imagen 9) están asociados con enfermedades gastrointestinales o quemaduras. ⁽¹⁾

Los pigmentos que produce 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.

Es un patógeno oportunista generalmente en pacientes previamente comprometidos, en heridas y en sepsis postquemaduras, infecciones postquirúrgicas, septicemias e infecciones del tracto respiratorio. ⁽²⁰⁾

P. aeruginosa es el causante de dermatitis, causada por disminución del control de la calidad del agua potable y es el más común causante de altas fiebres en infecciones. Puede causar una variedad de infecciones en piel localizadas y generalizadas. Condiciones de humedad elevada (oído de nadadores), infecciones oculares, infecciones pulmonares, foliculitis, entre otras. Los factores comunes de predisposición son ruptura del tegumento que puede ser resultado de quemaduras. La colonización de una quemadura, seguida de un daño vascular localizado, necrosis tisular, y finalmente bacteremia, es frecuente en pacientes con quemaduras graves. ^(32, 34)

TRATAMIENTO

Los antibióticos recomendados de primera elección son principalmente aminoglucósidos (gentamicina, amikacina, tobramicina); 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. ^(18, 20)

1.8 INFECCIONES EN PIEL CAUSADAS POR ENTEROBACTERIAS



1.8.1 *Escherichia coli* COMO CAUSANTE DE INFECCIONES

Son los bacilos Gramnegativos más frecuentes en el tubo digestivo.

La mayoría de las infecciones son endógenas (flora microbiana normal del paciente).

Las cepas que producen gastroenteritis se adquieren generalmente de forma exógena.

Alguna de las enfermedades que produce son: bacteremia, infecciones intraabdominales (asociadas a perforación intestinal), infección del tracto urinario limitada a la vejiga (cistitis) o se puede extender hasta los riñones (pielonefritis) o la próstata (prostatitis).

TRATAMIENTO

IMAGEN (10): *Escherichia coli* en MC.



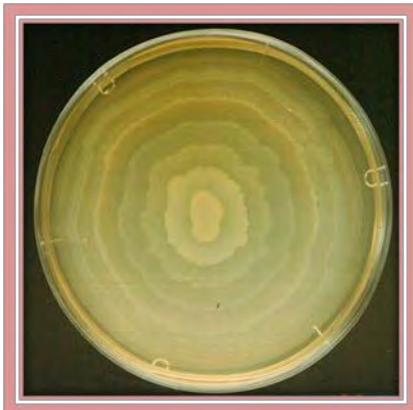
El tratamiento se basa en las pruebas de sensibilidad *in vitro*. Las infecciones se controlan con el mantenimiento de buenas condiciones de higiene para reducir el riesgo de exposición a las cepas que producen gastroenteritis. ⁽¹⁸⁾



1.8.2 *Enterobacter aerogenes* COMO CAUSANTE DE INFECCIONES

Enterobacter aerogenes es una bacteria patógena nosocomial que causa infecciones oportunistas en la piel y otros tejidos, infecciones en neonatos y en pacientes inmunodeprimidos. ^(9, 18)

IMAGEN (11): *Enterobacter aerogenes* en agar EMB.



1.8.3 *Proteus mirabilis* COMO CAUSANTE DE INFECCIONES

Proteus mirabilis está presente principalmente en el aparato urinario bajo, y se le ha considerado responsable de infecciones en heridas y de pulmón. ⁽¹⁾

IMAGEN (12): *Proteus mirabilis* en agar Base Sangre.



1.8.4 *Klebsiella pneumoniae* COMO CAUSANTE DE INFECCIONES

Klebsiella pneumoniae es la causa de hasta el 10% de las infecciones adquiridas en los hospitales (vías urinarias, respiratorias y heridas).⁽¹⁾

Puede producir una neumonía lobular primaria adquirida en la comunidad. Los alcohólicos y las personas con una función pulmonar alterada tienen un mayor riesgo de presentar esta neumonía, debido a su incapacidad para eliminar del tracto respiratorio inferior las secreciones orales aspiradas. Produce también infecciones de las heridas, de los tejidos blandos e infección en el tracto urinario.⁽¹⁸⁾

IMAGEN (13): *Klebsiella pneumoniae* en MC.

Klebsiella pneumoniae es un patógeno nosocomial y adquirido en la comunidad que es una preocupación creciente para los médicos. Es bien conocido que *Klebsiella* spp. es la causa frecuente de infecciones del torrente sanguíneo y neumonía (5% y 7% respectivamente en los EE.UU.). Un estudio reciente realizado en un Hospital de Francia reporta que *K. pneumoniae* causa el 22% de neumonía grave adquirida en la comunidad (solo después de *S. pneumoniae*), y que la infección con esta especie es un factor de riesgo independiente de mortalidad.⁽³³⁾



TABLA (4): Ejemplos de de Infecciones causadas por Bacterias Gram negativas y tratamientos

Bacteria	Infecciones	Tratamiento
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Patógeno oportunista • Sepsis postquemaduras • Infecciones postquirúrgicas • Septicemias • Infecciones del tracto respiratorio • Dermatitis • Infecciones oculares • Infecciones pulmonares • Bacteremia 	<ul style="list-style-type: none"> • Gentamicina • Amikacina • Tobramicina • Cefalosporinas de tercera generación • Cefalosporinas de cuarta generación • Carbapenems
ENTEROBACTERIAS		
<i>Escherichia coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Gastroenteritis • Bacteremia • Infecciones intraabdominales • Cistitis • Pielonefritis • Prostatitis 	<ul style="list-style-type: none"> • Pruebas de sensibilidad <i>in vitro</i> • Buenas condiciones de higiene
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Infecciones oportunistas en la piel y otros tejidos • Infecciones en neonatos y en pacientes inmunodeprimidos 	<ul style="list-style-type: none"> • Cefalosporinas de tercera y cuarta generación
<i>Proteus mirabilis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Infecciones en heridas y de pulmón 	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Infecciones adquiridas en los hospitales (vías urinarias, respiratorias y heridas) • Neumonía lobular primaria infecciones de las heridas, de los tejidos blandos e infección en el tracto urinario 	<ul style="list-style-type: none"> • Trimetoprim / Sulfametoxazol



1.9 HERBOLARIA

Ignoradas en unas épocas de la historia, las plantas medicinales llevan varios milenios esperando pacientemente a que los seres humanos dirijamos hacia ellas nuestra atención, para conocerlas, estudiarlas y aplicarlas. Después de una época de brillantes progresos científicos, en la que la terapéutica, ciencia de la curación, ha cifrado todas sus esperanzas en sofisticados laboratorios y en dispositivos de alta tecnología, vuelve a resurgir el interés por los remedios simples que ofrece la naturaleza: no solo las plantas, sino también el agua (hidroterapia), el sol (helio terapia) o las tierras medicinales (geoterapia), entre otros. La ayuda que el ser humano necesita para sus muchas enfermedades y dolencias, la tiene ahora de la tierra, de las hierbas del campo. En estos árboles silvestres olvidados, como se llamo en antaño a las plantas medicinales, ahí es donde esconde la naturaleza sus mejores remedios para la salud de los humanos. ⁽²⁸⁾

En la actualidad los extractos naturales de plantas es una industria que mueve millones de euros alrededor del mundo. Se conocen aproximadamente 1340 plantas con potenciales de fuentes de antimicrobianos, pero se conocen más de 250,000 especies de plantas que contienen una gran diversidad de componentes bio-activos. Sólo en el año de 1999 el negocio global de la venta de suplementos naturales de plantas en humanos excedió de 15 billones de dólares, de los cuales 7 billones fueron en Europa, 2.4 billones en Japón, 2.7 en el resto de Asia y 3 billones en Norte América. ^(35, 36)

1.10 BENJUÍ

1.10.1 NOMBRE CIENTÍFICO: *Styrax benzoin Dryand.*

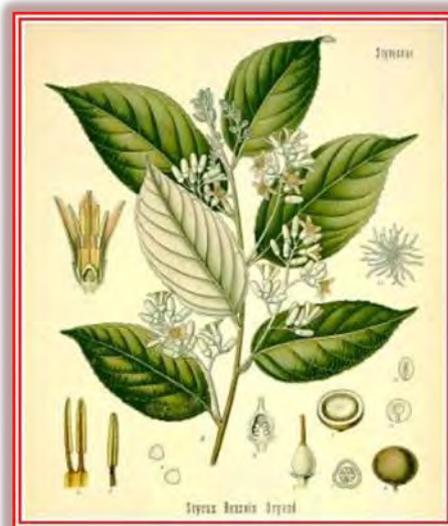
1.10.2 ANTECEDENTES

La palabra *Styrax* deriva del griego y significa "resina olorosa o resina con olor a vainilla" y el término *ben* significa "fragante" y *zoa* = "zumo o jugo". Así mismo, de este nombre deriva estoraque, utilizado en español antiguo así como el término árabe *assthirak*. El árbol fue denominado *Styrax* debido a la goma que sale del mismo. "La goma de este árbol es caliente y molificante". Para que se produzca la resina se requieren dos factores: altitud y algunas infecciones por hongos que sufre la planta.

En algunas regiones del sur de Asia. El benjuí se empleaba para curar las heridas de los pies y, de acuerdo con una tradición, había que aplicarlo a los recién circuncidados. ⁽⁴²⁾

1.10.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

El *Styrax benzoin Dryand.* (Benjuí) son árboles pertenecientes a la familia de las Estiracáceas de crecimiento rápido, cuya altura oscila entre 5 y 30 m; corteza gris resinosa, con las hojas ovales o elípticas, enteras y cubiertas de pelillos blanquecinos por el envés de hasta 14 cm de largo. Los fragantes racimos de flores blancas que aparecen en primavera y verano son regulares y sedosas que se encuentran agrupadas en una cima, se transforman en frutos redondeados de unos 5 cm de diámetro, cada uno de los cuales encierra una o dos semillas esferoidales. ^(13, 42) (Imágenes 14 y 15)



IMAGENES (14 y 15): Hojas y flores de *Styrax benzoin Dryand.*

(Jorge A. 2007; Selecciones del Reader's Digest. 1987)

TABLA (5): Clasificación científica del *Styrax benzoin Dryand.*

CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Ebenales
Familia	Styracaceae
Género	<i>Styrax</i>
Especie	<i>S. benzoin Dryand.</i>

(Waizel. J. 2006)

1.10.4 PARTE UTILIZADA

La edad óptima para obtener la resina es entre 7-10 años, cuando los troncos son por lo general alrededor de siete u ocho pulgadas de diámetro. La esencia se encuentra en la resina que se obtiene cuando los recolectores hacen profundos cortes al tronco con una hachuela o perforaciones triangulares con un cuchillo para que el líquido escurra. La resina, de color blanco amarillento o café rojizo, se va endureciendo y formando gruesas lágrimas sobre la corteza. Aunque el flujo es mayor durante los primeros tres años de explotación, suele durar tres años más. En general, los árboles mueren entre los 17-20 años.

La resina del *S. benzoin* suele llamarse benjuí de Sumatra, y es la que se emplea en la industria farmacéutica en combinación con otras plantas que se conocen tienen actividad farmacológica. ^(13, 41, 42)

En ocasiones se emplea el benjuí de Siam que procede de *S. tonkinensis* (en especial en la industria, como aromatizante y para dar sabor a los alimentos). ^(10, 11, 13)

1.10.5 HABITAT

Esta especie es originaria de los bosques tropicales del sudeste asiático, en especial en Malasia e Indonesia, reportándose que el árbol crece en las islas de Sumatra, Java y Borneo (Imagen 16). Crece en los llanos, a orillas de los ríos, sobre suelos húmedos, soportando temperaturas mínimas de 15-18⁰. (10, 11, 12, 42)

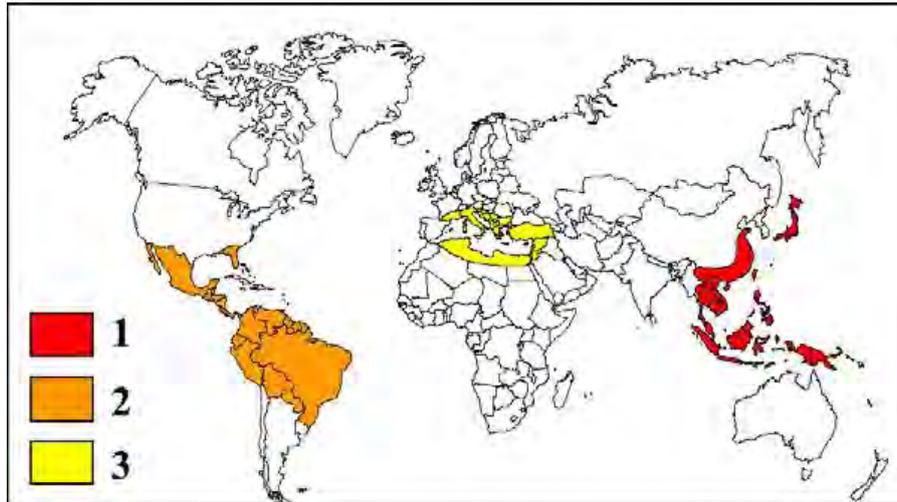


IMAGEN (16): Distribución geográfica de las especies botánicas pertenecientes al género *Styrax*.
Asia (zona 1), América (zona 2), Cuenca mediterránea (zona 3)
(Hovaneissian. M. et al. 2006)

TABLA (6): Distribución geográfica de las especies botánicas pertenecientes al género *Styrax*.

Zona	Distribución geográfica	Especie Botánica
1	Laos ; Tailandia; Viet-Nam ; Malasia	<i>Styrax tonkinensis</i>
	Islas de Sumatra, Java y Borneo ; Malasia	<i>Styrax benzoin</i> y <i>Styrax benzoides</i>
	Islas de Sumatra ; Malasia	<i>Styrax paralleloneurum</i> y <i>Styrax crotonoides</i>
	Malasia	<i>Styrax ridleyanum</i>
	Islas de Sumatra	<i>Styrax subpaniculatum</i> y <i>Styrax subdenticola</i>
	China	<i>Styrax macrothyrsus</i> y <i>Styrax subniveus</i>
	Japón	<i>Styrax japonicum</i>
2	California	<i>Styrax californicus</i>
	Peru	<i>Styrax ovatus</i>
	Bolivia	<i>Styrax pearcei</i> y <i>Styrax aureus</i>
	América	<i>Styrax reticulata</i> y <i>Styrax ferruginea</i>

3	Cuenca Mediterránea	<i>Styrax officinalis</i>
---	---------------------	---------------------------

Especie de Benjuí utilizada en este trabajo
(Hovaneissian. M. et al. 2006)

1.10.6 COMPOSICIÓN QUÍMICA

La actividad del *Styrax benzoin Dryand.* (Benjuí) es atribuida a la presencia de:

- 90% de materia resinosa compuesta principalmente por:
 - Cinamato de coniferilo
 - Ácido suma-resinólico (6-hidroxioleanólico - Ácido triterpenoide derivado del oleanólico)

- Ácidos balsámicos libres:
 - Ácido benzoico (10-20%)
 - Ácido cinámico (10-30%)

- Fenilpropil-cinamato (2-3%)
- Trazas de cinamil-cinamato, estireno y benzaldehído.
- Trazas de vainillina (0.5 - 1%).^(12, 42)

1.10.7 ACCIONES FARMACOLÓGICAS (ÍNDICACIONES TERAPÉUTICAS)

Es útil como antiséptico, antifúngico y cicatrizante en casos de heridas, ulceraciones, dermatomicosis, acné, forunculosis, eczemas, psoriasis, escaldaduras, quemaduras; también está indicado en bronquitis, bronquiectasias, enfisema y asma.⁽⁴²⁾

1.11 EFECTOS ADVERSOS Y/O TÓXICOS

En las dosis adecuadas no se han reportado efectos adversos tóxicos. Componentes de la tintura de benjuí (en muchos con agregados de aloe, bálsamo de Tolú y estoraque) pueden originar dermatitis de contacto en personas sensibles cuando es aplicado tópicamente. El ácido benzoico es relativamente no tóxico. Los vapores desprendidos por el benjuí pueden originar



accesos de tos. ⁽⁴²⁾

- No se han documentado contraindicaciones.



1.12 JUSTIFICACIÓN

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 sobrevivencia de los pacientes con infecciones por cualquier tipo de bacteria.

En México no se tienen reportes de estudios que se hayan realizado sobre el *Styrax benzoin Dryand.* en bacterias y ya que la utilización de plantas medicinales como una alternativa para el tratamiento de diferentes patologías es muy común, en el siguiente trabajo se evalúa el efecto antimicrobiano que tiene el extracto en bacterias que se asocian a infecciones de heridas humanas, ya que esta planta se usa dentro de la medicina tradicional como antiséptico y cicatrizante en casos de heridas, ulceraciones, acné, escaldaduras y quemaduras.

1.13 HIPÓTESIS

Si el extracto de *Styrax benzoin Dryand.* presenta una actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* entonces se podrá proponer como una alternativa para la elaboración de fármacos en heridas humanas.



1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto inhibitorio del extracto de *Styrax benzoin Dryand.* en 10 bacterias que comúnmente se asocian a infecciones de heridas humanas utilizando el método de Mosmann y Microscopía Electrónica de Transmisión.

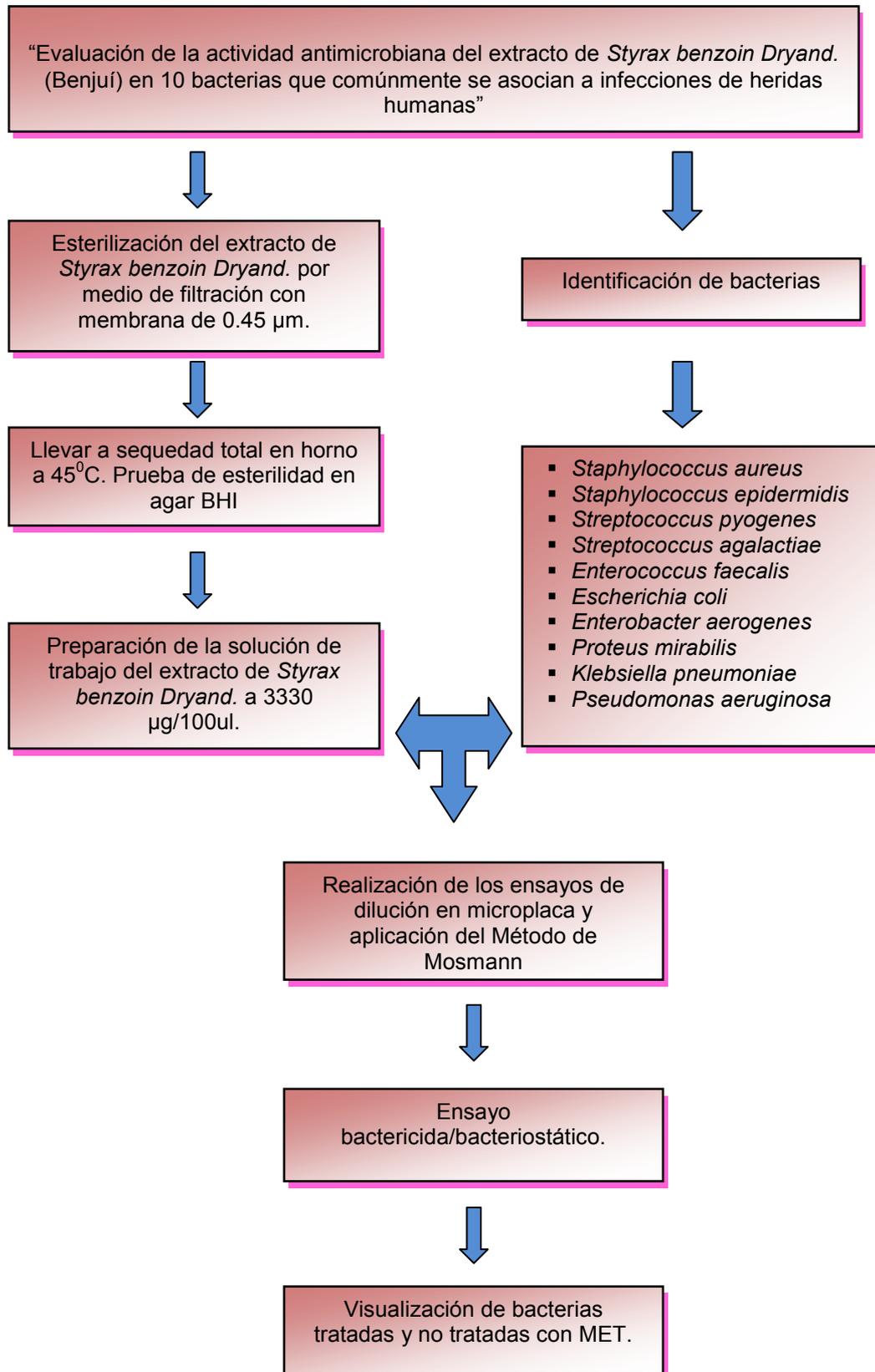
2.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener el extracto seco total de *Styrax benzoin Dryand.* para realizar una solución de concentración conocida.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto de *Styrax benzoin Dryand.* mediante el método de Mosmann sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*
- Determinar la actividad bactericida y/o bacteriostática del extracto de *Styrax benzoin Dryand.* (Benjuí) mediante una prueba de crecimiento en placa.
- Observar el efecto producido en las bacterias antes mencionadas con la ayuda del microscopio electrónico de transmisión.



1. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



3.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO *Styrax benzoin Dryand.*

El extracto etanólico-acuoso de *Styrax benzoin Dryand.* fue proporcionado por laboratorios Extractos SIGMA Σ , con un volumen aproximado de 850 ml.

3.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN DE TRABAJO DE *Styrax benzoin Dryand.*

1. El extracto etanólico-acuoso se esterilizó por filtración haciendo pasar el extracto a través de una membrana Millipore de 0.45 μm , un filtro de bala y una bomba de vacío. El filtrado se recibió en una botella ámbar estéril.
2. El extracto de *Styrax benzoin Dryand.* ya estéril se colocó en un cristizador estéril llevando a sequedad total dentro de un horno a 45°C, en condiciones de esterilidad se recolectó la materia seca con ayuda de una espátula y se colocó en un frasco ámbar para su conservación. Se determinó el rendimiento.
3. Se pesó en una balanza analítica 1 gr de materia seca y se colocó en un matraz aforado de 50 ml, se le agregaron 5 ml de DMSO y se agitó con un vortex para disolverlo. Se aforó a 30 ml con SSF estéril al 0.9%. Esta es la solución de trabajo, la cual tiene una concentración de 3330 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ (33.3 mg/ml).
4. La solución de trabajo estéril se colocó y conservó en un frasco ámbar protegido de la luz y se mantuvo a temperatura de refrigeración.

3.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRABAJO

$$\frac{1000\text{mg}}{30\text{ml}} = 33.3 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \left(\frac{0.1\text{ml}}{100\mu\text{l}} \right) \left(\frac{1000\mu\text{g}}{1\text{mg}} \right) = 33.3 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} = 3330 \frac{\mu\text{g}}{100\mu\text{l}}$$

$$33.3 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} = \left(\frac{1000\mu\text{l}}{1\text{ml}} \right) \left(\frac{1\text{mg}}{1000\mu\text{g}} \right) = 33.3 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$



3.5 PRUEBA DE ESTERILIDAD PARA LA SOLUCIÓN DE TRABAJO

- Con una micropipeta con punta estéril se tomaron 100 µl de la solución de *Styrax benzoin Dryand.* y se colocaron en una placa de agar BHI. Se realizó con el asa bacteriológica un sembrado masivo. Se incubó durante 24 horas a 37°C y se observó si se presentó crecimiento.
- Si alguno de las soluciones de trabajo llegara a presentar crecimiento microbiano se debe de esterilizar nuevamente por filtración con membrana millipore de 0.45 µm mejorando las condiciones de trabajo.

3.6 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS

Las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* que se emplearon en el presente trabajo fueron proporcionadas por el laboratorio 10 de Microbiología en la Unidad de Posgrado de la F. E. S. Cuautitlán.

A todas las cepas se les realizó la tinción de Gram, la prueba de Catalasa y Oxidasa para verificar género, y para identificar las especies se realizaron las pruebas bioquímicas secundarias correspondientes.

3.7 PREPARACION DEL ENSAYO EN MICROPLACA CON EL EXTRACTO DE *Styrax benzoin Dryand.*

1.7.1 PREPARACION DE MATERIAL

- Se sembraron las bacterias a utilizar en el ensayo en placas de Agar Infusión cerebro corazón (BHI), se incubaron en estufa bacteriológica a 37°C durante 24 horas.
- Se preparó Solución Salina al 0.9%; Caldo Infusión cerebro corazón (BHI) que se distribuyó en tubos de ensaye con tapón de rosca aproximadamente 4ml en cada tubo. Se esterilizaron en autoclave a 15 lb. De presión, 121°C durante 15 minutos.
- Se esterilizaron también puntas para micropipeta de 100 µl a las mismas condiciones.
- Se necesitaron 3 Microplacas de 96 pozos estériles, micropipeta de 100 µl, tubo 0.5 Mc Farland, agitador vortex y un asa bacteriológica.

3.7.2 ENSAYO EN MICROPLACA (Tabla 7)

- La microplaca cuenta con 96 pozos con columnas del 1 al 12 y filas de la A a la H, donde cada dos filas corresponden a una bacteria diferente.
- Se colocaron en todos los pozos de las columnas 2 a la 9, 100 μ l de SSF Estéril con la micropipeta y puntas estériles.
- Se colocaron en todos los pozos de la columna 1 y 2, 100 μ l del extracto.
- A partir de los pozos de la columna 2 y hasta la 9, se realizaron diluciones dobles del extracto obteniendo un volumen final de 100 μ l por pozo. Los 100 μ l restantes del pozo 9 se desechan. (Imágenes 17 y 18)
- Se inoculó un tubo con caldo BHI estéril a doble concentración con la bacteria a probar y se estandarizó al 0.5 con el nefelómetro de Mc Farland, mezclando con agitador vortex.
- Se agregaron a los pozos de la columna 1 a la 9 de la fila A y B, 100 μ l de la bacteria estandarizada al 0.5 con el nefelómetro de Mc Farland.
- Se realizaron los dos pasos anteriores para cada una de las bacterias a probar, una bacteria por cada dos filas.
- La columna de pozos numero 10 corresponde a un Control Positivo el cual contiene 100 μ l de SSF estéril y 100 μ l con la bacteria a probar correspondiente a cada dos filas.
- La columna de pozos numero 11 corresponde a un Control Negativo el cual contiene 100 μ l de SSF estéril y 100 μ l de Caldo BHI doble concentración estéril.
- La columna de pozos numero 12 corresponde a un Blanco el cual contiene 100 μ l del extracto estéril y 100 μ l de Caldo BHI doble concentración estéril.
- Una vez terminada la microplaca, se dejó incubando en estufa bacteriológica a 37 °C durante 24 horas.



IMÁGENES (17 y 18): Ensayo en microplaca

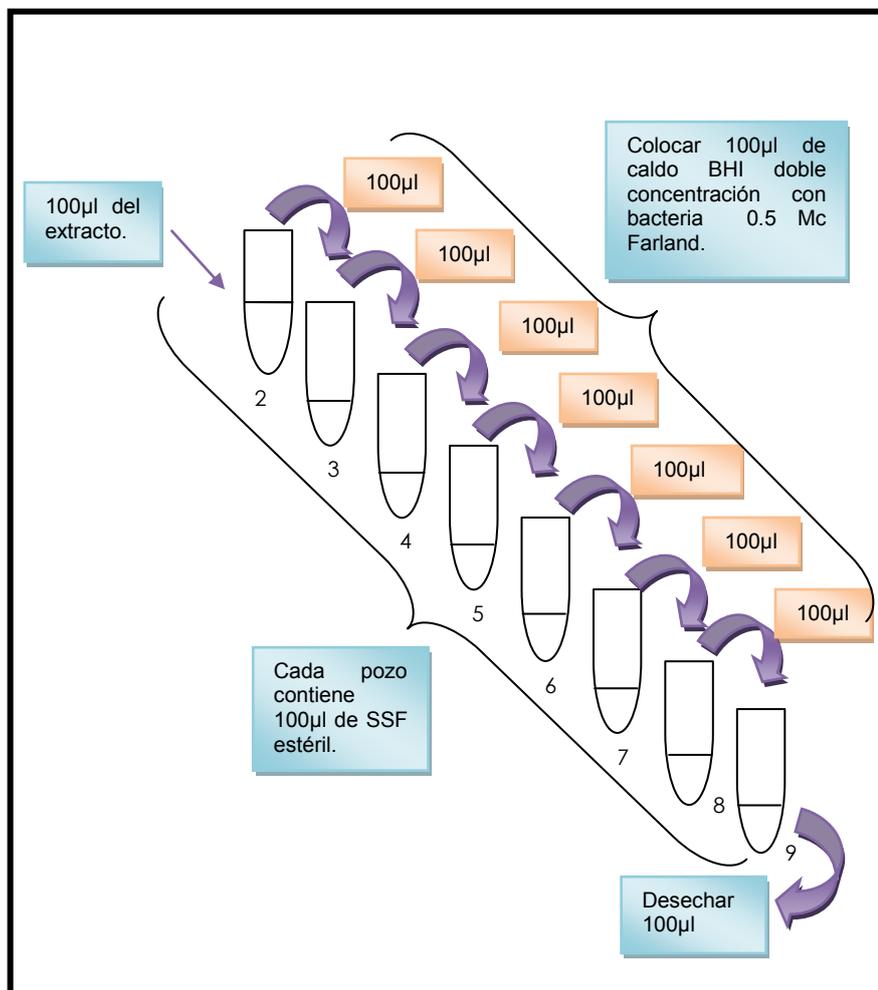
TABLA (7): Ensayo en microplaca

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 Control (+)	11 Control (-)	12 Blanco
A	100µl extracto + 100µl caldo BHI a doble concentración con bacteria a probar estandarizada 0.5 Mc Farland									100µl SSF estéril + 100µl caldo BHI doble concentración con bacteria a probar estandarizada 0.5 Mc Farland	100µl SSF + 100µl Caldo BHI	100µl extracto + 100µl de Caldo BHI
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Preparar diluciones como lo muestra el siguiente diagrama

(Mosmann, T. et al., 1983, G. et al 1986)

IMAGEN (19): Diluciones para la microplaca



3.7.3 PRUEBA DE MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol)

En esta técnica se realizó una lectura colorimétrica adicionando a todos los pozos de la microplaca 5 µl de reactivo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol (MTT) el cual presenta un color amarillo. Se incubó durante 15 a 30 minutos. Si no hay presencia de bacterias viables en el pozo el MTT permanecerá de color amarillo, mientras que si hay bacterias viables el MTT va a virar a color violeta/morado.

Esta técnica nos permite observar y determinar fácilmente que pozos de la microplaca presentan crecimiento y en que pozos este se ha inhibido por acción del extracto y así determinar la CMI.

El extracto de *Styrax benzoin Dryand.* sobre las 10 bacterias se determinó por el método de dilución en microplaca, después de que se realizó este ensayo se le agregó el reactivo de MTT, que en su forma reducida cambia de color morado púrpura por acción de la enzima deshidrogenasa, la cual indica presencia de bacterias viables, y al permanecer en su color amarillo indica que no hay crecimiento de microorganismos, por lo tanto hay un efecto inhibitorio del extracto.

3.7.4 DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

La Concentración mínima inhibitoria (CMI) se determina en la lectura de resultados de la microplaca y se considera que es la mínima concentración del extracto que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de la cepa bacteriana, así como su viabilidad esto se evidencia por turbidez o colorimetría empleando el reactivo de MTT. Color morado púrpura indica desarrollo bacteriano y el color amarillo indica que no hay bacterias viables.

3.7.5 ENSAYO BACTERICIDA - BACTERIOSTÁTICO

Después del tiempo de incubación de las microplacas y antes de agregar el reactivo de MTT, se tomó una asada de muestra de cada pozo de cada bacteria, que se sembraron en placas de agar BHI divididas en 24 secciones que se incubaron durante 24 horas a 37° C (Imagen 20).

En el caso de *Proteus mirabilis*, el ensayo se realizó en 24 tubos de ensayo con tapón de rosca que contenían agar BHI (Imagen 21) ya que presenta el fenómeno de swarm y durante la incubación la bacteria crece y se extiende por todo el agar.

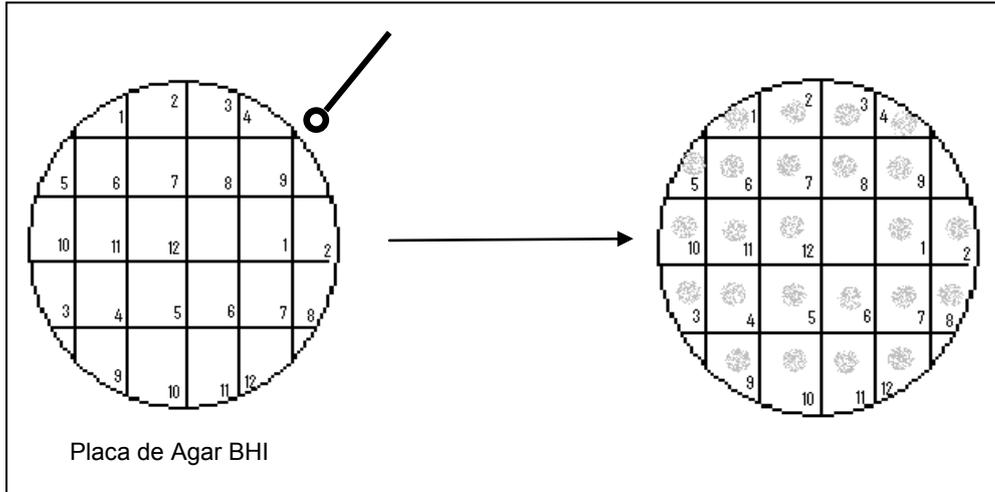


IMAGEN (20): Técnica de sembrado para el ensayo bactericida-bacteriostático.

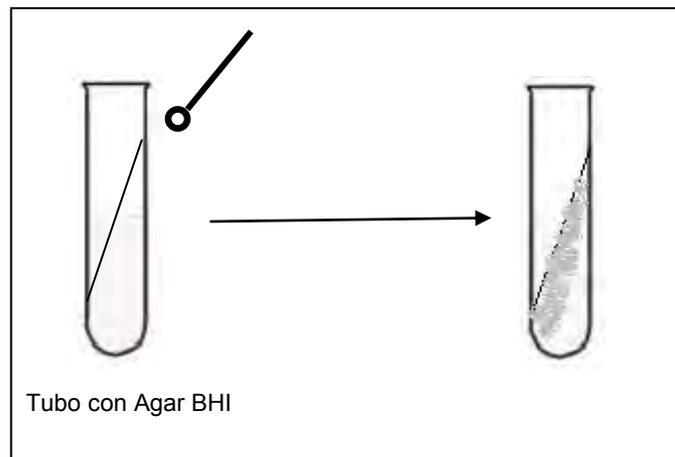


IMAGEN (21): Técnica de sembrado para el ensayo bactericida-bacteriostático de *Proteus mirabilis*.



3.7.6 INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS PARA DETERMINAR EFECTO BACTERICIDA - BACTERIOSTATICO

Se observaron cada una de las placas y tubos y se verificó que los controles negativos y los blancos no presenten crecimiento, así como los controles positivos un crecimiento óptimo.

- Si existe crecimiento en donde se sembró la muestra problema se determina que el efecto es bacteriostático.
- Si no existe crecimiento en donde se sembró la muestra problema se determina que el efecto es bactericida.



1. RESULTADOS

4.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS

A las 10 cepas se les realizó la tinción de Gram, la prueba de Catalasa y Oxidasa para verificar género y para identificar las especies se realizaron las pruebas bioquímicas secundarias que se muestran en las tablas que a continuación se presentan (Tablas 8, 9 y 10)

TABLA (8): Identificación de bacterias Gram positivas (*Staphylococcus*)

Bacteria	Morfología	Catalasa	Coagulasa	Oxidasa	Manitol	Hemólisis	Novobiocina
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos en racimos	+	+	NR	+	β	NR
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cocos en racimos	+	-	NR	-	α	S

TABLA (9): Identificación de bacterias Gram positivas (*Streptococcus*)

Bacteria	Morfología	Catalasa	Hemólisis	Bacitracina	Hidrólisis Hipurato	CAMP	Bilis Esculina
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Cocos, cadenas	-	β	S	-	-	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Cocos, racimos y cadenas	-	β	R	+	+	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cocos, racimos y cadenas	-	β	R	-	-	+

TABLA (10): Identificación de bacterias Gram negativas

Bacteria	Morfología	Motilidad	Catalasa	Oxidasa	Indol	RM	VP	Citrato	Urea	H ₂ S en TSI	Malonato
<i>Escherichia coli</i>	Bacilos	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Bacilos	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Proteus mirabilis</i>	Bacilos	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacilos	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilos	+	+	+	-	-	-	+	-	-	NR

- + prueba positiva
 - prueba negativa
- NR no se realizó

4.2 EXTRACTO DE *Styrax benzoin Dryand.*

Se obtuvo una solución de trabajo a partir del extracto acuoso-etanólico de *Styrax benzoin Dryand.* con calidad microbiológica, con un rendimiento de 3.6 gramos/850 ml.

4.3 ESTERILIDAD DEL EXTRACTO

La prueba resultó satisfactoria ya que después de un periodo de incubación a 37 °C en agar BHI no observamos ningún tipo de crecimiento. (Imagen 22)

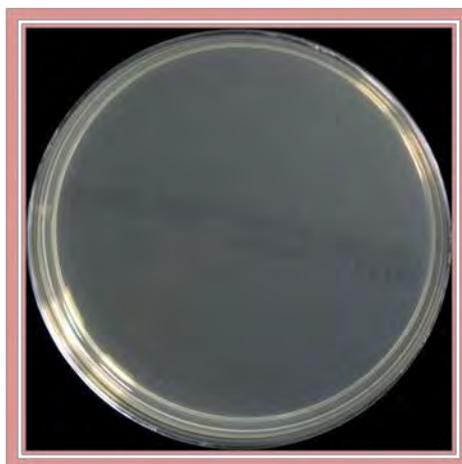


IMAGEN (22): Agar BHI después de incubación sin crecimiento de microorganismos.

4.4 SOLUBILIDAD DEL EXTRACTO

Después de pesar 1 gr del extracto seco total del *Styrax benzoin Dryand.*, se requirieron de 5 ml de DMSO puro y un afore a 30 ml con SSFE para una disolución total.



4.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO DE *Styrax benzoin Dryand.* SOBRE LAS BACTERIAS SELECCIONADAS

La técnica de MTT nos permitió determinar las MIC's para las 10 bacterias seleccionadas. (Tablas 11 y 12 e Imágenes 23-26).

Se realizó una lectura visual obteniéndose resultados cuantitativos, siendo las bacterias más sensibles *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus agalactiae* con una CMI de 13.01 µg/100µl, después *Streptococcus pyogenes* con una CMI de 26.02 µg/100µl, detrás *Escherichia coli* con una CMI de 208.12 µg/100µl, a continuación *Proteus mirabilis* con una CMI de 416.25 µg/100µl, posteriormente *Klebsiella pneumoniae* con una CMI de 832.5 µg/100µl y por último *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter aerogenes* fueron las más resistentes al verse inhibidas solo a 1665 µg/100µl. (Tabla 11)

TABLA (11): Simplificada de las CMI's del extracto de *Styrax benzoin Dryand.* en 10 géneros bacterianos.

Clasificación	Microorganismo	CMI (µg/100µl)
Gram positivas	<i>Staphylococcus aureus</i>	1665
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1665
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	26.02
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	13.01
	<i>Enterococcus faecalis</i>	13.01
Gram negativas	<i>Escherichia coli</i>	208.12
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1665
	<i>Proteus mirabilis</i>	416.25
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	832.5
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1665

TABLA (12): A detalle de los resultados cuantitativos obtenidos de la lectura en la microplaca.

Bacteria	µg/100µl											
	1665	832.5	416.25	208.12	104.06	52.03	26.02	13.01	6.505	Control (+)	Control (-)	Blanco
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

+ Desarrollo de la bacteria, - Inhibición de desarrollo de la bacteria, C bacteriana

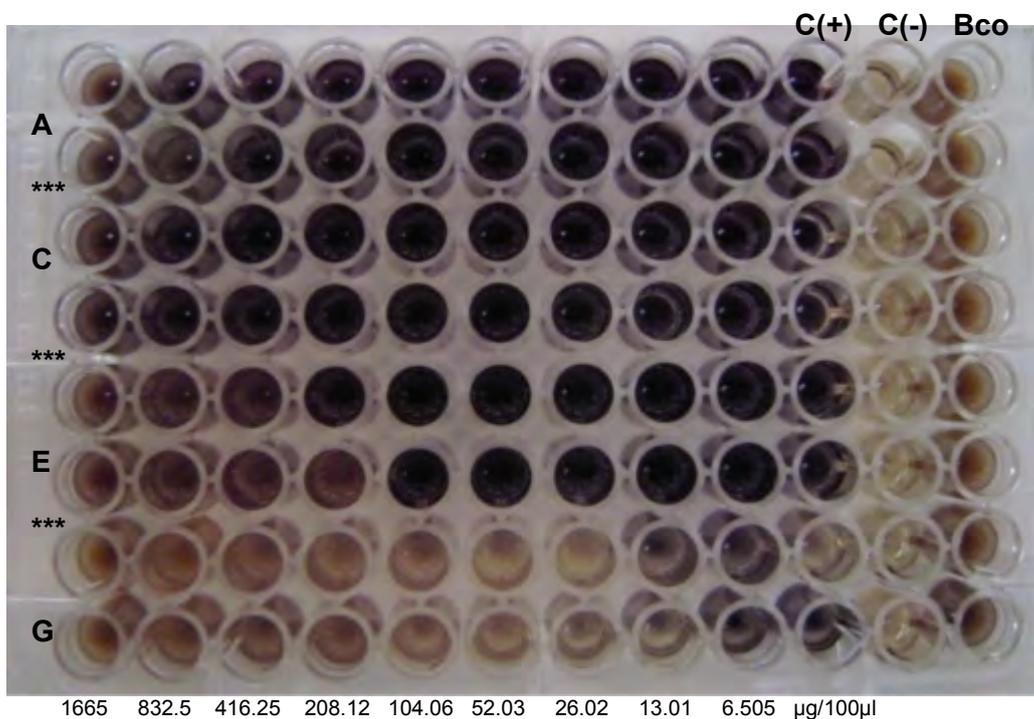


IMAGEN (23): Resultados para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Streptococcus pyogenes* con el extracto; lectura con MTT dilución en microplaca. // A: *Staphylococcus aureus*; C: *Staphylococcus epidermidis*; E: *Escherichia coli*; G: *Streptococcus pyogenes*

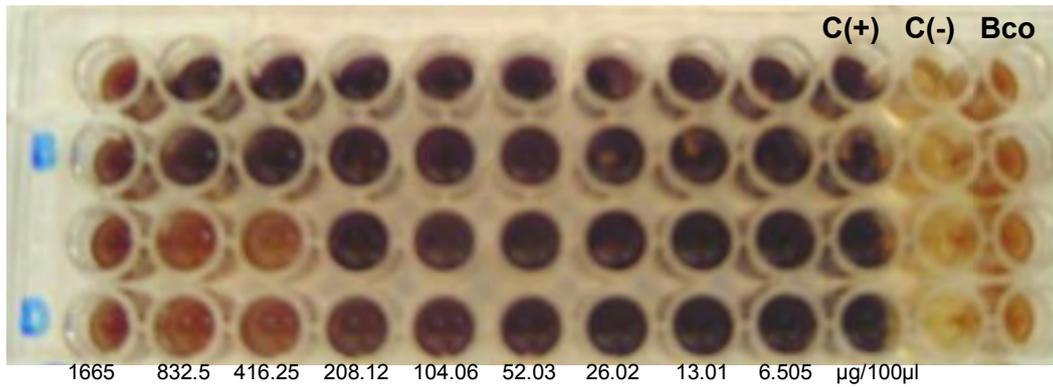


IMAGEN (24): Resultados para *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis* con el extracto; lectura con MTT dilución en microplaca. // B: *Pseudomonas aeruginosa*; D: *Proteus mirabilis*.

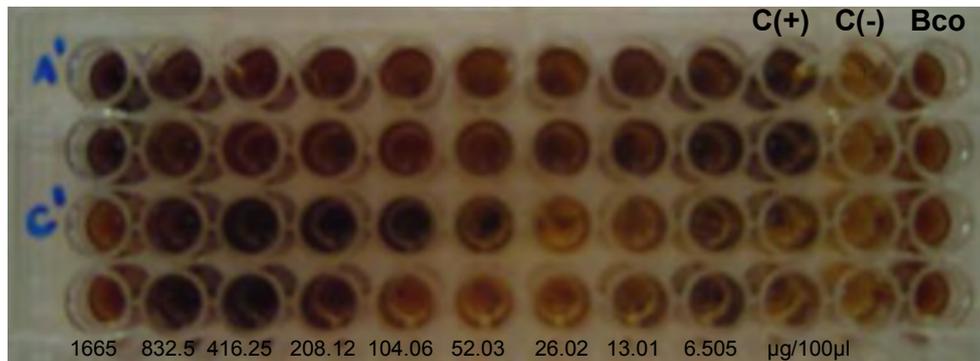


IMAGEN (25): Resultados para *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus agalactiae* con el extracto; lectura con MTT dilución en microplaca. // A': *Enterococcus faecalis*; C': *Streptococcus agalactiae*.

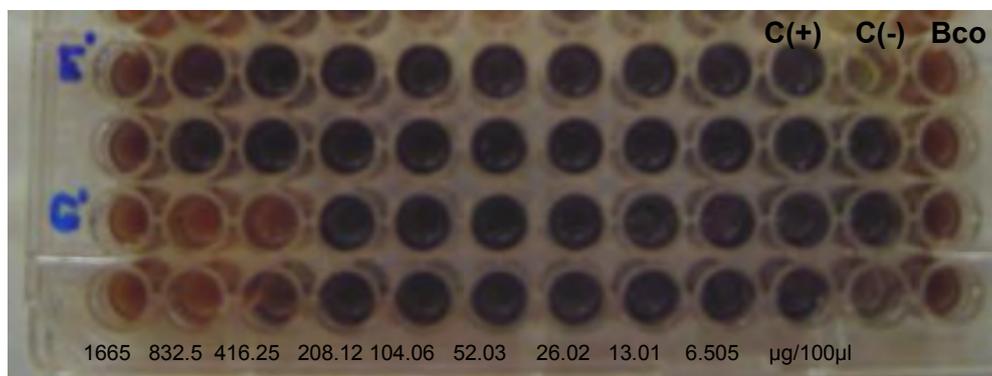
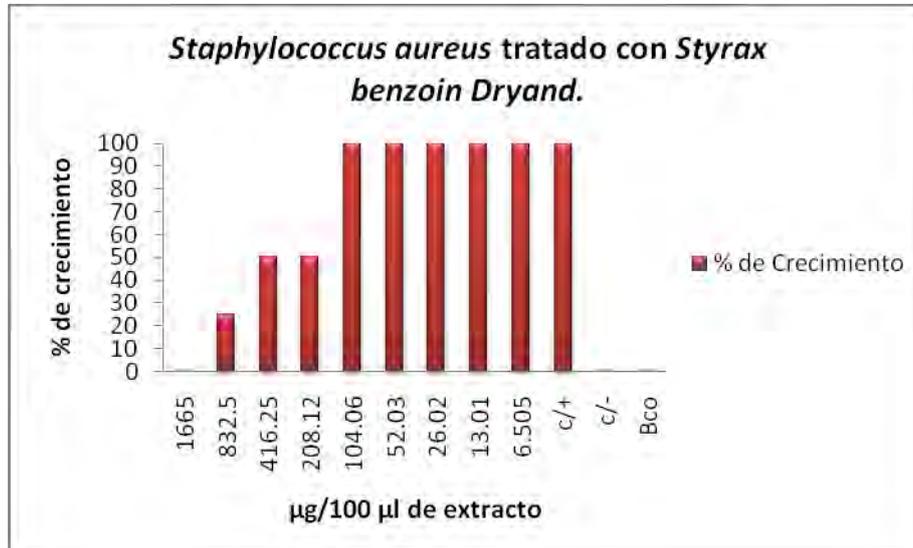
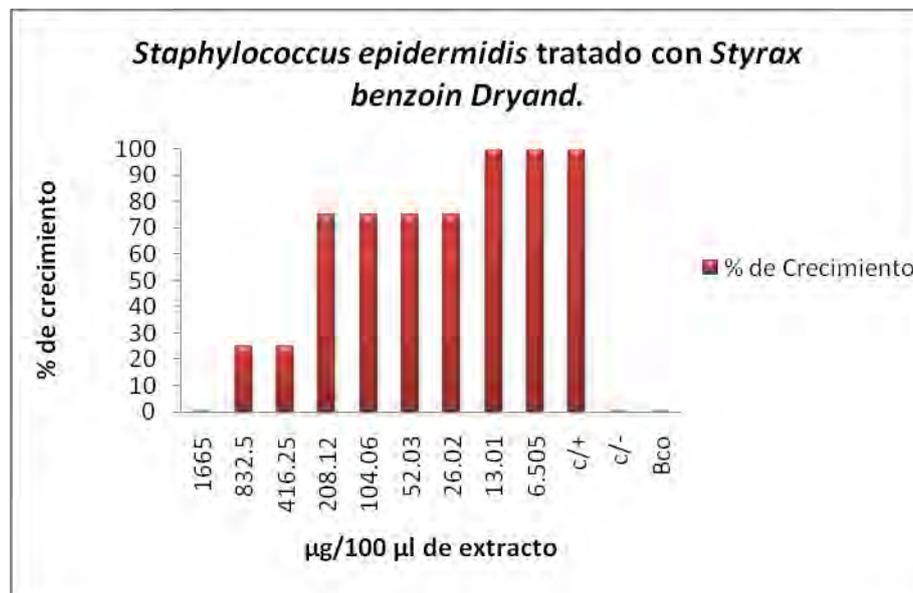


IMAGEN (26): Resultados para *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella pneumoniae* con el extracto; lectura con MTT dilución en microplaca. // E': *Enterobacter aerogenes*; G': *Klebsiella pneumoniae*.

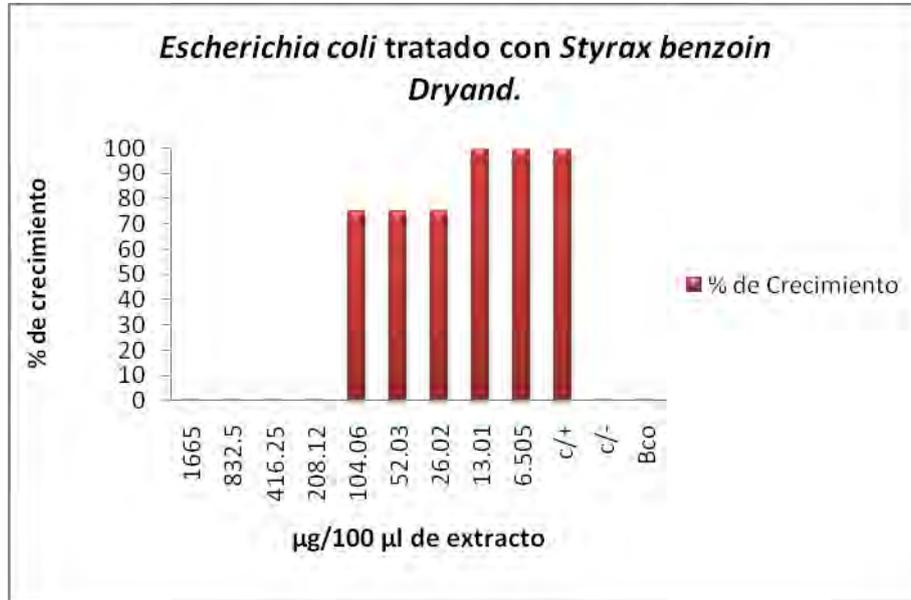
GRÁFICA (2): Representación gráfica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de *Styrax benzoin Dryand.* en *Staphylococcus aureus.*



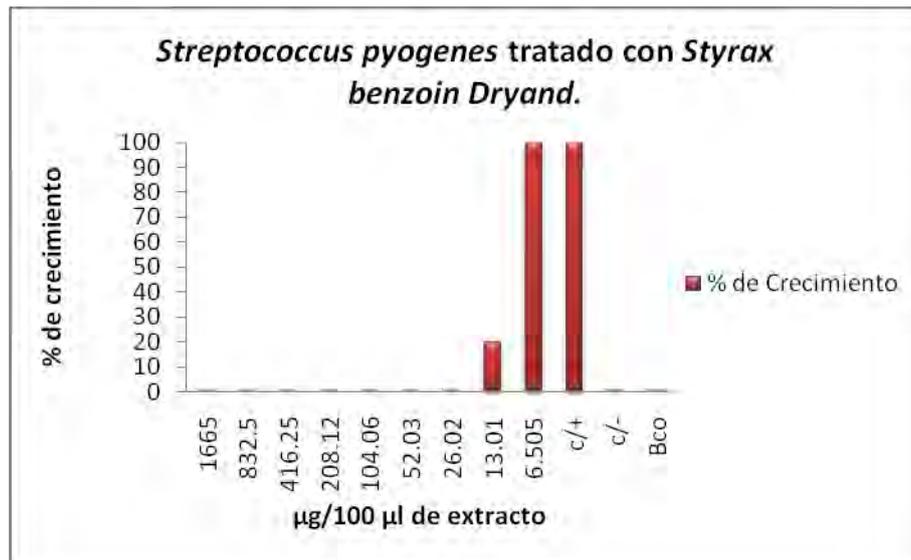
GRÁFICA (3): Representación gráfica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de *Styrax benzoin Dryand.* en *Staphylococcus epidermidis.*



GRÁFICA (4): Representación gráfica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de *Styrax benzoin Dryand.* en *Escherichia coli*.



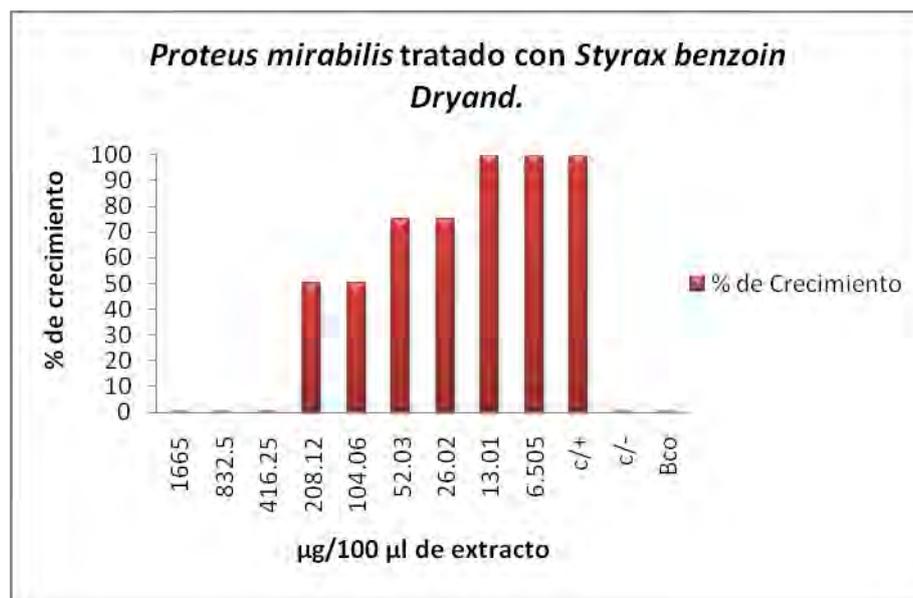
GRÁFICA (5): Representación gráfica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de *Styrax benzoin Dryand.* en *Streptococcus pyogenes*.



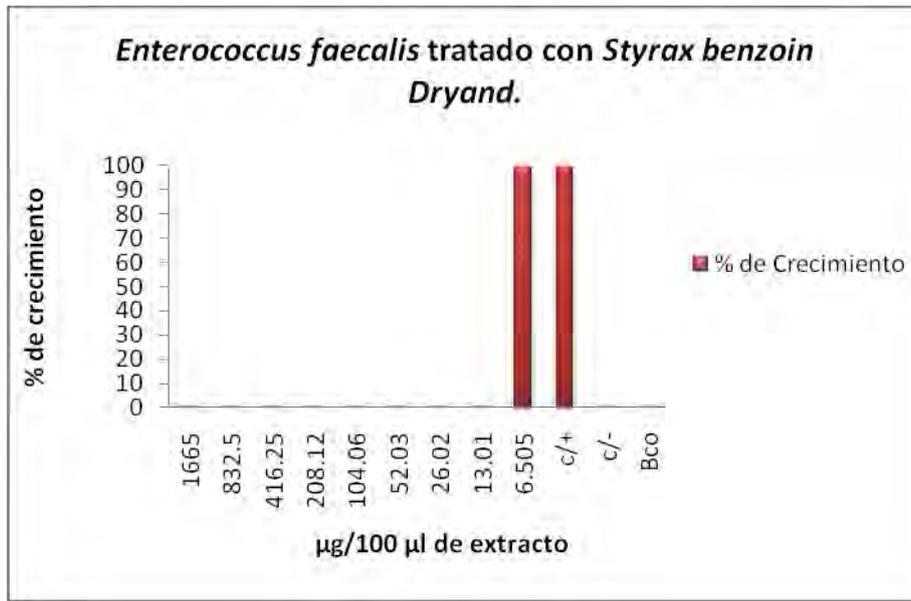
GRÁFICA (6): Representación gráfica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de *Styrax benzoin Dryand.* en *Pseudomonas aeruginosa*.



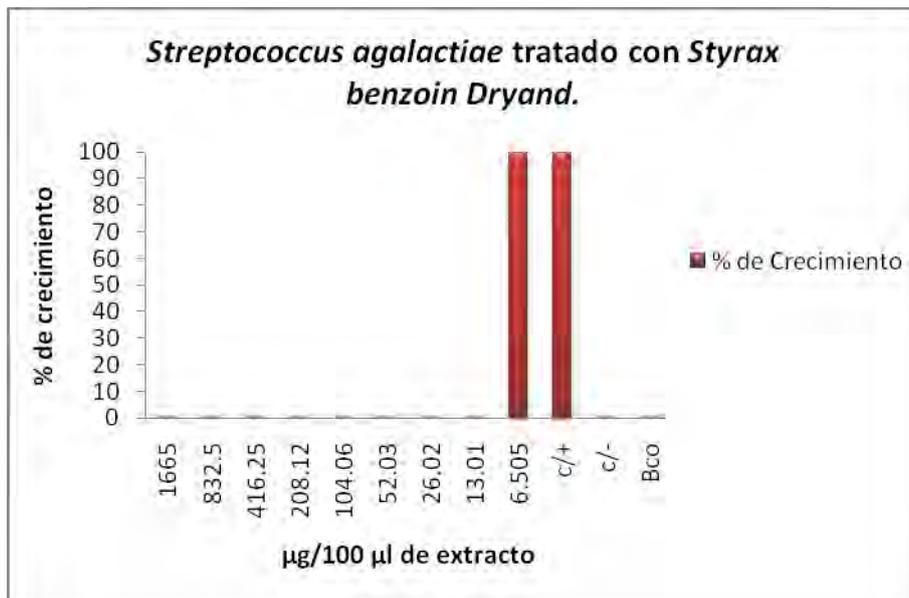
GRÁFICA (7): Representación gráfica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de *Styrax benzoin Dryand.* en *Proteus mirabilis*.



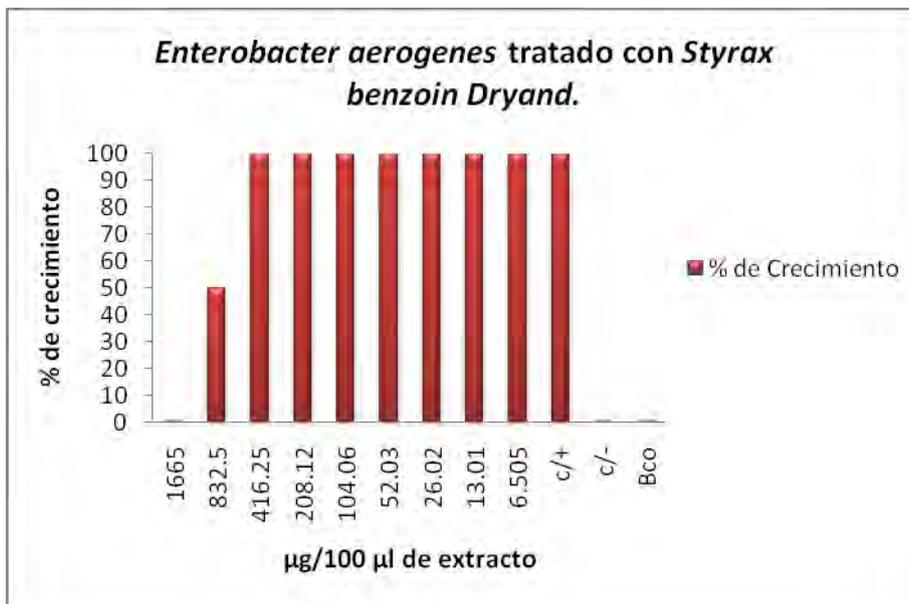
GRÁFICA (8): Representación gráfica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de *Styrax benzoin Dryand.* en *Enterococcus faecalis*.



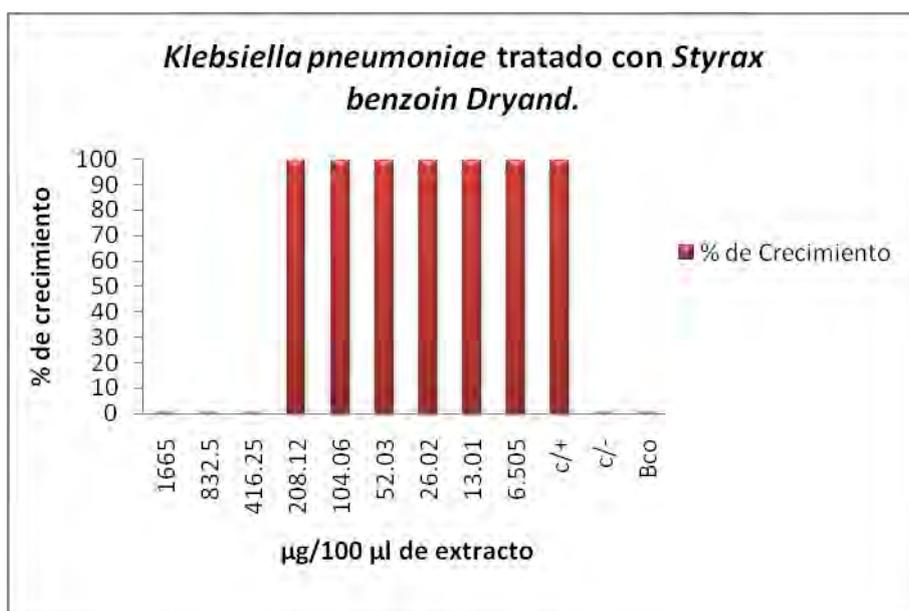
GRÁFICA (9): Representación gráfica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de *Styrax benzoin Dryand.* en *Streptococcus agalactiae*.



GRÁFICA (10): Representación gráfica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de *Styrax benzoin Dryand.* en *Enterobacter aerogenes*.



GRÁFICA (11): Representación gráfica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de *Styrax benzoin Dryand.* en *Klebsiella pneumoniae*.



4.6 RESULTADOS DEL EFECTO BACTERICIDA / BACTERISTÁSTICO DEL EXTRACTO DE *Styrax benzoin Dryand.* EN 10 GÉNEROS BACTERIANOS

Staphylococcus aureus:

Se observa crecimiento desde la concentración de 1665 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ hasta 6.505 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ (cuadrantes 1–9), por lo tanto el efecto sobre *Staphylococcus aureus* es solamente bacteriostático. (Imagen 27).

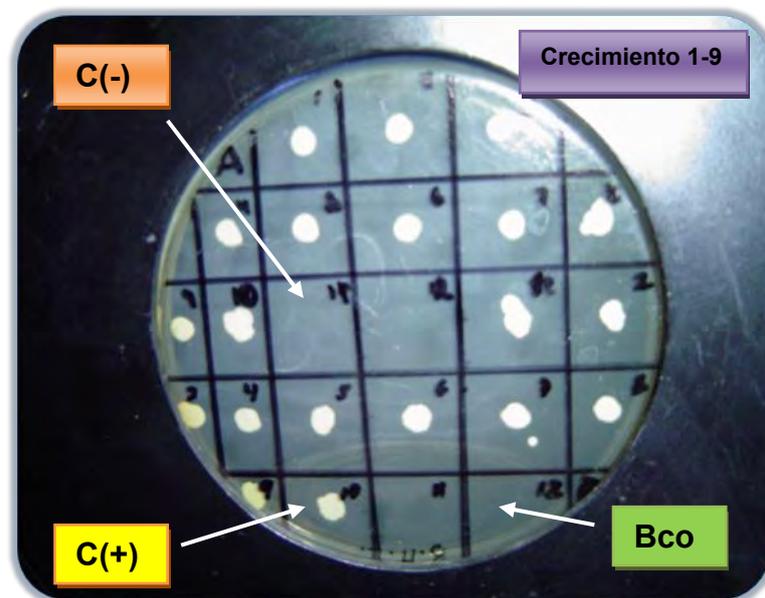


IMAGEN (27)

Ensayo bactericida bacteriostático de *Staphylococcus aureus* en agar BHI. 1-9: Diluciones del Extracto; 10: Control positivo; 11: Control negativo; 12: Blanco.

Staphylococcus epidermidis:

Se observa que el efecto es bacteriostático al presentarse crecimiento desde la concentración de 1665 hasta 6.505 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ (cuadrantes 1-9 respectivamente) (Imagen 28).

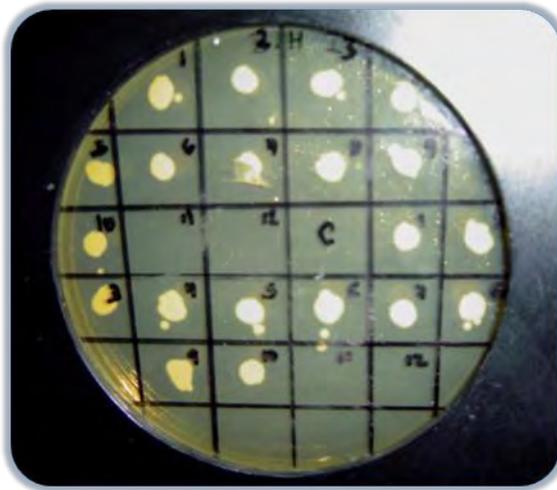


IMAGEN (28)

Ensayo bactericida bacteriostático de *Staphylococcus epidermidis* en agar BHI. 1-9: Diluciones del Extracto; 10: Control positivo; 11: Control negativo; 12: Blanco.

Escherichia coli:

Las concentraciones a las cuales se produce un efecto bactericida es a la de 1665, 832.5, 416.25 y 208.12 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ (cuadrante 1 al 4), (Imagen 29).

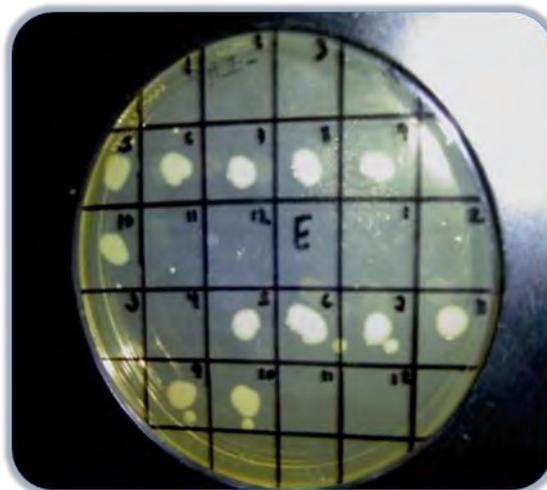


IMAGEN (29)

Ensayo bactericida bacteriostático de *Escherichia coli* en agar BHI. 1-9: Diluciones del Extracto; 10: Control positivo; 11: Control negativo; 12: Blanco.

Streptococcus pyogenes:

Se observa crecimiento desde la concentración de 1665 hasta 6.505 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ (cuadrantes 1 al 9), por lo tanto el efecto sobre *Streptococcus pyogenes* es bacteriostático. No hay efecto bactericida. (Imagen 30).

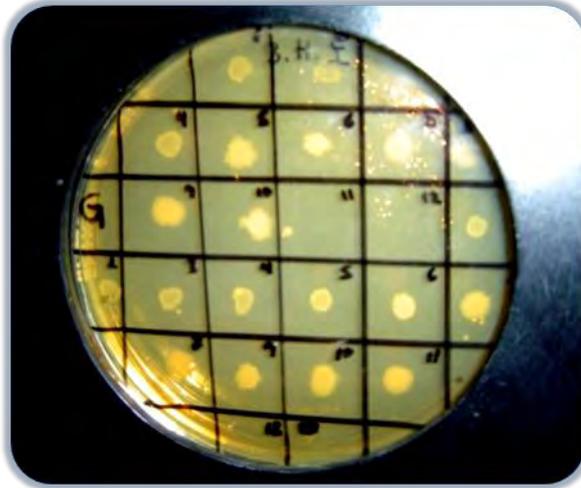


IMAGEN (30)

Ensayo bactericida bacteriostático de *Streptococcus pyogenes* en agar BHI. 1-9: Diluciones del Extracto; 10: Control positivo; 11: Control negativo; 12: Blanco.

Pseudomonas aeruginosa:

Este ensayo no se efectuó en tubos de ensayo, ya que al ver los resultados de la placa después de la incubación, se observó que la bacteria no invadió todo el agar y si se pudieron leer con claridad todos los cuadrantes.

Se observa que el efecto es bacteriostático ya que hubo crecimiento desde la concentración 1665 hasta 6.505 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ (cuadrantes 1-9 respectivamente). (Imagen 31).

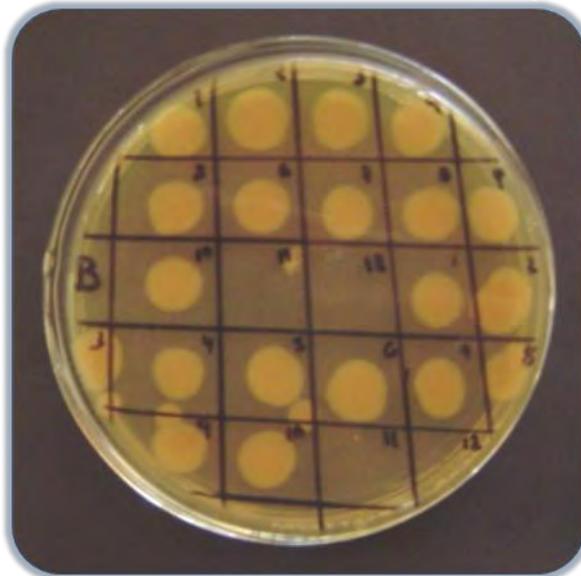


IMAGEN (31)

Ensayo bactericida bacteriostático de *Pseudomonas aeruginosa* en agar BHI. 1-9: Diluciones del Extracto; 10: Control positivo; 11: Control negativo; 12: Blanco.

***Proteus mirabilis*:**

Este ensayo se realizó en tubos de ensaye de agar BHI, debido al fenómeno de swarm que produce esta bacteria.

En los primeros 2 tubos, se presentó un efecto bactericida a las concentraciones de 1665 y 832.5 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ y efecto bacteriostático al haber crecimiento a partir de la concentración 416.25 hasta 6.505 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ (tubos 3 al 9 respectivamente). (Imagen 32).



IMAGEN (32)

Ensayo bactericida bacteriostático de *Proteus mirabilis*. 1-9: Diluciones del Extracto; 10: Control positivo; 11: Control negativo; 12: Blanco.

***Enterococcus faecalis*:**

Se observa que el efecto es bacteriostático presentándose crecimiento desde la primera concentración 1665 hasta 6.505 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ (cuadrantes 1 hasta el 9) (Imagen 33).

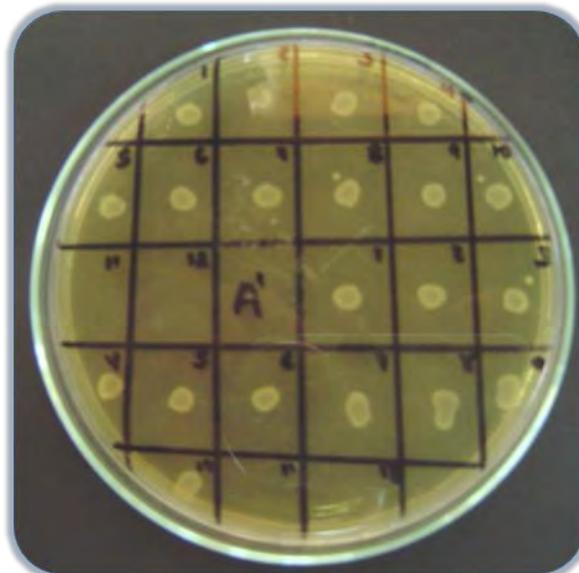


IMAGEN (33)



Ensayo bactericida bacteriostático de *Enterococcus faecalis* en agar BHI. 1-9: Diluciones del Extracto; 10: Control positivo; 11: Control negativo; 12: Blanco.

***Streptococcus agalactiae*:**

Se observa un efecto bactericida a la concentración de 1665 µg/100µl (cuadrante 1) (Imagen 34).

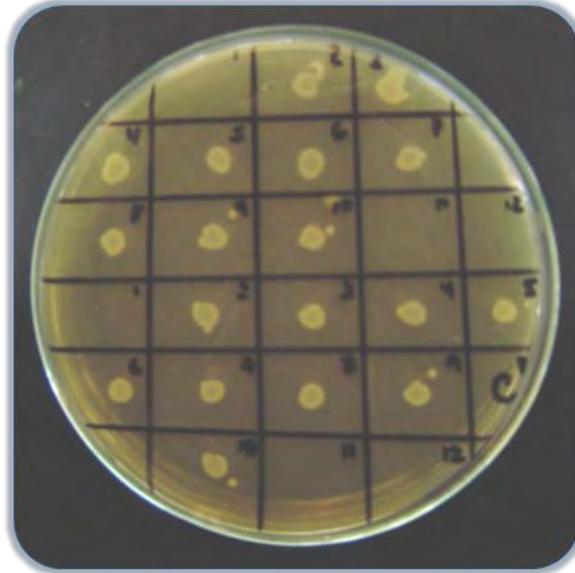


IMAGEN (34)

Ensayo bactericida bacteriostático de *Streptococcus agalactiae* en agar BHI. 1-9: Diluciones del Extracto; 10: Control positivo; 11: Control negativo; 12: Blanco.

***Enterobacter aerogenes*:**

Se observa un efecto bacteriostático al presentarse crecimiento a todas las concentraciones del extracto. No hay efecto bactericida. (Imagen 35).

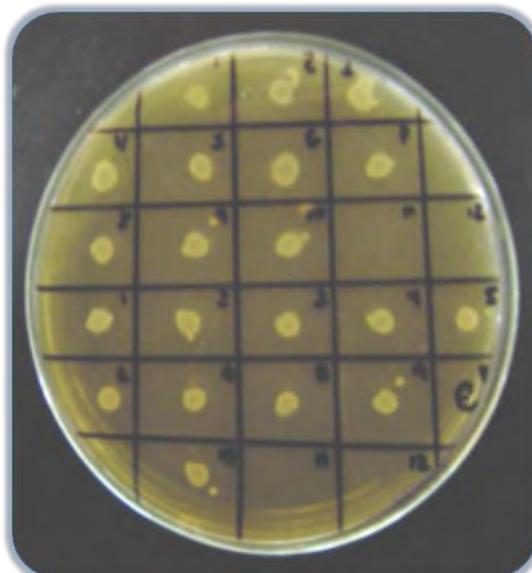


IMAGEN (35)

Ensayo bactericida bacteriostático de *Enterobacter aerogenes* en agar BHI. 1-9: Diluciones del Extracto; 10: Control positivo; 11: Control negativo; 12: Blanco.

Klebsiella pneumoniae:

Hay un efecto bacteriostático a una concentración de 1665 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ (cuadrante 1) no hay efecto bactericida. (Imagen 36).

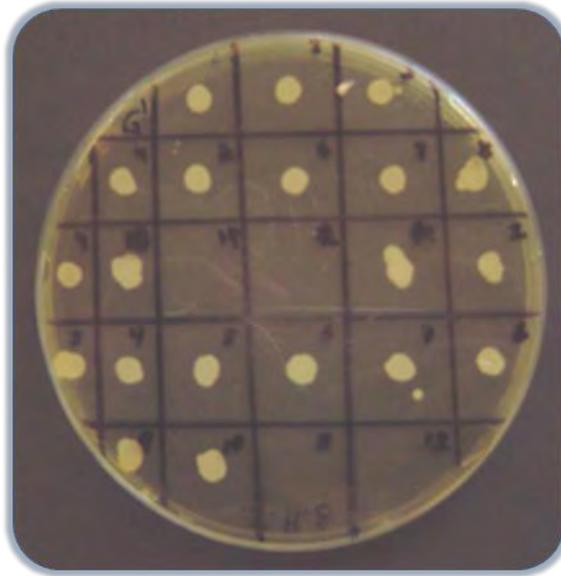
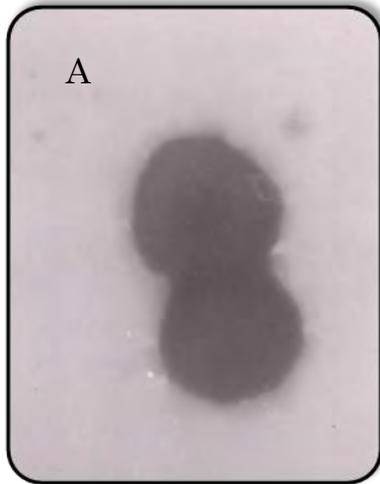


IMAGEN (36)

Ensayo bactericida bacteriostático de *Klebsiella pneumoniae* en agar BHI. 1-9: Diluciones del Extracto; 10: Control positivo; 11: Control negativo; 12: Blanco.

1.7 OBSERVACIONES OBTENIDAS EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN (MET)

4.7.1 *Enterococcus faecalis* tratado con extracto de *Styrax benzoin Dryand.*

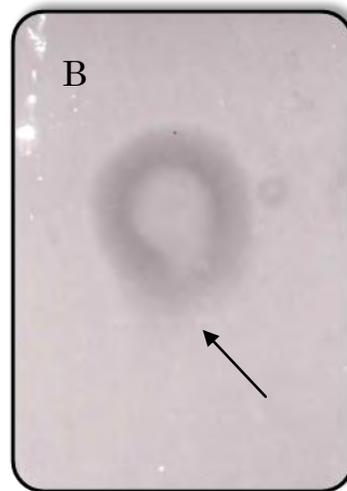


Control (Imagen 37 A):

Agrupaciones en pares con bordes bien delimitados y similitud en tamaño y forma

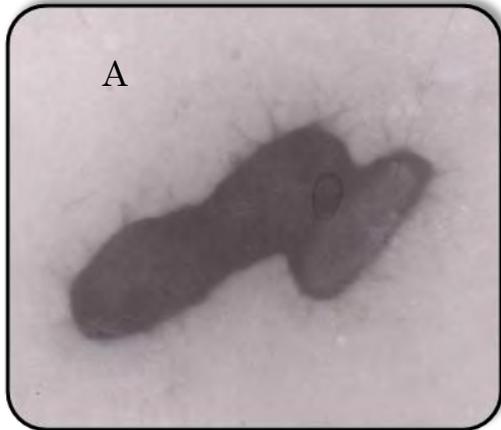
Muestra tratada (Imagen 37 B):

Se presenta con irregularidades en su forma y tamaño, además se puede observar el estallamiento de la bacteria.



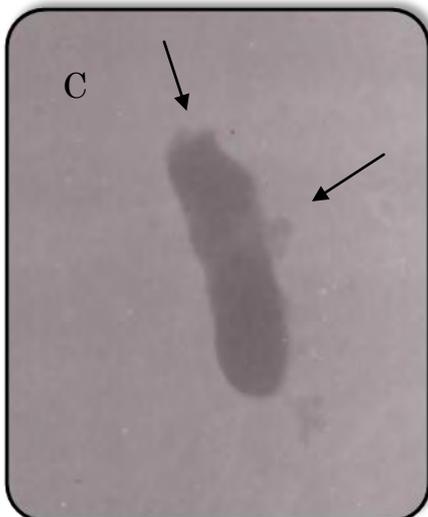
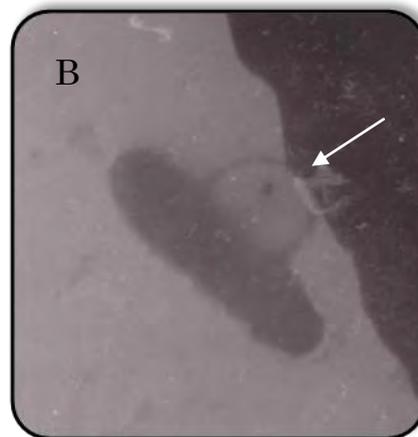
IMAGENES (37): Microfotografías electrónicas de transmisión de *Enterococcus faecalis* a 20 000 y 10 000 magnificaciones respectivamente. A muestra control no tratada; B muestra tratada con el extracto de *Styrax benzoin Dryand.*

4.7.2 *Escherichia coli* tratada con extracto de *Styrax benzoin Dryand*.



Control (Imagen 38 A):

Las muestras no tratadas se observan con bordes bien definidos.



Muestra tratada (Imagen 38 B, C):

Se observan ligeros estallamientos de la bacteria y la formación de esferoplastos por ser una bacteria Gram negativa.

IMAGENES (38): Microfotografías electrónicas de transmisión de *Escherichia coli* obtenidas a 10 000 magnificaciones. A muestra control no tratada; B y C muestras tratadas con el extracto de *Styrax benzoin Dryand*.

2. DISCUSIÓN

Las infecciones nosocomiales son un problema común a todos los países del mundo. De acuerdo con una publicación sobre prevención de infecciones nosocomiales publicado por la OMS en 2002, la mayor incidencia de estos eventos se presenta en los países de la región del Mediterráneo Oriental (11.8%) y del Sudeste Asiático (10%), seguidas por la del Pacífico Occidental (9%) y Europa (7.7%).

GRÁFICA (12): Porcentaje de incidencia de infecciones nosocomiales en algunas regiones del mundo. (Chávez K. et al. 2008)



En México, las infecciones nosocomiales también son un problema frecuente entre las instituciones de salud. En el IMSS, según una encuesta nacional de 1995, ocurrieron más de 32,552 casos de infección nosocomial, de los cuales falleció el 17.5%, además causaron una prolongación de la estancia hospitalaria promedio de 6.6 días entre los pacientes afectados.

La tipología y localización de las infecciones nosocomiales son muy diversas, sin embargo, algunos informes establecen que afectan principalmente las vías urinarias (29.4%), heridas quirúrgicas (21.9%), y las vías aéreas, provocando neumonías (14.2%), entre otras. ⁽²⁷⁾

GRÁFICA (13): Porcentaje de infecciones nosocomiales por entidad federativa, México 2006. (Chávez K. et al. 2008)



En México según el I.N.E G.I (*Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática*) en promedio el 62% se atribuye a algún tipo de accidente, de los cuales el 5.7% ha sufrido y ha tenido que ser atendido por causa de quemaduras, con respecto al lugar del accidente, el hogar es el más frecuente con un 67% en promedio, seguido de la vía pública e industria. En relación con el sexo y edad, encontramos que el hombre se quema con mayor frecuencia que la mujer, siendo en la edad más productiva de su vida, con un promedio de 68% a 32% respectivamente. ⁽²⁹⁾

La edad, el consumo crónico de alcohol y el estado nutricional de los pacientes han sido identificados como un factor de riesgo. Pacientes de 70 años o mayores son considerados como los más propensos a la mayoría de las infecciones y la mortalidad resulta del estrés asociada con la infección. Numerosos estudios han demostrado un incremento en las infecciones quirúrgicas en los pacientes adultos. ⁽³⁰⁾ En nuestra población adulta, las causas más frecuentes son accidentes de tránsito y deportivos, caídas y agresiones por terceros. Se estima que dos tercios de los participantes en accidentes automovilísticos presentarán lesiones de la cara. ⁽³⁴⁾

La causa más frecuente en niños (menores de 15 años) son los accidentes domésticos, seguidos por las mordeduras de animales, constituyendo un 55,8% de nuestra serie. El grupo entre los 16 y 65 años representa el 33,5%, y los pacientes sobre 66 años constituyen el 7,6%.

La resistencia a los antibióticos es un problema de salud pública a nivel mundial con consecuencias graves para los pacientes, los sistemas de atención sanitaria y en los hospitales con pérdidas económicas, las infecciones causadas por bacterias resistentes se asocian con tasas más elevadas de morbimortalidad y estancias hospitalarias prolongadas. ⁽³⁰⁾

⁽³²⁾ Es por esta razón que en los últimos años se han buscado tratamientos con el uso de extractos naturales como una alternativa complementaria para el control de estas patologías.

Los extractos naturales deben su actividad biológica al sinergismo entre los diversos compuestos ya que estos por separado poseen mucha menor actividad que cuando se encuentran juntos. La toxicidad de los extractos es más reducida cuando se encuentran todos sus compuestos que cuando se encuentran purificados, este fenómeno se denomina *buffering*. ⁽³⁵⁾

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana del extracto de Benjuí en 10 bacterias que comúnmente se asocian a infecciones de heridas humanas. Cabe mencionar que no existen en las bases de datos bibliográficos y hemerográficos trabajos relacionados con *Styrax benzoin Dryand.* y bacterias por lo tanto la discusión de mi trabajo va encaminada a compararse con otros trabajos realizados con diferentes plantas medicinales. Para lo cual utilizamos un extracto seco total por medio de la evaporación a 45 °C para evitar que el alcohol que es el disolvente orgánico contenido en éste inhibiera a las bacterias que se utilizaron. Posteriormente se realizó una prueba de esterilidad la cual fue satisfactoria y esto nos permitió hacer un ensayo in-vitro confiable.



De la materia seca obtenida se pesó 1 gr y se disolvió en 5 ml de DMSO llevando a un aforo de 30 ml con SSFE, obteniéndose así la solución de trabajo. Encontramos que el DMSO tiene propiedades bactericidas cuando se utiliza concentrado, en este trabajo, el DMSO no interfiere con la actividad del extracto ya que la concentración final en la solución es del 16.6 % que es una pequeña cantidad que no tiene ningún efecto contra las bacterias. Además la utilización de este solvente nos permitió tener una disolución total del extracto y un manejo óptimo con las micropipetas. Dicha solución tuvo una concentración de 33.3 mg/ml, comparándola con el trabajo que realizó Chávez Maya D., et. al en 2009⁽³⁷⁾ con *Salvia officinalis* donde se utilizó una concentración de 42.7 mg/ml y el trabajo realizado por Ramírez Zúñiga G., et. al en 2009⁽³⁸⁾ con *Eucalyptus globulus* que utilizó una concentración de 50 mg/ml, se observa que las concentraciones no están muy distantes entre sí y se encuentran dentro de un rango similar al nuestro.

Se utilizaron 10 diferentes tipos de cepas bacterianas, 5 Gram positivas y 5 Gram negativas para probar si el extracto tiene algún efecto antimicrobiano y después para conocer sobre que género bacteriano tiene el mayor efecto. Las bacterias que se utilizaron en este trabajo se eligieron porque son las que comúnmente se reportan en las infecciones de heridas humanas.

Para poder evidenciar los resultados obtenidos por la dilución en microplaca donde el 100 % de las bacterias mostraron sensibilidad al extracto concentrado, se empleó el método de Mosmann, este nos permitió comprobar si el extracto inhibió el crecimiento bacteriano.

Al realizar la lectura espectrofotométrica de las microplacas, observamos que las lecturas que presenta el control positivo son similares a las lecturas de los primeros pozos en donde no hay cambio al agregar el MTT, indicándonos que en estos primeros pozos existe una inhibición por parte del extracto hacia las bacterias probadas (**Ver imágenes 23-26 y gráficos 2-11**), esto se debe a que el extracto en los primeros pozos tiene una concentración elevada y por lo tanto un color café intenso dándonos absorbancias iguales o mayores que el control positivo. Pérez Avendaño Y. et. al en 2008⁽⁴⁰⁾ reporta que el extracto de caléndula que es de un color amarillo claro no produce este tipo de interferencia, pero el extracto de cancerina si mete ruido en las lecturas.

Posteriormente se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) con dicho ensayo colorimétrico cuantitativo, cuyo fundamento se basa en la apertura del anillo de la sal de tetrazolio (MTT, color amarillo) en el interior de las mitocondrias de las células vivas, por acción de la enzima succinato deshidrogenasa, dando como producto de reacción al formazán que es una sal insoluble en agua de color azul-violeta. Donde el color es directamente proporcional a la proliferación celular (Imagen 39).⁽³⁹⁾

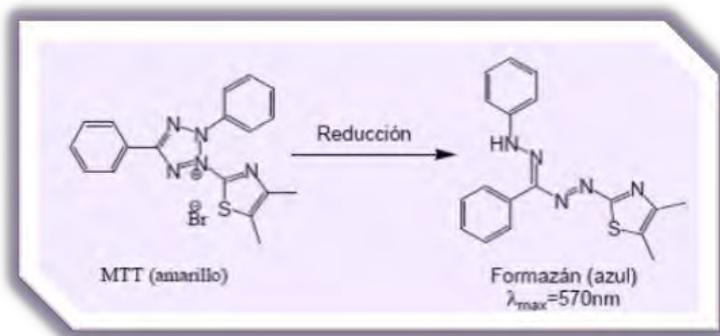


IMAGEN (39): Proceso de reducción del MTT.
(Gerlier D. et al. 1986)

Con este ensayo se pudieron analizar los datos y se obtuvieron las CMI's de las bacterias utilizadas, las cuales fueron *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterobacter aerogenes* y *Pseudomonas aeruginosa* con 1665 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ que necesitaron una concentración más alta del extracto para poderse inhibir; *Klebsiella pneumoniae* con 832.5 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$; *Proteus mirabilis* con 416.25 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$; *Escherichia coli* con 208.12 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$; *Streptococcus pyogenes* con 26.02 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$, *Streptococcus agalactiae* y *Enterococcus faecalis* con 13.01 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$.

En cuanto a la CMI's, el 40 % correspondieron estando en el primer pozo con una MIC de 1665 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter aerogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*); tres bacterias que tuvieron CMI's diferentes, 832.5 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ (pozo No. 2), 416.25 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ (pozo No. 3) y 208.12 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ (pozo No. 4), *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Escherichia coli* respectivamente. El 10 % de las bacterias totales presentó una CMI de 26.02 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ (pozo No. 7) que representa a *Streptococcus pyogenes*, y por último, *Streptococcus agalactiae* y *Enterococcus faecalis* con una MIC de 13.01 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ en el pozo No. 8. **(Ver Tabla 11)**

No se encontraron reportes acerca de que estas especies presenten sensibilidad al benjuí. Sin embargo, comparando las CMI's de *S. pyogenes*, *S. agalactiae* y *S. aureus* con el trabajo realizado en 2009 por Chávez Maya D., et. al ⁽³⁷⁾ con *Salvia officinalis*, las concentraciones del extracto difieren con las obtenidas en este, la comparación de los valores de CMI se muestran en la siguiente tabla.

TABLA (13): Comparación de las CMI's para el extracto de *Styrax benzoin Dryand.* y *Salvia officinalis*

Microorganismo	CMI de <i>Styrax benzoin Dryand.</i> (mg/ml)	CMI de <i>Salvia officinalis</i> (mg/ml)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0.2602	2.66
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0.1301	5.33
<i>Staphylococcus aureus</i>	16.65	10.67



Comparando el trabajo de Chávez Maya D. et. al en 2009 ⁽³⁷⁾ y el nuestro con respecto a *Streptococcus pyogenes* claramente dilucidamos que esta bacteria es sensible a los dos extractos mostrando una inhibición bastante significativa, hasta el pozo 9 y 7 respectivamente. La diferencia entre las CMI's para la misma bacteria se debe a que el extracto utilizado no es el mismo aunque las concentraciones de las soluciones de trabajo para las dos plantas son muy similares teniendo Chávez Maya una concentración un poco mayor que la de nosotros. También se debe a que la composición química es muy diferente. Para el caso de *Streptococcus agalactiae* la tendencia es similar y en *Staphylococcus aureus* si podemos detectar diferencias.

La siguiente prueba que se realizó fue evaluar si el benjuí tiene efecto bactericida o bacteriostático, para la cual se sembraron en placas de agar BHI cada uno de los pozos de las microplacas donde se realizaron los ensayos.

Styrax benzoin Dryand. presentó un efecto bactericida sobre *E. coli* hasta una concentración de 208.12 µg/100µl; sobre *Proteus mirabilis* utilizando concentraciones hasta 832.5 µg/100µl y para *Streptococcus agalactiae* hubo un efecto bactericida solo a la concentración de 1665 µg/100µl. **(Ver Imágenes 29, 32 y 34)**

Al emplear el extracto de *Benjuí* con las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella pneumoniae* se presentaron efectos solamente bacteriostáticos. **(Ver Imágenes 27, 28, 30, 31, 33, 35 y 36)**

Finalmente tratamos de evidenciar el daño ocasionado por *Styrax benzoin Dryand.* a través de la Microscopía Electrónica de Transmisión y la técnica de Tinción Negativa. Dado que esta técnica es costosa sólo empleamos 2 de las 10 bacterias trabajadas, una Gram positiva (*Enterococcus faecalis*) y una Gram negativa (*Escherichia coli*) para conocer si existe una diferencia a la sensibilidad al benjuí relacionada con la estructura química de la pared celular. Un factor importante fue que se eligieron las bacterias que presentaron mayor sensibilidad, menor CMI, y en una de ellas (*Escherichia coli*) el efecto fue bactericida y en el caso de la segunda (*Enterococcus faecalis*) el efecto fue bacteriostático.

Se observaron daños producidos por el extracto en la estructura bacteriana de *Escherichia coli* **(Imagen 38)** y *Enterococcus faecalis* **(Imagen 37)**.

Al realizar las observaciones a 10 000 magnificaciones de *Escherichia coli* encontramos que las muestras no tratadas (Controles positivos) se observan con bordes bien definidos **(Imagen 38 A)**. Mientras que las muestras de *Escherichia coli* tratadas con el extracto **(Imagen 38 B, C)**



se observan ligeros estallamientos de la bacteria y la formación de esferoplastos por ser una bacteria Gram negativa.

Al realizar las observaciones en microscopio electrónico a 10 000 y 20 000 magnificaciones de *Enterococcus faecalis* encontramos que las muestras no tratadas (Controles positivos) permiten observar agrupaciones en pares con bordes bien delimitados y similitud en tamaño y forma (**Imagen 37 A**). En la muestra tratada con el extracto, se observa la bacteria de *Streptococcus faecalis* con irregularidades en su forma y tamaño, además se puede observar el estallamiento de la bacteria (**Imagen 37 B**).

El extracto de *Styrax benzoin Dryand.* mostró un efecto bueno de acuerdo a mi apreciación pero en la bibliografía encontré asociación en presentación farmacéutica (pomada) con *caléndula officinalis* lo cual seguramente mejora la eficacia basado en un posible sinergismo.



1. CONCLUSIONES

- Se determinó el efecto inhibitorio del extracto de *Styrax benzoin Dryand.* en 10 bacterias que comúnmente se asocian a infecciones de heridas humanas utilizando el método de Mosmann y Microscopía Electrónica de Transmisión.
- Se obtuvo el extracto seco de *Styrax benzoin Dryand.* y se logró realizar una solución de concentración conocida (3330 µg/100µl).
- Se determinaron las CMI's del extracto de *Styrax benzoin Dryand.* mediante el método de Mosmann sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Se estableció la actividad bactericida y/o bacteriostática del extracto de *Styrax benzoin Dryand.* (Benjuí) en cada bacteria mediante una prueba de crecimiento en placa.
- El microscopio electrónico de transmisión nos permitió evidenciar el daño provocado por el extracto en las bacterias estudiadas.



2. SUGERENCIAS

- Continuar con la investigación de esta planta medicinal.
- Diseñar formas farmacéuticas a base de esta planta medicinal, para evitar reacciones indeseables en los usuarios.

1. APÉNDICES

8.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN



IMAGEN (40): Fotografía del Microscopio Electrónico de Transmisión

8.1.1 MICROSCOPIO ELECTRÓNICO (Imagen 41)

Los microscopios electrónicos de transmisión son muy útiles para el estudio de las diferentes muestras tanto biológicas como no biológicas, proporcionan información referente de partículas muy pequeñas de menos de 100 nm de grosor ya que funciona al alto vacío, en donde la imagen está dada por los electrones transmitidos a través de la muestra. ⁽²⁵⁾

El microscopio electrónico de transmisión sirve para aumentar la imagen de objetos pequeños invisibles a simple vista usando un haz de electrones de alta energía como fuente de iluminación, debido a que los electrones tienen una longitud de onda mucho menor a la de la luz pueden mostrar estructuras mucho más pequeñas. Este microscopio puede aumentar el tamaño del objeto hasta un millón de veces.

Las partes principales de un microscopio electrónico son:

- Cañón de electrones: emite los electrones por la aplicación de alto voltaje.
- Lentes magnéticas: crean campos magnéticos que dirigen y enfocan el haz de electrones.

- Sistema de vacío: es una parte muy importante debido a que los electrones pueden ser desviados por las moléculas del aire, se debe hacer un vacío casi total en el interior de la columna del microscopio.
- Pantalla fluorescente: es de sulfuro de zinc es para visualizar la imagen aumentada.
- Placa fotográfica: muestra la imagen en el negativo para ser procesada en el cuarto oscuro y así obtener la foto de dicha imagen. ⁽²⁵⁾



IMAGEN (41): Microscopio electrónico de transmisión.
Tomado de (24)

8.1.2 PREPARACIÓN DE MATERIAL

- Sembrar las bacterias (seleccionadas previamente de acuerdo a su sensibilidad y resistencia al extracto): *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* en cajas de agar BHI, incubar 24 hrs. A 37 °C en estufa bacteriológica.
- Preparar Solución salina fisiológica al 8.5% y caldo BHI a doble concentración.
- Distribuir 3 ml de caldo BHI en 4 tubos de ensaye de 13 x 100 x 20 con su respectivo tapón de rosca, esterilizar en autoclave a 15 lb de presión y 121 °C durante 15 minutos junto con 4 pipetas graduadas de 5 ml.



8.1.3 PREPARACIÓN DE LAS BACTERIAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

- Estandarizar cada una de las bacterias al 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland en los tubos con caldo BHI de doble concentración (la misma bacteria en dos tubos, rotular uno como control (+) y el otro como problema).
- Agregar con pipetas estériles a los tubos control 3 ml de SSF estéril y a los tubos problema 3 ml del Extracto de *Styrax benzoin Dryand.*
- Incubar los tubos a 37 °C durante 18-24hrs en estufa bacteriológica.
- Después del tiempo de incubación, centrifugar a 2500 rpm durante 15 minutos, desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 3 ml de Solución salina fisiológica estéril.
- Centrifugar a 2500 rpm durante 15 minutos, desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 3 ml de Solución salina fisiológica estéril.
- Centrifugar a 2500 rpm durante 15 minutos, desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 3 ml de Solución salina fisiológica estéril.
- Centrifugar a 2500 rpm durante 15 minutos, desechar el sobrenadante y agregar a cada tubo 3 ml del reactivo de Karnosky, dejar reposar durante 1 hr.
- Centrifugar a 2500 rpm durante 30 minutos, eliminar el sobrenadante y la pastilla se resuspende en 3 ml de Solución Buffer de Fosfatos

8.1.4 PREPARACIÓN DE LAS REJILLAS CON MEMBRANA FOMVAR (Imagen 42)

- Las rejillas deben ser lavadas con acetona y estar secas completamente.
- Preparar una solución Fomvar al 0.1 % con cloroformo, si se hacen con parlodión, se prepara una solución con 0.1 % de parlodión en acetato de amilo.
- En un vaso de precipitados limpio con capacidad de 1 L, llenar con agua destilada, colocar una lámpara para que ilumine la superficie del agua.
- Impregnar un portaobjetos con Fomvar y dejar reposar hasta que seque la película, después con ayuda de unas pinzas se cortan las cuatro orillas del portaobjetos y sobre el agua destilada se sumerge poco a poco hasta separar la película plástica, y si la película plástica es de un color dorado-plateado es adecuada.
- Colocar las rejillas sobre la membrana y posteriormente recogerlas con papel filtro. Las rejillas deben ser secadas perfectamente antes de volverse a utilizar.



IMAGEN (42): Rejillas con membrana fomvar

8.1.5 TÉCNICA DE TINCIÓN NEGATIVA (Imagen 43)

- Depositar una gota de suspensión bacteriana sobre un papel parafilm, se colocan dos rejillas con membrana para que se adsorba la muestra durante un tiempo que varía entre 5 y 30 minutos.
- Tomar las rejillas y absorber el exceso con papel filtro y enseguida teñirlos con una gota de ácido fosfotúngstico (AFT solución al 1% con pH=7.2) durante un periodo que varía entre 5 y 30 minutos.
- Recoger las rejillas y absorber el exceso de colorante, estas se deben secar a temperatura ambiente o en estufa a 35°C.
- Las muestras se observan y se fotografían en el Microscopio Electrónico de Transmisión (JEOL JEM 100 S).

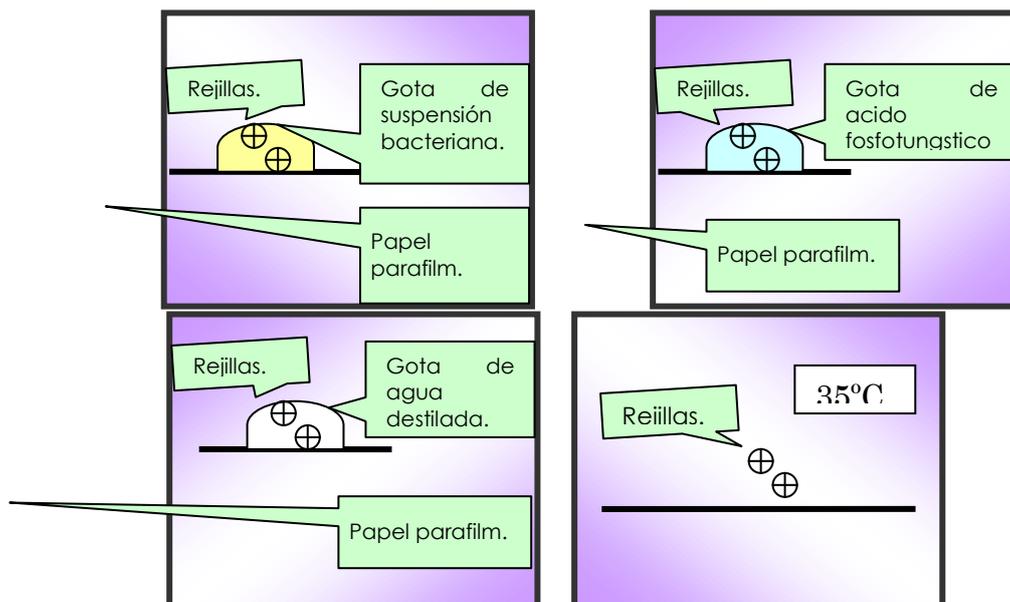


IMAGEN (43): Técnica de tinción negativa.
(González S., et al. 2003)



8.2 TINCIÓN DE GRAM

1. Fijar la bacteria en un portaobjetos.
2. Agregar 1 gota de cristal violeta durante 1 min y enjuagar con agua.
3. Agregar 2 gotas de lugol durante 2 min y enjuagar.
4. Agregar 3 gotas de alcohol-acetona y enjuagar.
5. Agregar 1 gota de safranina durante 1 min y enjuagar.

8.3 MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS

MATERIAL

- Vaso de precipitados de 50, 100, 250, 500, 1000 ml.
- Probeta graduada de 100, 250, 500 ml.
- Matraz erlenmeyer de 250, 500, 1000 ml.
- Matraz aforado de 100 ml.
- Varilla de vidrio
- Embudo de vidrio
- Cajas petri de vidrio estériles
- Tubos de vidrio con tapón de rosca
- Frascos ámbar de 20, 50, 100, 250, 500, 1000 ml.
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5, 10 ml.
- Micropipeta de 100 μ l.
- Termómetro
- Balanza granataria
- Mechero bunsen
- Soporte universal
- Filtro de bala
- Espátula
- Gradilla
- Asa bacteriológica
- Puntas para micropipetas de 100 μ l.
- Microplacas Sarstedt 96-well
- Papel filtro Walt man
- Membrana Millipore de 0.45 μ m.
- Marcador indeleble
- Cinta adhesiva



EQUIPO

- Autoclave All American Modelo 1925X.
- Estufa bacteriológica Ríos Rocha S.A.
- Refrigerador IEM.
- Balanza analítica y balanza granataria.
- Agitador Vortex Genie 2 Scientific Industries Modelo G560.
- Centrifuga Dynac
- Bomba de vacío Hoffmann Pinther Modelo 0210
- Horno Pasteur Ríos S.A. Modelo HS-41
- Parrilla con agitadores NOUVA II Stir Plate
- Microscopio óptico Olympus Modelo CHS
- Microscopio electrónico de transmisión

MATERIAL BIOLÓGICO

Bacterias proporcionadas por el laboratorio 10 de Microbiología en la Unidad de Posgrado de la F. E. S. Cuautitlán aisladas de casos de heridas.

- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Enterococcus faecalis*
- *Escherichia coli*
- *Enterobacter aerogenes*
- *Proteus mirabilis*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Pseudomonas aeruginosa*

REACTIVOS

- Etanol al 100%
- Etanol al 70%
- Agua destilada
- Cloruro de sodio
- Solución salina fisiológica estéril
- Medio BHI agar BIOXON
- Medio BHI caldo BIOXON
- Dimetil sulfoxido DMSO
- MTT SIGMA M-2128



8.4 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Agar BHI (Becton Dickinson)

Disolver 37 gr de material deshidratado en 1 lt de agua destilada.

Esterilizar en autoclave a 121° C, 15 lb de presión de vapor durante 15 min.

Distribuir aproximadamente 12 ml en cada caja petri estéril.

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

Disolver 40 gr de material deshidratado en 1 lt de agua destilada.

Esterilizar en autoclave a 121° C, 15 lb de presión de vapor durante 15 min.

Dejar enfriar y agregar 5 % de sangre de carnero desfibrinada estéril.

Distribuir en placas estériles.

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

Disolver 37 gr de material deshidratado en 1 lt de agua destilada.

Distribuir en tubos de ensaye con rosca.

Esterilizar en autoclave a 121° C, 15 lb de presión de vapor durante 15 min.

8.5 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

➤ **MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol)**

Disolver MTT en RPMI-1640 rojo de fenol, hasta una concentración de 5 mg/ml.

Filtrar con membrana de 0.22 µm.

Guardar a una temperatura de 4° C, hasta su uso.

➤ **SSF estéril**

Por cada 100 ml de agua destilada agregar 850 mg de NaCl.

Esterilizar en autoclave a 121° C, 15 libras de presión, durante 15 minutos.

➤ **ACIDO FOSFOTUNGSTICO**

El ácido es una solución al 2% ajustada al pH de 7.0 mediante NaOH 1N.

1. REFERENCIAS

1. Azotla Gutiérrez Jorge Eduardo. (2000). **Tesis de Licenciatura QFB: Estudio retrospectivo de la Incidencia Microbiana en heridas.** UNAM FES-C. Edo. de México Cuautitlán Izcalli.
2. Escorza Meneses Ana Patricia. (2007). **Tesis de Licenciatura QFB: Incidencia de *Streptococcus pyogenes*, mecanismos de patogenicidad en infecciones respiratorias en los últimos 4 años y tratamiento.** UNAM FES-C. Edo. de México Cuautitlán Izcalli.
3. http://es.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_epidermidis
4. <http://es.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus>
5. García Apac, Coralith, Pardo Valdespino, Juan y Seas Ramos, Carlos. **Bacteremia por *Staphylococcus epidermidis* y absceso de partes blandas en un paciente post-operado: reporte de un caso.** *Rev Med Hered*, oct. 2003, vol.14, no.4, p.221-223. ISSN 1018-130X.
6. http://es.wikipedia.org/wiki/Streptococcus_pyogenes
7. http://www.healthsystem.virginia.edu/uvahealth/adult_derm_sp/anatomy.cfm
8. <http://www.uv.es/derma/CLindex/CLdermatopat/CLdermatopatologia.html>
9. http://en.wikipedia.org/wiki/Enterobacter_aerogenes
10. http://www.herbdatanz.com/benzoin_picture_monograph.htm
11. Arango Mejía María Cristina. **Plantas medicinales. Botánica de Interés médico.**
http://books.google.com.mx/books?id=fefaqvWHHoYC&dq=plantas+medicinales+de+interes+medico&printsec=frontcover&source=bl&ots=MtlaUQDIqR&sig=Qny3O7sbQuiH_AZ0k9Gbs-GaO5Y&hl=es&ei=y46ySqKXDon8tgeuq7ywDQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=8#v=onepage&q=&f=false
12. Waizel Bucay José. (2006). **Las plantas medicinales y las Ciencias. Una visión multidisciplinaria.** IPN. México.
13. Selecciones del Reader's Digest. (1987). **Plantas medicinales. Virtudes insospechadas de plantas conocidas.** 1ª reimp. México.
14. Cruz Jiménez Gerardo; Sainz Montoya Jorge Enrique; Segura Ramírez Pedro. (1994). **Manual de Bacteriología Clínica.** Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México.
15. Konneman EW. (1992). **Diagnóstico Microbiológico.** 3ª edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina.



16. Hernández TG. (2002) **Tesis de Licenciatura Q.F.B: Manual de bacteriología diagnóstica.** UNAM FES-C. Edo. de México Cuautitlán Izcalli.
17. Baileys, S. (1989). **Diagnóstico Microbiológico.** 7a edición. Edit. Panamericana, Argentina.
18. Murray R. Patrick; Rosenthal S. Ken (et. al). (2006). **Microbiología médica.** 5ª ed. Editorial Elsevier. Madrid España.
19. Ginsburg Isaac; Ward A. Peter; Varani James. **Can we learn from the pathogenetic strategies of group A hemolytic streptococci how tissues are injured and organs fail in post-infectious and inflammatory sequelae?**. FEMS Immunology and Medical Microbiology 1999; 25: 325-338.
20. Morales Sánchez María de los Angeles. (2002). **Tesis de Licenciatura QFB: Efecto de Caléndula officinalis en Pseudomona aeruginosa evidenciado por microscopía electrónica.** UNAM FES-C. Edo. de México Cuautitlán Izcalli.
21. Bojana Beovic; Bostjan Matos; Roman Bosnjak; Katja Seme; Manica Mueller-Premru; Veronika Hergouth-Krizan; Milan Cizman. **Prevention of nosocomial lower respiratory tract infections in patients after intracranial artery aneurysm surgery with a short course of antimicrobials.** International Journal of Antimicrobial Agents 2003; 22: 60-66.
22. Brook Itzhak. **The role of anaerobic bacteria in cutaneous and soft tissue abscesses and infected cysts.** Georgetown University. Anaerobe 2007; 13: 171-177.
23. Hovaneissian Michael, Archier Paul, Mathe Carole, Vieillescazes Catherine. **Contribution de la chimie analytique à l'étude des exsudats végétaux styrax, storax et benjoin.** C. R. Chimie 2006; 9: 1192-1202.
24. <http://www.bolivar.udo.ve/biologia/tecnicas.htm>
25. González Gallardo Sofía, Hernández Baumgarten Eliseo, et al. (2003). **Guía de microscopía electrónica.** UNAM. FES-C. Edo. de México Cuautitlán Izcalli.
26. Flórez Jesús; Armijo Juan Antonio; Mediavilla África. (2003). **Farmacología Humana.** 4ª ed. Editorial Masson. España.
27. Chávez Vega Katia; Mendoza Ruíz Mónica; Torres Espinoza Agustín; Ramos Terrazas Verónica. **Infecciones Nosocomiales.** Boletín Horizontes del conocimiento. Academia Aesculap. 2008; 4: 5-6.
28. Pamplona Roger, Jorge D. (2002). **La magia de las plantas medicinales.** 1ª ed. Editorial Safeliz. Tomo II. España.
29. Secretaría de Salud. (2009). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Número 24. Volumen 26. Semana 24.
30. <http://www.update-software.com/abstractses/AB003543-ES.htm>
31. Heinzelmann Michael; M.D.; Ph.D.; Scott Melanie; M.R.C.S (Ed.); Lam Tina; M.D. **Factors predisposing to bacterial invasion and infection.** The American Journal of Surgery. 2002; 183: 179-190
32. Montero Luis A.; Hervás A.; Morera R.; Ramos A. **Toxicidad sobre piel y mucosas: tratamientos de soporte.** Servicio de Oncología Radioterápica Hospital Ramón y Cajal. Madrid. 2004; 27 (7):402-407



33. Thomson M Jodi; Bonomo A Robert. **The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: β -lactams in peril!**. *Current Opinion in Microbiology* 2005, 8:518–524
34. Dagnino U. Bruno; Ramírez A. Rodrigo. **Manejo de heridas faciales. Sección de Cirugía Plástica, Estética y Reconstructiva.** División de Cirugía. Facultad de Medicina. Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica de Chile. 2006; 20: 100-107.
35. Shiva Ramayoni C. **Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. (tesis doctoral).** Universidad Autónoma de Barcelona. 2007
36. <http://www.verdenatural.com/herbolaria/default.asp>
37. Chávez Maya Diana. (2009). **Tesis de Licenciatura QFB: Evaluación del efecto antibacteriano del extracto de *Salvia officinalis* L. en 7 bacterias de importancia médica.** UNAM FES-C. Edo. de México Cuautitlán Izcalli.
38. Ramírez Zúñiga Gabriela A. (2009). **Tesis de Licenciatura QFB: Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de *Eucalyptus globulus* con *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* todas estas de importancia médica.** UNAM FES-C. Edo. de México Cuautitlán Izcalli.
39. Gerlier Denis and Nicole Thomasset. (1986). **Use off MTT colorimetric assay to measure cell activation.** *Journal of immunological methods.* 94, 57-63.
40. Pérez Avendaño Yolanda. (2008). **Tesis de licenciatura QFB: Determinación del efecto inhibitorio de tres extractos naturales: *Caléndula officinnalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa*, (solos y combinados) en bacterias aisladas de casos de mastitis bovina.** UNAM. FES-C. Edo. de México Cuautitlán Izcalli.
41. Modugno Francesca; Ribechini Erika; Colombini Maria Perla. **Aromatic resin characterisation by gas chromatography–mass spectrometry Raw and archaeological materials.** *Journal of Chromatography A.* 2006; 1134: 298–304.
42. Jorge Alfonso. (2007). **Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos.** 1ª reimp. Editorial Corpus. Argentina.
43. Tortora Gerard J., Reynolds Grabows Sandra. (2006). **Principios de anatomía y fisiología.** 9ª ed. Oxford University Press. México.
44. Murray Robert K., Granner Daryl K., Rodwell Victor W. (2007). **Harper. Bioquímica ilustrada.** 17ª ed. El Manual Moderno. México.
45. Mosmann, T. et al. (1983). **Journal Inmunology Methods.** (65)1:55-63.