



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL
EXTRACTO DE *Citrus Bergamia* (BERGAMOTA) EN BACTERIAS
ASOCIADAS A HERIDAS”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

GARCÉS CALDERÓN ABIGAIL SANDRA

ASESORES:

Q.F.B. VICTOR HUGO ABREGO REYES.
M. en C. SOFIA GONZÁLEZ GALLARDO.

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2015



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.

Al MVZ Gerardo Cruz Jiménez por ayudarme en este proyecto y darme toda la confianza para lograr este proyecto.

Al Q.F.B. Víctor Hugo Abrego Reyes gracias por toda la ayuda que me brindaste y sobre todo por la paciencia y confianza que tuviste en mí.

A la M. C. Sofía González Gallardo por toda la comprensión, paciencia, ayuda y confianza que me brindo. Gracias por escucharme y apoyarme tanto en este trabajo.

A mi mamá Pakis gracias por apoyarme, por no dejarme sola nunca, por decirme siempre que yo podía, por enseñarme a ser tan necia, pero sobre todo por tu ayuda y comprensión. Gracias mamita por confiar en que lo lograría y por enseñarme a ser la persona que soy, TE AMO.

A mi papá gracias por todos esos consejos y regaños que siempre me dabas para que no dejará la escuela, por el cariño, pero sobre todo gracias por ser mi papá. TE AMO.

A la personita más importante en mi vida Sofia Marian, este es el mayor regalo que puedo darte y muchas gracias princesa por alegrar mi vida con tantas travesuras, con esos ojos hermosos me llenas de vida, tú fuiste el mayor motivo para lograr este sueño, eres un ángel maravilloso, y eres la fuerza que me impulsa a seguir TE AMO MUCHO MUCHO.

A José Luis Yáñez muchas gracias por todo el apoyo, paciencia y cariño. Gracias por enseñarme tantas cosas, por impulsarme a continuar este sueño, por tanta alegría y sobre todo gracias por mi angelito Sofia.

A la señora Martha † y al señor Arol † gracias por todo el apoyo que me brindaron, por el cariño que me dieron desde que llegue a sus vidas y gracias por confiar en mí.

A mis hermosas hermanas Mar, Ale y Gabi gracias por sus pláticas y sus consejos para llegar hasta donde estoy, gracias por su confianza, gracias por tantas risas, pero sobre todo gracias por tanto amor, gracias por hacerme sentir ese apoyo, esas ganas de luchar contra todo y gracias por ser como son. Las amooooooooooooo.

A mis bellas sobrinas Camila, Renata, Melissa y María José muchas gracias princesas por llenar mi vida de alegría y gracias por tantas ocurrencias. LAS AMO.

A Sandy y Fer por ese apoyo para continuar y por el impulso para lograr este sueño. Muchas Gracias.

A Mary gracias por todo tu paciencia, por ayudarme tanto, por tu confianza y gracias porque sin conocerme mucho confiaste en mí y me brindaste mucho cariño.

A Manuel, Alfonso, Arol, Carlos, Marco y Sandra muchachos muchas gracias por toda la ayuda que me brindaron, por todo el cariño, por todos los consejos y por confiar en que lograría este sueño, Muchas gracias.

Al Q.F.B. y gran amigo Daniel por tanta ayuda, tantos consejos y por tu linda amistad.

¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!

ÍNDICE

INDICE GENERAL

Índice General	I
Índice de Imágenes	IV
Índice de Tablas	V
Índice de Diagramas	V
Índice de Graficas	V
Abreviaturas.....	VI
1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1 Anatomía de la piel	6
2.1.1 Epidermidis.....	7
2.1.2 Dermis	8
2.1.3 Glándulas de la piel	9
2.2 Tipos de piel	10
2.3 Funciones de la piel	10
2.4 Heridas	12
2.4.1 Tipos de heridas (ADAM).....	12
2.4.1.1 Según su complejidad	12
2.4.1.2 Tipos de heridas según el agente agresor.....	13
2.4.1.3 Infecciones en heridas.....	14
2.4.1.4 Heridas quirúrgicas, no quirúrgicas y por quemaduras	14
2.5 Toma de muestra de heridas	19
2.6 Características de los microorganismos comúnmente asociados a heridas.	20
2.6.1 Bacterias Gram Positivas	20
2.6.1.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	21
2.6.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.6.1.3 <i>Streptococcus pyogenes</i>	24
2.6.1.4 <i>Bacillus subtilis</i>	25
2.6.1.4 <i>Propionibacterium acnes</i>	26

2.6.2 Bacterias Gram Negativas	27
2.6.2.1 Estructura de la pared de bacterias Gram Negativas	27
2.6.2.2 <i>Escherichia coli</i>	27
2.6.2.3 <i>Proteus mirabilis</i>	28
2.6.2.4 <i>Enterobacter aerogenes</i>	28
2.6.2.5 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	29
2.6.2.6 <i>Pseudomona aeruginosa</i>	30
2.7 Descripción botánica de <i>Citrus bergamia</i>	32
2.7.1 Método de extracción de <i>Citrus bergamia</i>	32
2.7.2 Componentes.	33
2.7.3 Propiedades.	33
2.7.4 Efectos adversos.	33
2.8 Control Químico del crecimiento microbiano.	34
3. Objetivos	35
3.1 Objetivo General	32
3.2 Objetivos Particulares	35
4. Hipótesis	35
5. Metodología	36
5.1 Extracto de <i>Citrus bergamia</i>	37
5.2 Secado del extracto y preparación de la solución stock de <i>Citrus bergamia</i>	37
5.3 Obtención de las capas	38
5.4 Identificación de las capas bacterianas	39
5.5 Concentración Mínima Inhibitoria	40
5.5.1 Preparación del Material.	40
5.5.2 Ensayo en Microplaca.	41
5.5.3 Prueba de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol)	42
5.5.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	42
5.6 Ensayo bactericida/bacteriostático	43
5.7 Microscopía Electrónica de Transmisión	44
5.7.1 Preparación de bacterias.	44
5.7.2 Preparación de las bacterias para MET.	44
5.7.3 Preparación de las rejillas con membrana Formvar	46
5.7.4 Tinción Negativa	46

6. Resultados y discusión.....	48
6.1 Aislamiento e Identificación de bacterias	48
6.2 Esterilidad del extracto	48
6.3 Preparación de la solución de trabajo	49
6.4 Evaluación del efecto inhibitorio del extracto de <i>Citrus bergamia</i> sobre las bacterias identificadas	49
6.5 Efecto Bactericida/Bacteriostático del extracto de <i>Citrus bergamia</i>	56
6.6 Observación del efecto por Microscopía Electronica de Transmisión	59
7. Conclusiones.....	60
8. Perspectivas.....	61
9. Apéndice 2	62
9.1 Material, equipo y reactivos.....	62
9.2 Preparación de Medios de Cultivo	65
10. Apéndice 2 Pruebas bioquímicas.....	69
11. Apéndice Evaluaciones previas del extracto de <i>Citrus bergamia</i>	72
12. Referencias	74

INDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Anatomía de la piel	9
Imagen 2. Estructura bacteriana	20
Imagen 3. Crecimiento de <i>Staphylococcus epidermidis</i> en agar Mac Conkey	21
Imagen 4. Prueba de coagulasa para <i>Staphylococcus aureus</i>	22
Imagen 5. <i>Staphylococcus aureus</i> en agar sales Manitol	23
Imagen 6. <i>Staphylococcus aureus</i> en agar sangre	24
Imagen 7. Tinción Gram de <i>Bacillus subtilis</i>	25
Imagen 8. Tinción de Gram de <i>Propionibacterium acnes</i>	26
Imagen 9. <i>Escherichia coli</i> en agar EMB	27
Imagen 10. <i>Enterobacter aerogenes</i> en agar Mac Conkey.....	28
Imagen 11. <i>Klebsiella pneumoniae</i> en agar Mac Conkey	29
Imagen 12. <i>Pseudomona aeruginosa</i> en agar Cetrimida	30
Imagen 13. Citrus bergamia.....	33
Imagen 14. Procedimiento para esterilizar el extracto	37
Imagen 15. Preparación de las membranas de Fomvar.....	46
Imagen 16. Procedimiento para la tinción negativa.....	47
Imagen 17. Resultados de la prueba de esterilidad	48
Imagen 18. Ensayo de la técnica de doble dilución en microplaca	50
Imagen 19. Pruebas de reducción del MTT	53
Imagen 20. Ensayo bactericida/bacteriostático.....	57
Imagen 21. <i>Bacillus subtilis</i> sin exponer al extracto de <i>Citrus bergamia</i>	58
Imagen 22. <i>Bacillus subtilis</i> expuesto al extracto de <i>Citrus bergamia</i>	58
Imagen 23 Ensayo de la técnica de doble dilución en microplaca	72
Imagen 24 Ensayo de la técnica de doble dilución en microplaca	73

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de la piel gruesa y la piel delgada.....	10
Tabla 2. Funciones de la piel.....	11
Tabla 3. Tipos de infecciones y sus agentes etiológicos.....	17
Tabla 4. Especies bacterianas más frecuentemente aisladas en 392 muestras de pacientes quemados.....	18
Tabla 5. Número de cepas o muestras de cada bacteria evaluada.....	38
Tabla 6. Ejemplificación de los resultados de CMI.....	55
Tabla 7. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria.....	56
Tabla 8. Identificación de bacterias Gram (+).....	69
Tabla 9. Continuación de la tabla de identificación de bacterias Gram (+).....	70
Tabla 10. Identificación de bacterias Gram (-).....	55

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Glándulas sudoríparas.....	6
Diagrama 2. Metodología General.....	36
Diagrama 3. Bacterias utilizadas en la determinación de la actividad antimicrobiana in vitro del extracto de <i>Citrus bergamia</i>	39
Diagrama 4. Ejemplificación del ensayo en microplaca.....	41
Diagrama 5. Procedimiento para realizar el ensayo bactericida/bacteriostático.....	43
Diagrama 6. Preparación de <i>Bacillus subtilis</i> para MET.....	46

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1. Estudio realizado a pacientes con infecciones Nosocomiales.....	5
--	---

ABREVIATURAS.

Abreviaturas	Significado
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol)
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
SSFE	Solución Salina Fisiológica Estéril
BHI	Agar Infusión Cerebro Corazón
BHI (2x)	Agar Infusión Cerebro Corazón doble concentración
AFT	Ácido fosfotúngstico
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
EMB	Medio Eosina Azul de Metileno
IN	Infecciones Nosocomiales
rpm	revoluciones por minuto

1. RESUMEN.

Desde el principio de los tiempos, el hombre y los animales tuvieron que distinguir entre las plantas venenosas y las que no lo eran; de esta manera se desarrolló gradualmente el conocimiento de las drogas de origen natural. (Evans, 1991)

En la actualidad existen pruebas epidemiológicas de los efectos benéficos para la salud, de la ingesta regular de frutas y verduras como parte de una dieta saludable. Los polifenoles de frutas, verduras y cereales, hierbas y especias han demostrado tener efectos beneficiosos sobre la salud humana, y algunos extractos de plantas ricas en polifenoles han sido utilizados en los alimentos funcionales o suplementos. Entre los polifenoles, los flavonoides son metabolitos secundarios que se encuentran bien documentados por sus efectos contra el cáncer, antivirales, anti-mutágenicos y anti- inflamatorios. Existen también evidencias que sugieren que los flavonoides en la dieta influyen en la población de bacterias gastrointestinales.

Los seres humanos cada vez tratamos de evitar consumir los alimentos con conservadores químicos y esto se refleja en el interés de la industria por productos de alta calidad que tengan actividad antimicrobiana.

La importancia de estudiar la medicina tradicional es permitir el desarrollo de nuevos fármacos más efectivos y con menos riesgos para el humano.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto antimicrobiano del extracto de *Citrus bergamia* contra bacterias asociadas a heridas ya que esta planta no ha sido estudiada con este objetivo y en la actualidad hay pocos trabajos científicos sobre ella.

Las 10 bacterias asociadas a heridas (Cuevas & Gallegos, 2012) (Cruz, Sainz, & Segura, 1994) se incubaron en agar BHI y posteriormente se realizó la prueba de doble dilución (2x) (Diagrama 4) para conocer su Concentración Mínima Inhibitoria CMI la cual se evidenció por medio del Método de Mossman.

Las bacterias que al ponerse en contacto con el extracto inhibieron su crecimiento fueron: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Propionibacterium acnes* y *Escherichia coli*. (resultados Tabla 8).

Después de conocer la CMI del extracto de *Citrus Bergamia* procedimos a realizar el ensayo Bactericida/ bacteriostático (Diagrama 5) en este ensayo se puede observar si las bacterias al ponerse en contacto con el extracto éste inhibe su crecimiento o las mata.

Una vez realizadas las pruebas y ya conociendo la CMI de cada bacteria, además de saber que efecto tuvo el extracto sobre cada una de las bacterias utilizadas elegimos a *Bacillus subtilis* para realizarle Microscopía Electronica de Transmisión ya que fue la única que tuvo efecto bacteriostático (imagen 20 D) además de que esta bacteria fue evaluada en Mandalari, y otros, 2007.

Al realizarle Microscopía Electronica de Transmisión *Bacillus subtilis* obtuvimos que la bacteria al ponerse en contacto con el extracto éste le causa un daño a la pared celular como puede verse en la Imagen 21 y 22, por lo cual al retirarse el extracto no vuelve a crecer.

El extracto de *Citrus bergamia* fue efectivo en las 5 bacterias Gram positivas tratadas y en solo en una Gram negativa la cual fue *Escherichia coli* (Tabla 9).

La concentración del extracto a la cual tuvimos efecto fue elevada en un intervalo de 12 500 μ / mL hasta 50 000, para llegar a este rango se realizaron ensayos previos (APÉNDICE 3) (The Nebraska Medical Center) por lo que en futuros proyectos consideramos utilizar la enzima pectidasa 62 L, para hacer más efectivo el extracto de *Citrus Bergamia* a concentraciones menores y así sea más sustentable su uso como antimicrobiano. (Mandalari, y otros, 2007).

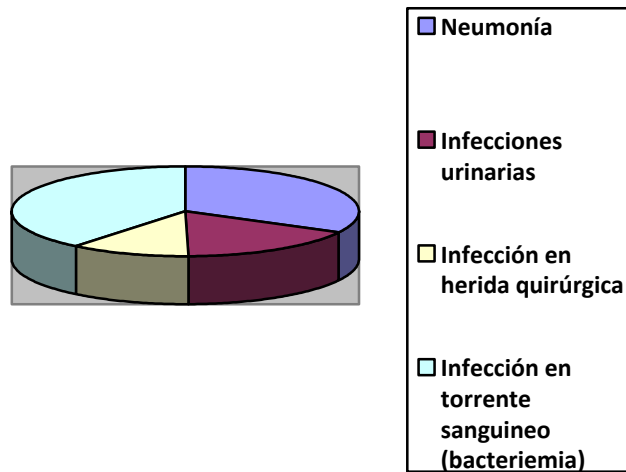
2. INTRODUCCIÓN.

Las infecciones nosocomiales son un problema relevante de salud pública de gran trascendencia económica y social, además de constituir un desafío para las instituciones de salud y el personal médico responsable de su atención en las unidades donde se llegan a presentar. Son de importancia clínica y epidemiológica debido a que condicionan altas tasas de morbilidad y mortalidad. (Conyer, 1999)

Dado que las infecciones nosocomiales son complicaciones en las que se conjugan diversos factores de riesgo que en su mayoría pueden ser susceptibles de prevención y control, las instituciones de salud deben establecer mecanismos eficientes de intervención que permitan la aplicación de medidas preventivas y correctivas encaminadas a la disminución de los factores de riesgo que inciden en la distribución y la frecuencia de dichas infecciones. (Conyer, 1999)

La vigilancia epidemiológica es un instrumento de apoyo que garantiza el buen funcionamiento de los servicios y coadyuva en la calidad de la atención médica que se otorga a usuarios de todo tipo de servicios. Con este motivo, en México se ha dado inicio a la operación de la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica, como parte de las estrategias nacionales para fortalecer la práctica médica y los procesos de la vigilancia epidemiológica en los hospitales del sector. (Conyer, 1999)

En México se ha estimado que la frecuencia de infecciones en unidades hospitalarias varía desde 2.1 hasta 15.8%. En las unidades de cuidados intensivos la situación es más preocupante: un estudio realizado a 895 pacientes de 254 Unidades de cuidados intensivos en México, encontró que 23.2% de éstos tenía una infección nosocomial. La neumonía fue la infección más común (39.7%), seguida de la infección urinaria (20.5%), la de herida quirúrgica (13.3%) y la del torrente sanguíneo (bacteriemia) (7.3%) (Gráfica 1). La letalidad asociada a estas IN fue de 25.5%. En las unidades neonatales y servicios pediátricos los riesgos de bacteriemia son significativos pues a los factores de riesgo conocidos se agregan la saturación de los servicios, el uso de mezclas de soluciones parenterales y el abuso en la cateterización umbilical. Por desgracia, la manipulación de soluciones puede causar un nivel endémico de contaminación, incluso en adultos. Esta contaminación de soluciones se ha correlacionado con agua contaminada en los hospitales, como consecuencia de la falta de vigilancia y de adherencia a estándares de calidad. La prevalencia de infecciones nosocomiales (21%) se encuentra prácticamente al doble de los estándares internacionales. (Organización Muncial de la Salud)



Gráfica 1. Estudio realizado a pacientes con infecciones nosocomiales (IN).

Según el I.N.E.G.I. (Instituto Nacional de Estadística y Geografía) en promedio el 62% de infecciones nosocomiales se atribuye a algún tipo de accidente, de los cuales el 5.7 ha tenido que ser atendido por causa de quemaduras, con respecto al lugar del accidente el hogar es el más frecuente con un 67% seguido por la vía pública y la industria. En relación al sexo los hombres se queman con mayor frecuencia que las mujeres, esto sucede en la edad más productiva de su vida con un promedio de 68% a 32% respectivamente. (Salud, 2011)

La edad, el consumo crónico de alcohol y el estado nutricional de los pacientes han sido identificados como un factor de riesgo. Pacientes mayores a 70 años son considerados como los más propensos a la mayoría de las infecciones y la mortalidad resulta del estrés asociado a las infecciones. En la población adulta la causa más frecuente son accidentes de tránsito y deportivos, caídas y agresiones por terceros. (Dagnino & Ramírez, 2006)

La causa más frecuente en niños son los accidentes domésticos, seguidos por las mordeduras de animales.

Las infecciones por microorganismos resistentes no responden a los tratamientos habituales, lo cual prolonga la duración de la enfermedad y aumenta el riesgo de muerte.

La resistencia a antibióticos reduce la eficacia del tratamiento, hecho que a su vez propicia la propagación de los microorganismos resistentes a otras personas. Existe el riesgo de que muchas enfermedades infecciosas se vuelvan intratables, La prolongación de la enfermedad y del tratamiento, a menudo en hospitales, también aumenta los costos asistenciales y la carga económica sobre las familias y la sociedad. La aparición de resistencia a antibióticos es un problema complejo impulsado por muchos factores interrelacionados; por lo tanto, las

intervenciones únicas y aisladas surten poco efecto. Se necesitan urgentemente respuestas multisectoriales a escala mundial y nacional para combatir esta amenaza cada vez mayor. (Conyer, 1999)

Debido al incremento en la resistencia a los antibióticos y la toxicidad que pueden generar en cada individuo se han estado investigando tratamientos alternativos o complementarios como es el caso de los extractos naturales, los cuales deben su actividad biológica al sinergismo entre los diversos compuestos ya que estos por separado poseen 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. (Shiva, 2007)

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de *Citrus bergamia* en bacterias asociadas a heridas. Debo mencionar que no existen bases bibliográficas ni hemerográficas de trabajos realizados con *Citrus bergamia* usándolo como antimicrobiano, esta investigación se enfocó a heridas debido a que en las propiedades de la planta se menciona el uso de ella como antibiótico en heridas.

2.1 ANATOMÍA DE LA PIEL.

La piel está constituida por diferentes tejidos integrados para realizar funciones específicas; es el órgano más grande del cuerpo humano en área superficial y peso. En adultos la piel cubre un área de casi 2 m² y pesa de 4.5 a 5 kg, aproximadamente el 16% del peso corporal. Su grosor varía desde 0.5 mm en los párpados hasta 4 mm en los talones. Sin embargo en gran parte del cuerpo es de 1 a 2 mm. Actúa como escudo protector contra el calor, la luz, lesiones e infecciones y cumple con las siguientes funciones:

- Regular la temperatura corporal.
- Almacenar agua y grasa.
- Es un órgano sensorial.
- Evitar la pérdida de agua.
- Prevenir la entrada de microorganismos.

Desde el punto de vista estructural, la piel consta de dos partes principales. La superficial que es la más delgada y está compuesta de *tejido epitelial* y se denomina epidermis. La profunda y la más gruesa, de *tejido conectivo*, es la dermis. Debajo de ésta se encuentra el *tejido subcutáneo*, que aunque no forma parte de ella, se denomina hipodermis, este consiste en tejidos areolar y adiposo.

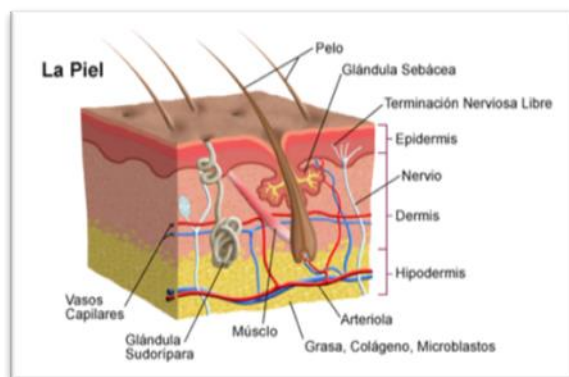


Imagen 1 Anatomía de la piel (The Nebraska Medical Center)

Las fibras que provienen de la dermis fijan la piel al tejido subcutáneo, el cual a su vez se une a los tejidos y órganos subyacentes. La hipodermis sirve como área de almacenamiento de grasa y contiene vasos sanguíneos de gran calibre que irrigan la piel. (Tortora, 2002)

2.1.1 Epidermis

La epidermis está formada por epitelio escamoso estratificado y queratinizado. Contiene 4 tipos principales de células: (Tortora, 2002)

1. Queratinocitos: Casi el 90% de las células epidérmicas son queratinocitos, que producen queratina, una proteína fibrosa y resistente que protege tanto la piel como los tejidos subyacentes del calor, de los microorganismos y de los compuestos químicos. Los queratinocitos también originan gránulos laminares, los cuales liberan un sellador impermeable.
2. Melanocitos: Constituyen el 8% de las células epidérmicas, que producen melanina. Sus prolongaciones largas y delgadas se extienden entre los queratinocitos y les transfieren gránulos de melanina, un pigmento que varía de marrón a negro, el cual contribuye al color de la piel y absorbe la luz ultravioleta dañina.
3. Células de Langerhans: Se originan en la médula ósea roja y emigran a la epidermis. Participan en las reacciones inmunitarias contra los microorganismos que invaden la piel, las afecta fácilmente la luz ultravioleta.
4. Células de Merkel: Se localizan en la capa más profunda de esta, donde tienen contacto con las prolongaciones aplanadas de neuronas sensoriales, estructuras llamadas discos táctiles o de Merkel.

La epidermis está formada por distintas capas de células. En muchas partes del cuerpo, ésta tiene cuatro estratos: basal, espinoso, granuloso y córneo.

- Estrato basal: consiste en una sola hilera de queratinocitos cúbicos o cilíndricos, algunos de los cuales son células madre, que están en división celular constante para producir nuevos queratinocitos, la queratina protege a las capas más profundas contra las lesiones. En ocasiones a éste se le denomina estrato germinativo, para indicar el papel que desempeña en la formación de células nuevas.
- Estrato espinoso: contiene 8 de cada 10 capas de queratinocitos poliédricos que están estrechamente unidas. En cada prolongación espinosa de filamentos intermedios del citoesqueleto se insertan desmosomas, que originan la unión estrecha de células. Esta disposición proporciona resistencia y flexibilidad a la piel, además se observan 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 la apoptosis, los organelos ya están en degeneración; las células contienen la proteína queratohialina, que organiza los filamentos intermedios 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.
- Estrato lúcido: se encuentra solo 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 o muertos, los cuales contienen filamentos intermedios muy apiñados y poseen una membrana plasmática engrosada.
- Estrato córneo: está constituido por 25 a 30 capas de queratinocitos muertos y planos, se observan en el interior de las células queratohialina y filamentos intermedios. Entre las células, hay lípidos de gránulos laminares, que ayudan a hacer impermeable el estrato. El estrato córneo sirve como barrera impermeable efectiva y también protege de lesiones y microorganismos.

2.1.2 Dermis

Es la capa más profunda de la piel compuesta sobre todo por tejido conectivo que contiene colágena y fibras elásticas.

De acuerdo con su estructura tisular, la dermis se divide en capas papilar superficial y reticular profunda.

La capa papilar es la porción superficial de la dermis, su área superficial aumenta gracias a pequeñas protuberancias digitiformes llamadas papilas dérmicas. Estas estructuras penetran en la epidermis y contienen asas capilares. En las papilas dérmicas también existen terminaciones nerviosas libres, dichas terminaciones envían impulsos que finalmente se traducen en sensaciones de calor, frío, dolor, cosquilleo y comezón.

La parte profunda de la dermis es la capa reticular que consiste en tejido conectivo denso e irregular con haces de fibras de colágena y algunas fibras elásticas, esta combinación le proporciona a la piel su resistencia.

2.1.3 Glándulas de la piel.

Las glándulas exocrinas de la piel son:

- Glándulas sebáceas: Su función es lubricar y cuentan con un rico contenido de lípidos.
- Glándulas sudoríparas: Están situadas en la dermis e hipodermis y sus conductos ascienden hasta la superficie corporal a través de la epidermis excretando un líquido compuesto por agua y sales en diferentes proporciones. (Pharma cosmetic)

Existen dos tipos de glándulas sudoríparas:

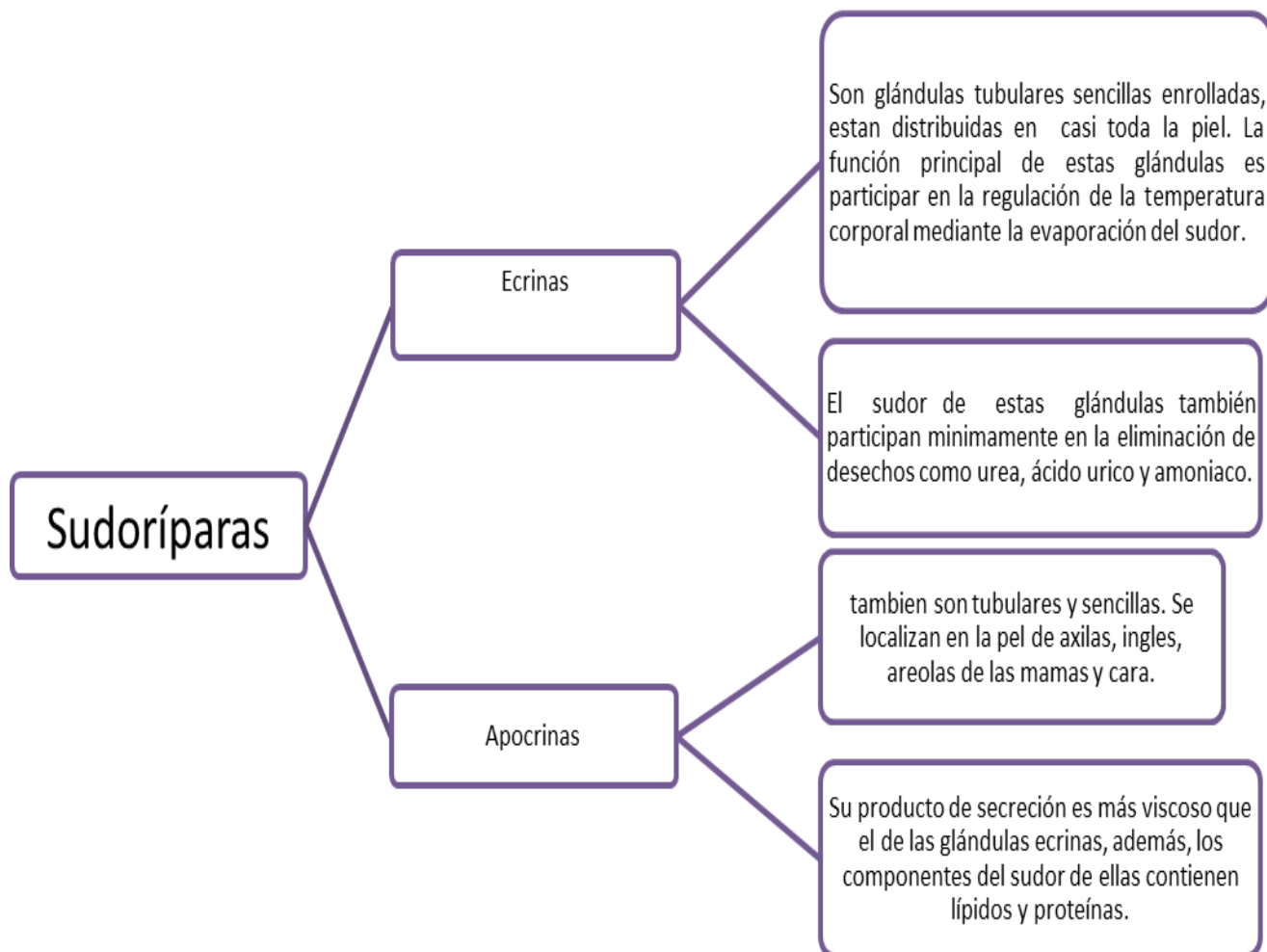


Diagrama 1 Glándulas sudoríparas (Tortora, 2002)

Glándulas ceruminosas: Son glándulas sudoríparas modificadas del oído externo que producen una secreción cérea denominada cerumen. Éste, junto con los bellos del conjunto auditivo externo, constituye una barrera viscosa que impide la entrada de cuerpos extraños en el oído.

2.2 TIPOS DE PIEL.

Aunque la piel de todo el cuerpo tiene una estructura similar, hay algunas variaciones locales con base a las propiedades funcionales y estructurales, se reconocen dos tipos principales: la piel delgada (pilosa) y la gruesa (no pilosa).

Tabla 1 Comparación de la piel gruesa y la delgada. (Tortora, 2002)

Rasgo	Piel delgada	Piel gruesa
Distribución	Todo el cuerpo, excepto palmas y la superficie palmar de los dedos, así como plantas de los pies.	Palmas de las manos, superficie palmar de los dedos y plantas de los pies.
Grosor epidérmico	0.10 a 0.15 mm	0.6 a 4.5 mm
Glándulas sebáceas	Si hay	No hay
Glándulas sudoríparas	Menos numerosas	Más numerosas
Receptores Sensoriales	Escasos	Mayor densidad

2.3 FUNCIONES DE LA PIEL.

La piel ayuda a regular la temperatura corporal, sirve como barrera protectora e impermeable entre el entorno y los tejidos internos, contiene terminaciones nerviosas sensoriales, excreta pequeñas cantidades de sales y varios compuestos orgánicos, puede absorber sustancias y participar en la síntesis de la forma activa de la vitamina D. El siguiente cuadro muestra brevemente sus funciones.

Tabla 2. Funciones de la piel. (Tortora, 2002)

FUNCIÓN	CARACTERISTICAS
Termorregulación	Regulación de la temperatura corporal en dos formas: cuando secreta sudor en la superficie y al ajustar el flujo de sangre en la dermis. La evaporación del sudor ayuda a disminuir la temperatura corporal.
Protección	Sirve como barrera física, química y biológica, protege a los tejidos subyacentes contra la abrasión, retarda la entrada de agua a través de la superficie tegumentaria al nadar o bañarse, el sebo producido por las glándulas sebáceas contiene sustancias bactericidas que matan a las bacterias de la superficie cutánea.
Sensaciones cutáneas	Entre ellas tacto, presión, vibración y cosquilleo, así como frío, calor y el dolor.
Excreción y absorción	El sudor es un vehículo para la excreción de pequeñas cantidades de sales, dióxido de carbono y dos moléculas orgánicas que son resultado del desdoblamiento de las proteínas: amoniaco y urea. La absorción de sustancias hidrosolubles en la piel es insignificante, pero algunas sustancias liposolubles pueden penetrar como es el caso de las vitaminas A, D, E y K.
Síntesis de vitamina D	La síntesis de esta vitamina requiere la activación de una molécula precursora en la piel por acción de los rayos ultravioleta solares.

2.4 HERIDAS.

Las heridas son lesiones que generan la pérdida de continuidad en la integridad de los tejidos blandos. Por tejidos blandos entendemos piel, músculo, tejido subcutáneo, órganos blandos, tendones, nervios, entre otros, producida por algún agente físico o químico. (Caride, 2009)

Después de que acontece una herida, derivan un grupo de procesos biológicos que utiliza el organismo para recuperar su integridad y arquitectura, este proceso se conoce como cicatrización e involucra 3 fases:

1. Fase inflamatoria: Se caracteriza por una respuesta vascular y otra celular.
2. Fase de fibroplasia (o de proliferación): En este periodo aparecen los fibroblastos que van a formar el tejido de granulación, compuesto por sustancia fundamental y colágeno.
3. Fase de maduración: El principal evento fisiológico es la epitelización y el aumento progresivo de la fuerza tensil de la piel.

Existen diferentes tipos de heridas y todos somos propensos a sufrirlas. Las heridas son muy comunes, pero dentro de los tipos de heridas existentes hay unos que son más usuales que otros.

Pueden producirse por agentes externos (cuchillos, vidrios, latas, etcétera) o agentes internos (hueso fracturado). A su vez encontramos tipos de heridas abiertas y cerradas, simples y complicadas.

2.4.1 Tipos de heridas. (ADAM)

2.4.1.1 Según su complejidad:

1. Abiertas: Separación de los tejidos blandos y mayor posibilidad de infección.
2. Cerradas: No se observa separación de los tejidos blandos, generan hematoma (hemorragia debajo de la piel) o hemorragias en viseras o cavidades, son producidas por golpes generalmente y requieren atención rápida porque pueden comprometer la función de un órgano o la circulación sanguínea.
3. Simples: Afectan únicamente la piel y no comprometen órganos.

4. Complicadas: Extensas, profundas, con abundante hemorragia, lesiones en musculo, nervios, tendones, órganos internos, vasos sanguíneos y puede o no existir perforación visceral.

2.4.1.2 Tipos de heridas según el agente agresor.

Existen diversas clasificaciones de acuerdo a la causa que la produjo:

1. Punzantes: Causadas por objetos puntiagudos (clavos, agujas, anzuelos, etc.)
Provocan: Dolor, hemorragia escasa, orificio de entrada no muy notorio, profundidad, puede presentar perforación de vísceras y hemorragia interna, peligro inminente de infección. Se considera la más peligrosa de todas.
2. Cortantes: Causadas por objetos afilados (vidrios, cuchillos, latas, etc.). Presenta una herida con bordes limpios y lineales, de hemorragia escasa, moderada o abundante. Puede afectar músculos, tendones y nervios.
3. Punzocortantes: Causadas por objetos puntiagudos y filosos (puñales, tijeras, cuchillos, hueso fracturado, etc.). Combina los dos tipos de heridas anteriores.
4. Abrasiones: Raspones, causadas por fricción o rozamiento de la piel con superficies duras. La capa más superficial de la piel (epidermis) es la que se ve afectada, frecuentemente se infectan, pero se curan rápidamente.
5. Laceraciones: Lesiones producidas por objetos de bordes dentados, generan desgarros del tejido y los bordes de las heridas se presentan irregulares.
6. Avulsivas: Lesión que desgarrar, separa y destruye el tejido, suele presentar una hemorragia abundante.
7. Amputación: Pérdida de un fragmento o una extremidad.
8. Contusas: Son producidas por la resistencia que ejerce el hueso ante un golpe (de puño, piedras, palos, etc.), produciéndose la lesión de los tejidos blandos. Hematoma y dolor son las causas más comunes de estos tipos de heridas.
9. Magulladuras: Heridas cerradas generadas por golpes. Se divisan como una mancha de color morado.

10. Aplastamiento: Pueden generar fracturas, hemorragias externas e internas abundantes, y lesión de órganos.

Las heridas acarrearán dos riesgos que es necesario evitar para que no pasen a mayores: la hemorragia (conlleva al estado de choque) y la infección.

2.4.1.3 Infecciones en heridas.

Las infecciones bacterianas en heridas, representan 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. (Koneman, 1999)

Las bacterias 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 aeróbicos como *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinobacter ssp*, *Flavobacterium*, Enterobacterias; *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, *Serratia sp* y *Providencia sp*. (Hernández, 2002)

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

En el caso de quemaduras graves la bacteria más peligrosa es *Pseudomonas aeruginosa* junto con Flavobacterias y otros organismos Gram negativos.

Las infecciones en heridas son divididas dentro de heridas incisionales y heridas profundas, serán consideradas como nosocomiales a todas aquellas que sean adquiridas durante la estancia en el hospital, y no nosocomiales a aquellas que hayan sido adquiridas fuera del hospital. (Azotla, 2000)

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

2.4.1.4 Heridas quirúrgicas, no quirúrgicas y por quemaduras.

Heridas quirúrgicas: Estas son infectadas por microorganismos introducidos al tejido durante los procesos operatorios cuyo origen es la flora cutánea residente del paciente. El desarrollo de una infección quirúrgica depende de varios factores: a) patogenicidad y número de microorganismos, b) defensas del huésped, c) ambiente y d) técnica quirúrgica. Las infecciones en heridas son característicamente polimicrobianas.

De estas heridas suelen aislarse Estafilococos, Enterococos o bacilos Gram negativos, y raramente otros como *Streptococcus pyogenes*, Corinebacterias, Pneumococo, Clostridio o *Bacillus subtilis*. (Mandalari, y otros, 2006)

Las infecciones de heridas y abscesos pueden ser **exógenas** y **endógenas**.

Las **exógenas** incluyen las asociadas con heridas traumáticas o úlceras por decúbito, mordeduras de animales o humanos, quemaduras o cuerpos extraños en la piel o mucosa, frecuentemente estas lesiones son colonizadas por bacterias ambientales. (Koneman, 1999)

Las **endógenas** pueden definirse de manera conveniente como aquella que requiere tratamiento quirúrgico. Las primeras incluyen infecciones; a) necrosantes de los tejidos blandos; b) de cavidades corporales, como peritonitis, pericarditis supurativa y empiema; c) limitadas a tejidos, órganos y articulaciones (como abscesos y artritis séptica) y d) las relacionadas con dispositivos de prótesis, estas infecciones son causadas por bacterias anaerobias.

Tipos de infecciones quirúrgicas.

1. Infecciones en tejidos blandos: Las infecciones en tejidos blandos, piel grasa subcutánea, fascia y musculo, suele tratarse con antibióticos, a menos que se haya formado un absceso o necrosis tisular.
2. Celulitis y linfangitis: La celulitis es una infección diseminante de piel y tejidos subcutáneos, se caracteriza por dolor e hipersensibilidad, edema y eritema locales. Se debe a numerosas bacterias. Linfangitis es la inflamación de los conductos linfáticos en los tejidos subcutáneos y se presenta por estrías rojas visibles. Las bacterias pueden llegar a los ganglios linfáticos y causar linfadenitis.
3. Infecciones necrosantes de tejidos blandos: Las infecciones en tejidos blandos que causan necrosis son más importantes por estar propensas a la amplia destrucción de tejido y mortalidades altas.

En la nomenclatura de infecciones de tejido blando necrosante es común utilizar términos como fascitis necrosante, gangrena estreptocócica y gaseosa, gangrena bacteriana, mionecrosis clostridial y gangrena de Fournier.

Casi todas las infecciones necrosantes de tejidos son causadas por bacterias Gram negativas y Gram positivas aerobias y anaerobias mixtas. Las más comunes son las especies de *Clostridium*.

Entre las bacterias anaerobias asociadas a heridas traumáticas, predominan los clostridios histotóxicos y neurotóxicos que en condiciones favorables pueden llegar a la gangrena gaseosa o tétanos.

Tabla 3. Infecciones de piel y tejidos blandos. (Cuevas & Gallegos, 2012)

Tipo de infección	Agentes etiológicos
Infecciones bacterianas piógenas	
Celulitis	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> .
Linfagitis	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> .
Impétigo	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> .
Ectima	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> .
Erisipela	<i>Streptococcus pyogenes</i> .
Hidradenitis supurativa	<i>Staphylococcus aureus</i> ,
Furúnculos	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida</i> , <i>bacterias Gram negativas</i>
Paroniquia	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Candida</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i>
Infecciones nodulares y ulceronodulares	
Bacterianas	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Treponema pallidum</i> , Micobacterias del granuloma inguinal.
Infecciones necrosantes de tejidos blandos	
Bacterianas	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , bacterias anaerobias y aerobias mixtas, <i>Pseudomona aeruginosa</i> .
Infecciones secundarias que complican lesiones previas	
Mordeduras humanas y de animales	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Pasteurella multocida</i> .
Infecciones de pie diabético	<i>Staphylococcus aureus</i> , múltiples bacterias anaerobias y aerobias.
Quemaduras	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Candida</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i>
Quistes pilonidales y sebáceos	<i>Staphylococcus aureus</i> bacterias anaerobias y aerobias.
Infecciones cutáneas en infecciones de origen sanguíneo	
Bacteriana	<i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Sthapylococcus aureus</i> .

Heridas no quirúrgicas: Son comunes las infecciones nosocomiales e incluyen: sitios de inyección, ulcera 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: 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 otra fuente. (Cruz, Sainz, & Segura, 1994) La combinación de las técnicas histopatológicas y cultivo proporciona un tratamiento precoz, así como la identidad del microorganismo y su sensibilidad a los antimicrobianos.

Tabla 4. Especies bacterianas aisladas en 392 muestras de pacientes quemados en el Hospital Rubén Leñero (Cruz, Sainz, & Segura, 1994)

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>Enterobaacter cloacae</i>	5	1.02
<i>Enterobacter agglomerans</i>	23	4.7
<i>Hafnia alvel</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

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 del 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 en las infecciones nosocomiales. (Cruz, Sainz, & Segura, 1994)

La infección de las lesiones producidas en quemaduras es un problema que se observa en todo el mundo, dicho problema está asociado a bacteremia, se sabe que puede causar rechazo de injerto e incluso en casos muy severos la muerte.

Los microorganismos que con más frecuencia infectan las lesiones por quemaduras son *S. pyogenes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, Enterobacter, Pseudomonas, otros bacilos Gram negativos, Candida y Aspergillus. (Biología Médica, 2010)

2.5 TOMA DE MUESTRA DE HERIDAS.

El método más deseable para recolectar las muestras cutáneas de las lesiones, pústulas o vesículas consiste en aspirar el líquido o pus de la profundidad de las heridas con una aguja o jeringas estériles. (Cuevas & Gallegos, 2012)

1. Debe lavarse con jabón quirúrgico y un antiséptico suave. La misma jeringa completamente cerrada puede usarse como envase transportador. Pero si se prevé una demora de más de 30 minutos es necesario pasarla a un envase anaerobio.
2. Si es difícil obtener material con aguja y jeringas, debe usarse un hisopo y en ocasiones es necesario separar los márgenes cutáneos adyacentes. El hisopo debe de colocarse de inmediato en un envase para transporte anaerobio o inocularse directamente en medios para anaerobios (Medio líquido de Tioglicolato).
3. El material de un absceso no drenado anteriormente, debe contener el o los agentes etiológicos de la enfermedad en la mayoría de los casos. En cambio una herida abierta, una úlcera o fístula se contamina a menudo con microorganismos cutáneos, de las mucosas o del medio ambiente.

2.6 CARACTERISTICAS DE LOS MICROORGANISMOS COMUNMENTE ASOCIADOS A HERIDAS UTILIZADOS EN ESTA EVALUACIÓN.

Las bacterias son de vida libre, cosmopolita y patógena para el hombre y animales.

- Estos causan enfermedades infecciosas en los seres vivos.
- Son beneficiosos como los que reciclan el carbono, azufre, nitrógeno y fósforo; algunos viven el intestino del hombre (ejemplo: *Escherichia coli*), los cuales sintetizan vitaminas como BIOTINA

Características:

- Nutrición: heterótrofa.
- Reproducción: asexual; la reproducción de las bacterias se realiza a gran velocidad; algunas se dividen un vez cada 20 minutos.

Estructura:

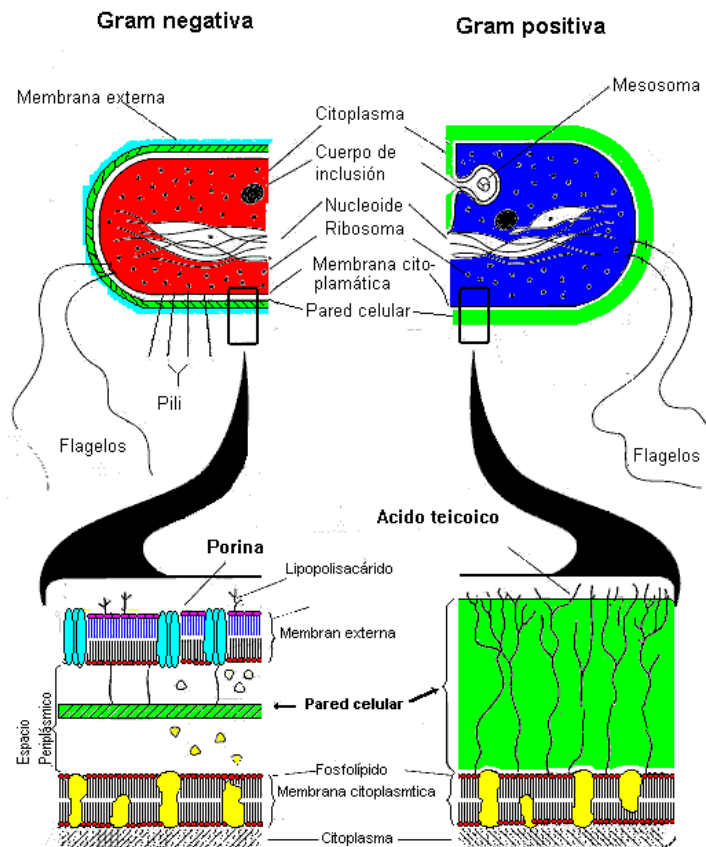


Imagen 2. Estructura bacteriana. (González J. R.)

2.6.1 Bacterias Gram positivas

La estructura básica de la pared bacteriana de las Gram (+) está constituida principalmente por:

- Peptidoglucano (mucopéptido): Está compuesta por moléculas alternadas de N-acetilglucosamina, además tiene adherida a cada molécula el ácido murámico un tetrapeptido formado por D y L aminoácidos.
- Ácido teicoico: Que son polímeros fosfato glicerol y ribitol, se localizan en la capa externa de la pared celular y algunos de estos atraviesan hasta llegar a la membrana celular.

2.6.1.1 *Staphylococcus epidermidis*.



Imagen 3. Crecimiento de *Staphylococcus epidermidis* en Agar Sales Manitol.

Se presenta frecuentemente en la piel de humanos, de animales y en mucosas. Es la causa menos común de infecciones oportunistas y es un mediador de infecciones nosocomiales. *Staphylococcus epidermidis* puede obtenerse en una herida debido a que es parte de la flora normal. Provoca daño en la piel separando el estrato granuloso del córneo dando signo de piel escaldada.

Staphylococcus epidermidis representa uno de los mayores componentes de la microflora de la piel y mucosa humana. *Staphylococcus epidermidis* se ha convertido en un importante patógeno nosocomial, debido al alto incremento en el uso de dispositivos médicos como catéteres endovenosos de permanencia prolongada.

Los pacientes de riesgo son los que tienen cuerpos extraños como en el caso de prótesis, soporte o catéteres, ya que producen infección en las heridas quirúrgicas cuando estos cuerpos extraños están presentes.

Staphylococcus epidermidis es el responsable del 20% de los casos de impédigo, pueden provocar varias enfermedades tales como bacteremia y endocarditis. (Biología Médica, 2010)

TRATAMIENTO.

El fármaco de elección es la vancomicina aunque la bacteremia por *S. epidermidis* no pone en riesgo la vida del paciente iniciando el tratamiento de forma oportuna.

Los *Staphylococcus* desarrollaron una rápida resistencia a los antibióticos después de la introducción de penicilina, y en la actualidad menos del 10% de las cepas son sensibles a este antibiótico; así que el antibiótico de elección es la 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. (Flores, Armijo, & Mediavilla, 2003)

El número de microorganismos necesarios para que se produzca una infección (dosis efectiva) 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 prevendrá la mayoría de las infecciones en individuos sanos.

2.6.1.2 *Staphylococcus aureus*.



Imagen 4. Prueba de coagulasa para *Staphylococcus aureus*



Imagen 5. *Staphylococcus aureus* en agar Sales Manitol

Staphylococcus aureus son cocos Gram (+) en racimos, inmóviles. Producen faringitis, neumonía, muy diversas lesiones cutáneas, endocarditis, intoxicación alimentaria y síndrome de Shock tóxico. *S. aureus* es la principal causa de infección en pacientes con quemaduras extensas y heridas quirúrgicas, y solo es superado por *E. coli* como causa de infecciones hospitalarias. (Cotran, Kumar, & Collins, 2000)

TRATAMIENTO.

Los antibióticos de elección para el tratamiento de infecciones de heridas son oxacilina, para *S. aureus* resistente a la metilicina se elige la vancomicina con o sin rifampicina, también depende del diagnóstico precoz y la temperatura 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 (metilicina,

nafticilina, oxacilina, dicloxacilina). No obstante, los estafilococos desarrollan resistencia a estos antibióticos.

Actualmente del 30% al 50% de las cepas de *S. aureus* son resistentes a las penicilinas semisintéticas. (Cotran, Kumar, & Collins, 2000)

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. (Koneman, 1999)

2.6.1.3 *Streptococcus pyogenes* (Grupo A).



Imagen 6 *Streptococcus pyogenes* en agar Sangre, se observa β - hemolisis.

Streptococcus pyogenes habita en la piel y en vías respiratorias superiores de los seres humanos. No se considera parte de la flora normal, pero puede existir en 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 gotas contaminadas producidas por tos o estornudos.

En la piel, puede provocar diferentes patologías, incluyendo impétigo y erisipelas, las que ocasionan lesiones ampollosas. La fiebre escarlatina se caracteriza por una erupción con dolor de garganta, fiebre y una típica película blanca sobre la lengua y la garganta. En el útero, puede causar fiebre puerperal, que en el pasado fuera la causa de muerte más común entre las mujeres que habían dado a luz. En la fascia muscular puede producir fascitis necrotizante, también llamada "síndrome de la bacteria devoradora de carne". (Cotran, Kumar, & Collins, 2000)

El antibiótico de elección es la penicilina, la cual es administrada por 10 días. La eritromicina y las cefalosporinas se usan en pacientes alérgicos a la penicilina y se administran antibióticos antiestafilocócicos en las infecciones mixtas. *Streptococcus pyogenes* es resistente a sulfamidas, tetraciclinas, cloranfenicol, macrolidos y lincosamidas. (Murray & Rosenthal, 2006)

2.6.1.4 *Bacillus subtilis*

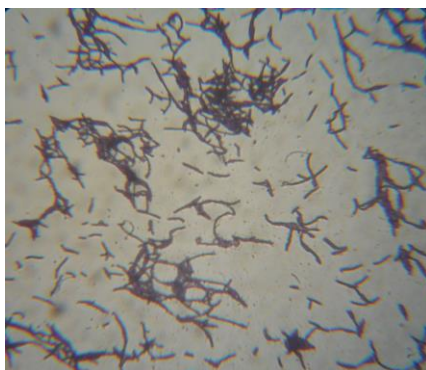


Imagen 7. Tinción Gram de *Bacillus subtilis*.

Bacillus subtilis es una bacteria gram positiva, son bacilos de gran tamaño, forman esporas extraordinariamente resistentes a condiciones desfavorables, este microorganismo es inocuo para humanos a excepción de personas inmunosuprimidas. Se ha asociado a procedimientos postquirúrgicos, inmunosupresión, heridas traumáticas, quemaduras, hemodiálisis y abuso de drogas parenterales. (Koneman, 1999)

2.6.1.5 *Propionibacterium acnes*

Propionibacterium acnes es un bacilo Gram-positivo anaerobio de crecimiento lento, integrante de la microbiota normal de piel, mucosas, nasofaringe, cavidad oral, tracto intestinal y genitourinario y se le atribuye un bajo nivel de patogenicidad, esta bacteria causa enfermedades infecciosas muy comunes. Dado que es un comensal de piel, puede ser considerado como contaminante en hemocultivos, materiales de heridas y otros líquidos de punción. Es el agente causal del acné inflamatorio y existen informes en la literatura que puede ser causante de endocarditis, meningitis y absesos cerebrales debido a complicaciones de la craneotomía. (Biología Médica, 2010) (Zarate, Diego, Guevara, & Smayevsky)

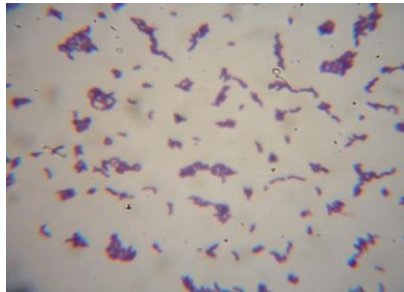


Imagen 8. Tinción Gram de *Propionibacterium acnes*

TRATAMIENTO.

El antibiótico de elección para *Propionibacterium acnes* es clindamicina vía oral hasta por 60 días dada la posible complicación ósea. (Zarate, Diego, Guevara, & Smayevsky, 2009)

2.6.2 Bacterias Gram negativas.

En las infecciones producidas por *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus* o *Pseudomonas* suelen encontrarse también *Streptococos anaerobios* y *Bacteroides flagilis*, ya que tales infecciones son generalmente el resultado de contaminación producida por el contenido intestinal.

2.6.2.1 Estructura de la pared de bacterias Gram negativas.

Son microorganismos que generalmente no forman esporas, la estructura básica de la pared celular de estos bacilos es de gran importancia y son responsables de su patogenicidad.

Muchos microorganismos como *K pneumoniae* y *E. coli* presentan una capsula formada por material polisacárido, que se denomina antígeno capsular o también llamado antígeno K.

A través de la cápsula externa de los organismos móviles penetra una estructura proteica denominada flagelo, portadora del antígeno H. Estructuras superficiales llamadas fimbrias que sobresalen de la cápsula o la pared celular externa facilitan la adherencia a la mucosa en diferentes aparatos.

2.6.2.2 *Escherichia coli*.

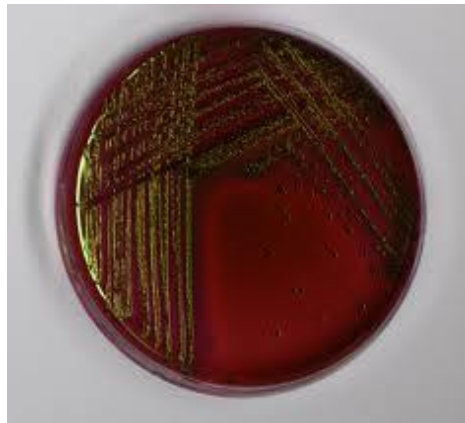


Imagen 9. *Escherichia Coli* en agar EMB.

Es un bacilo aerobio facultativo muy abundante en tracto gastrointestinal, puede ser responsable de procesos diarreicos. La mayoría de las infecciones son endógenas (flora microbiana normal del paciente).

Algunas de las enfermedades que produce son: bacteremia, infecciones intraabdominales (asociada 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.

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.

2.6.2.3 *Proteus mirabilis*.

Proteus mirabilis está presente principalmente en el aparato urinario bajo, y se le ha considerado responsable de infecciones en heridas y de pulmón. (Azotla, 2000)

Su principal característica es el fenómeno de Swarm (crecimiento confluyente) de color gris azulado, que complica el aislamiento de otros microorganismos presentes en cultivos. La presencia de numerosos flagelos les confiere una movilidad importante en infecciones ascendentes.

2.6.2.4 *Enterobacter aerogenes*



Imagen 10. *Enterobacter aerogenes* en agar Mac Conkey

Enterobacter aerogenes es una bacteria patógena que causa infecciones oportunistas en la piel y otros tejidos, infecciones en neonatos y en pacientes inmunodeprimidos. (Murillo, 2009) Suelen colonizar a los pacientes hospitalizados, en particular a los tratados con antibióticos, y han sido asociados con infecciones por quemaduras, de heridas, de vías respiratorias y tracto urinario. ⁽⁴⁰⁾

2.6.2.5 *Klebsiella pneumoniae*

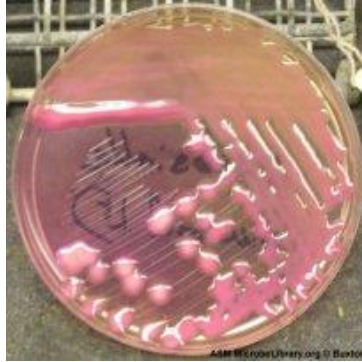


Imagen 11. *Klebsiella pneumoniae* en agar Mac Conkey

Klebsiella pneumoniae es la causa de hasta el 10% de las infecciones adquiridas en los hospitales (vías urinarias, respiratorias y heridas). (Azotla, 2000)

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 en las heridas, de los tejidos blandos e infección en el tracto urinario. (Murray & Rosenthal, 2006)

Klebsiella pneumoniae es un patógeno nosocomial y adquirido, y es una preocupación creciente para los médicos.

2.6.2.6 *Pseudomonas aeruginosa*.

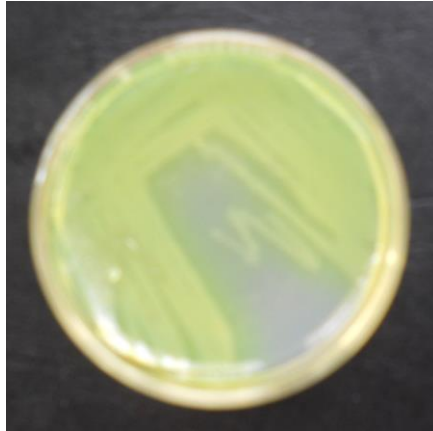


Imagen 12. *Pseudomonas aeruginosa* en agar Cetrinida

Pseudomonas aeruginosa 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 *Pseudomonas aeruginosa* están asociados con enfermedades gastrointestinales o quemaduras. (Azotla, 2000)

Los pigmentos que produce son probablemente determinantes de la 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 inmunocomprometidos, en heridas y en sepsis postquemaduras, infecciones postquirúrgicas, septicemia e infecciones del tracto respiratorio. (Morales, 2002)

Pseudomonas aeruginosa: es el causante de dermatitis, causada por una disminución del control de la calidad del agua potable y es el más común causante de fiebres en infecciones. Puede causar una variedad de infecciones en piel localizadas y generalizadas, en condiciones de humedad elevada (oído de nadadores), puede causar 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. (Dagnino & Ramírez, 2006) (Montero, Hervás, Morera, & Ramos, 2007)

TRATAMIENTO.

Los antibióticos recomendados de primera elección son principalmente aminoglucosidos (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. (Murray & Rosenthal, 2006) (Montero, Hervás, Morera, & Ramos, 2007)

2.7 DESCRIPCIÓN BÓTANICA DE *Citrus bergamia*.

Bergamota es una fruta típica del sur de Italia, donde se utiliza principalmente por su aceite esencial el cual es extraído de la cáscara. El aceite esencial es ampliamente utilizado en la industria farmacéutica debido a su actividad antibacteriana y antiséptica.

Su cáscara representa el 60% de su fruta y puede causar problemas ambientales debido a su fermentación. La piel de la bergamota contiene compuestos muy útiles como flavonoides y pectinas. (Mandalari, y otros, 2007)

El bergamoteo es un árbol de la familia de las Rutáceas que es el resultado del injerto del limón y el naranjo amargo, formándose el híbrido bergamoteo (*Citrus bergamia*) producido en la ciudad de Bérghamo, Italia. (Aromas y sabores del mundo)

Alcanza entre 4 y 5 metros de altura. Tiene el tronco liso y ramoso, con la copa abierta las hojas son alternas, ovadas, persistentes, aserradas, duras y lustrosas. Sus flores son blancas, pequeñas y olorosas.

Su fruto tiene forma esferoidal aplanada de unos 5 cm de diámetro, pulpa verdosa, dividida en gajos, de sabor agridulce. La corteza es lisa y amarilla y contiene vesículas llenas de aceites esenciales. (Alvi olor)

También posee benéficas propiedades antisépticas y curadoras de la piel, siendo empleada en casos de acné, forúnculos, eczemas, seborrea, psoriasis, picaduras de insectos y heridas. (Aromas y sabores del mundo)

2.7.1 Método de extracción de *Citrus bergamia*

El aceite esencial de bergamota es obtenido por medio de expresión de las cáscaras de frutos maduros con Etanol (este método generalmente se aplica a la familia de Citrus). El principio de este método es muy simple: las cascarras se cortan en pequeños trozos y se ejerce una acción abrasiva sobre la superficie del fruto, después de desechar los fragmentos sólidos, el aceite esencial se separa por centrifugación. El aroma de bergamota es fresco, frutal y dulce. Contiene un elemento llamado bergapteno que aumenta la sensibilidad de la piel a los rayos solares. Por ello para utilizarse sobre la piel se le extrae el bergapteno o se utiliza diluido al 2%. (Villa, 2004) (Alvi olor)

2.7.2 Componentes.

La cascara contiene las especie características de cítricos rutáceos como: flavonona y neo-hesperósidos derivados de naringenina, eriodictiol y hesperetina. Además de una pequeña cantidad de flavona O- y C-glicosidos. Acetato de linalilo (27%), limoneno (42%), linalol (7%) γ -terpeno y bergapteno un compuesto de la furanocumarina. (5%) (Alvi olor) (Mandalari, y otros, 2006)



Imagen 13. *Citrus bergamia* (Aromas y sabores del mundo)

2.7.3 Propiedades.

Propiedades: Antiséptico, calmante, antidepresivo, desinflamatorio, analgésico, antiespasmódico, diurético, benéfico para el tratamiento de acné, eczema, seborrea, furúnculos, psoriasis, picaduras de insectos, heridas, resfriado, gripe, estomatitis, dolor de garganta, fiebre y mala digestión. Es un potente desinfectante de las vías urinarias y un aceite valioso para personas que sufren de cistitis. (Alvi olor) (Flores, Armijo, & Mediavilla, 2003)

2.7.4 Efectos adversos.

Siempre se tiene que utilizar diluido y nunca en personas con piel sensible, usado al 2% de la dilución de la piel no se ve afectada por el sol, por encima de este porcentaje es altamente fotosensible. (Flores, Armijo, & Mediavilla, 2003)

2.8 CONTROL QUIMICO DEL CRECIMIENTO MICROBIANO.

Un agente antimicrobiano es una sustancia química que mata o inhibe el desarrollo de los microorganismos. Esta sustancia puede ser natural o sintética. A los agentes que no matan a las bacterias solamente inhiben su crecimiento se denominan bacteriostáticos.

Los agentes bacteriostáticos suelen inhibir la síntesis de proteínas y actúan fijándose a los ribosomas y cuando se disminuye la concentración del fármaco el agente se ve libre del ribosoma y se vuelve a dar el crecimiento.

Los agentes bactericidas inducen la muerte pero no tiene lugar la lisis o rupturas celulares; estos generalmente se unen íntimamente con sus blancos celulares y no pueden eliminarse por dilución.

Medición de la actividad antimicrobiana:

La actividad antimicrobiana se mide por la determinación de la cantidad menor de agente necesario para inhibir el desarrollo de un organismo de prueba, un valor llamado Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). (Madigan, 2004)

3. OBJETIVOS.

3.1 OBJETIVO GENERAL.

- Evaluar la actividad antimicrobiana de *Citrus bergamia* utilizando la técnica de doble dilución en microplaca, el método de Mossman y Microscopía Electrónica de Transmisión para evidenciar el efecto de este extracto sobre bacterias asociadas a heridas.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

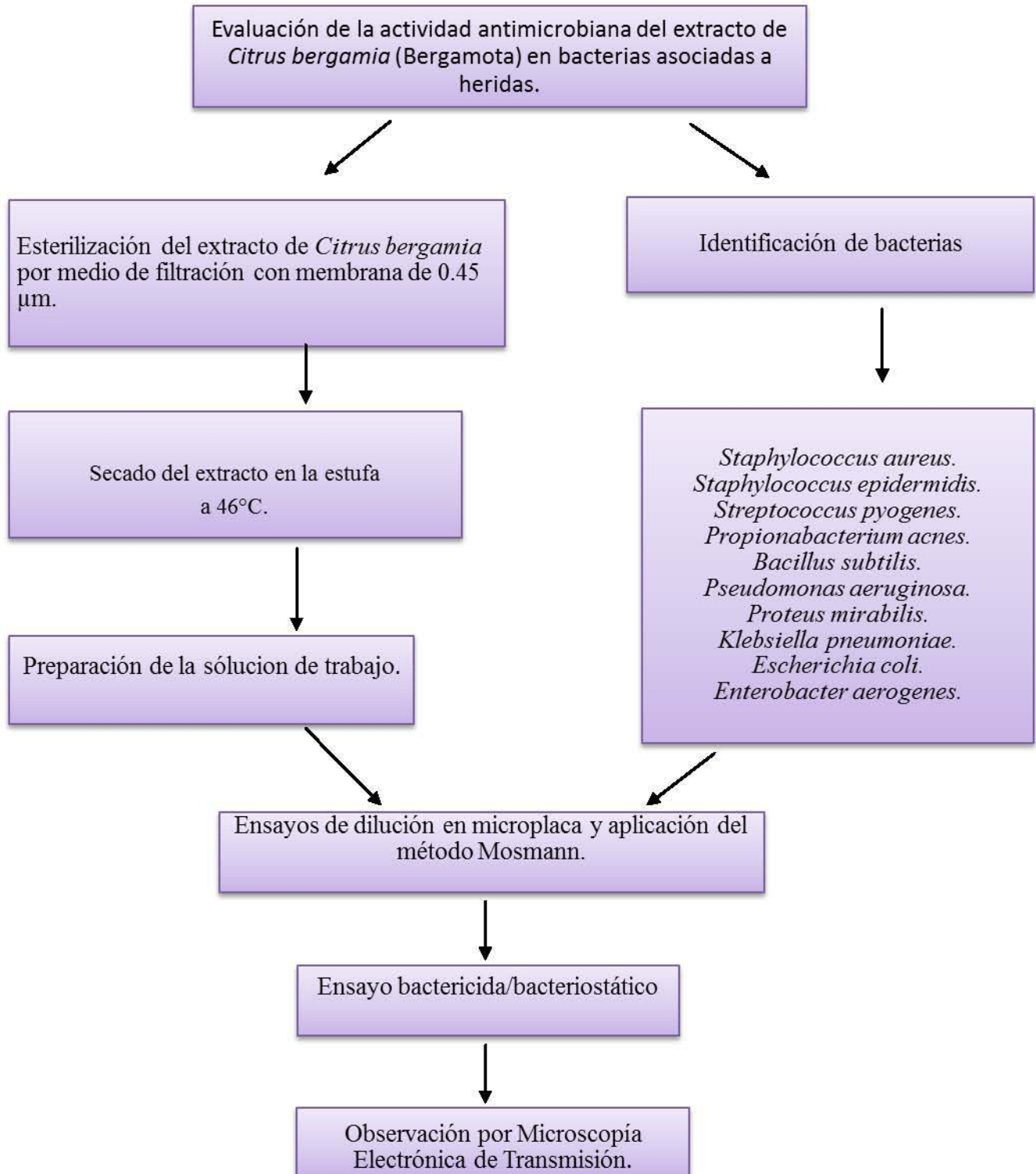
- Procesar el extracto hidroalcohólico comercial de *Citrus bergamia*.
- Aislar e identificar bacterias provenientes de muestras de heridas.
- Enfrentar las bacterias aisladas con el extracto hidroalcohólico de *Citrus bergamia*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) del extracto hidroalcohólico de *Citrus bergamia* usando la técnica de Mosmann.
- Determinar la actividad bacteriostática o bactericida del extracto hidroalcohólico de *Citrus bergamia*.

4. HIPÓTESIS

- Si el extracto de *Citrus bergamia* presenta un efecto inhibitorio sobre bacterias características de heridas, éste podría ser usado en un futuro con fines terapéuticos, en dichas infecciones.

5. METODOLOGÍA.

Diagrama 2. Diagrama de flujo de la metodología general.



5.1 *EXTRACTO DE Citrus bergamia.*

El extracto que se trabajo fue un extracto hidro-alcohólico de Extractos Sigma[®] y por razones de confidencialidad no se dieron los datos pertinentes.

5.2 *SECADO DEL EXTRACTO Y PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK DE CITRUS BERGAMIA.*

1.- El extracto hidro-alcohólico se esterilizó por filtración utilizando una membrana Millipore de 0.45 μm , (se utilizó esta membrana debido a que el extracto ya se estaba estéril y solo quisimos clarificarlo), un filtro de bala y una bomba de vacío, este proceso se realizó en la campana de flujo laminar.



Imagen 14. Procedimiento para esterilizar el extracto por medio de un filtro de bala y una bomba de vacío.

2.- El filtrado se recibió en un cristalizador estéril y al filtrado se le realizaron pruebas de esterilidad por triplicado, colocando una gota del filtrado en agar BHI y estriando la gota, una vez realizado esto se incuba hasta 48 horas, si no hay crecimiento bacteriano se coloca en la estufa a una temperatura de 46°C +/- 2 hasta sequedad total.

3.- Posteriormente se procede a realizar el raspado del sólido restante con ayuda de una espátula en condiciones de esterilidad, el polvo se guardó en un frasco protegido de la luz y se pesó en la balanza analítica para calcular el rendimiento.

4.- Del extracto seco se tomaron 0.5 g y se disolvieron en 2.5 mL de DMSO* y se aforo a 10 mL con SSF al 0.85 % para obtener una concentración de 50 000 µg/mL. (APÉNDICE 3)

5.- A esta solución también se le realizaron prueba de esterilidad, se protegió de la luz y se guardó en refrigeración.

* Nota: El DMSO se utilizó para disolver mejor el extracto y la concentración que tenía este en la solución stock fue de 25%, a esta concentración no le causa ningún daño a las bacterias ya que la concentración a la cual es clínicamente efectivo es del 80 y 90%. (sott.net)

5.3 OBTENCIÓN DE LAS CEPAS.

Algunas cepas bacterianas fueron aisladas de muestras donadas por el hospital de Traumatología de Lomas Verdes (9 muestras), otras fueron tomadas del cepario del laboratorio del Profesor Gerardo Cruz Jiménez de Posgrado, algunas fueron cepas ATCC debido a las pocas muestras donadas. (Diagrama 3)

Tabla 5. Número de cepas o muestras de cada bacteria evaluada.

Número de cepas	Bacteria
1 (clínicas) 1 (cepario)	<i>Staphylococcus aureus.</i>
2 (clínicas)	<i>Echerichia coli</i>
2 (clínicas)	<i>Staphylococcus epidermidis.</i>
2 (clínicas)	<i>Enterobacter aerogenes</i>
2 (clínicas)	<i>Streptococcus pyogenes</i>
2 (cepario)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
2 (cepario)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
2 (cepario)	<i>Propionibacterium acnes ATCC 11827</i>
2 (cepario)	<i>Bacillus subtilis ATCC 6633</i>
2 (cepario)	<i>Proteus mirabilis</i>

5.4 IDENTIFICACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS.

Las bacterias aisladas de heridas fueron donadas en medio de mantenimiento de tioglicolato y las tomadas del cepario se encontraban en medio BHI.

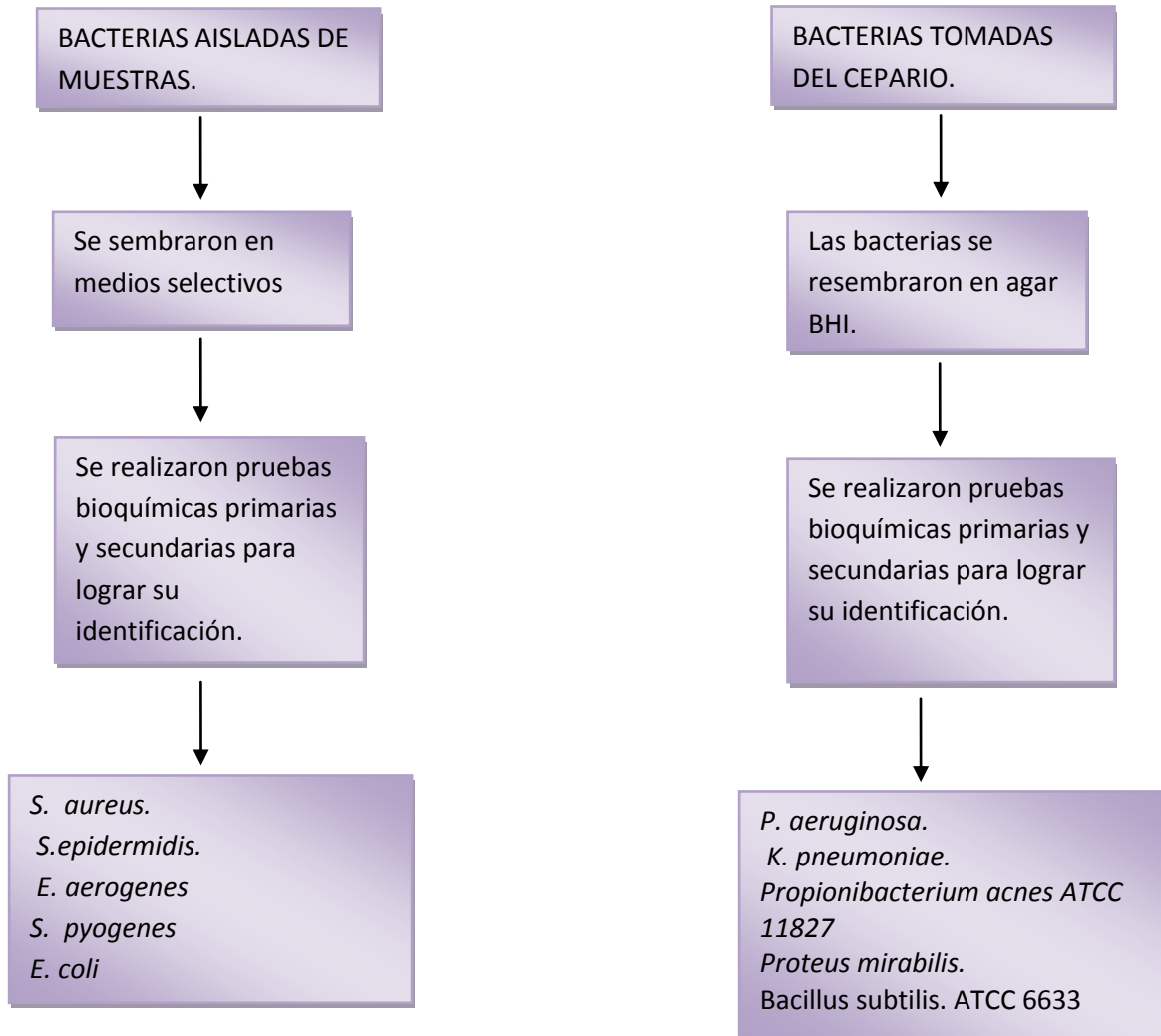


Diagrama 3. Bacterias utilizadas en la determinación de la actividad antimicrobiana in vitro del extracto de *Citrus bergamia*.

5.5 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.

5.5.1 Preparación del Material.

Material

- Asa bacteriológica
- Microplacas
- Micropipeta de 100 μ L
- Tubo 0.5 del Nefelometro de Mc Farland
- Cajas Petri
- Tubos de ensaye con BHI doble concentración
- Estufa bacteriológica

1.- Se sembraron las bacterias que se iban a utilizar en Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI 2x), se incubaron en la estufa bacteriológica a 37°C de 24 – 72 horas dependiendo de la bacteria.

2.- Se preparó solución salina al 0.85%, caldo Infusión cerebro corazón a doble concentración (2x) el cual se colocó en tubos de ensayo con 3 mL aproximadamente y se esterilizaron a 15 lb /121°C / 15 min.

3.- Todo el material utilizado para este ensayo se esterilizó a 15 lb /121°C / 15 min.

5.5.2 Ensayo en Microplaca.

La determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto de *Citrus bergamia* se evaluó mediante la técnica de doble dilución, la cual se realizó en microplacas, esta técnica se utilizó para medir la actividad semi-cuantitativamente frente a una bacteria estandarizada para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC), la cual es la menor concentración necesaria del antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de éstas.

- La microplaca consta de 96 pozos con 12 columnas y filas de la A-H filas de los cuales del 1 –al 9 son doble dilución.
- Del pozo 2 al 9 se colocaron 100 μ L de SSFE.
- El pozo 10 es el control positivo al cual se le agregó 100 μ L de SSF y 100 μ L de BHI de la bacteria estandarizada.
- El pozo 11 es el control negativo el cual tiene 100 μ L de SSF y 100 μ L de BHI estéril a doble concentración (2x).
- El pozo 12 es el blanco el cual contenía 100 μ L de extracto estéril y 100 μ L de BHI estéril a doble concentración (2x).
- En los pozos 1 y 2 se colocaron 100 μ L de extracto estéril y del pozo 2 al 9 se realizaron diluciones dobles del extracto de la siguiente manera:

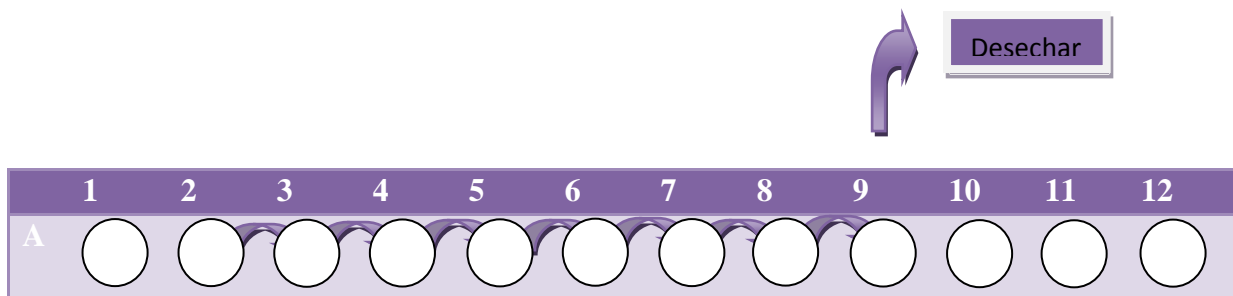


Diagrama 4. Ejemplificación del ensayo en microplaca (se pasan 100 μ L en cada flecha del diagrama)

- ▣ La bacteria elegida para cada ensayo se sembró 24 horas antes o según las necesidades de crecimiento, posteriormente se inoculó un tubo de BHI de doble concentración (2x) con la bacteria elegida para el ensayo, la cual se estandarizó al 0.5 con el Nefelómetro de Mc Farland y se mezcló con un agitador vortex.
- ▣ A los pozos del 1 al 9 se agregaron 100 μ L de bacteria estandarizada y esta prueba se realizó por duplicado (2 cepas por prueba)
- ▣ Obteniendo un volumen final de 100 μ L.
- ▣ Se realizó todo lo anterior para cada una de las bacterias probadas.

5.5.3 Prueba de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol)

Esta prueba se realizó de manera colorimétrica adicionando a cada pozo de la microplaca 5 μ L de MTT el cual es de color amarillo. La placa se incubó por 10 minutos. Si no hay bacterias viables el pozo no cambiará de color pero si hay bacterias viables el MTT virará a morado.

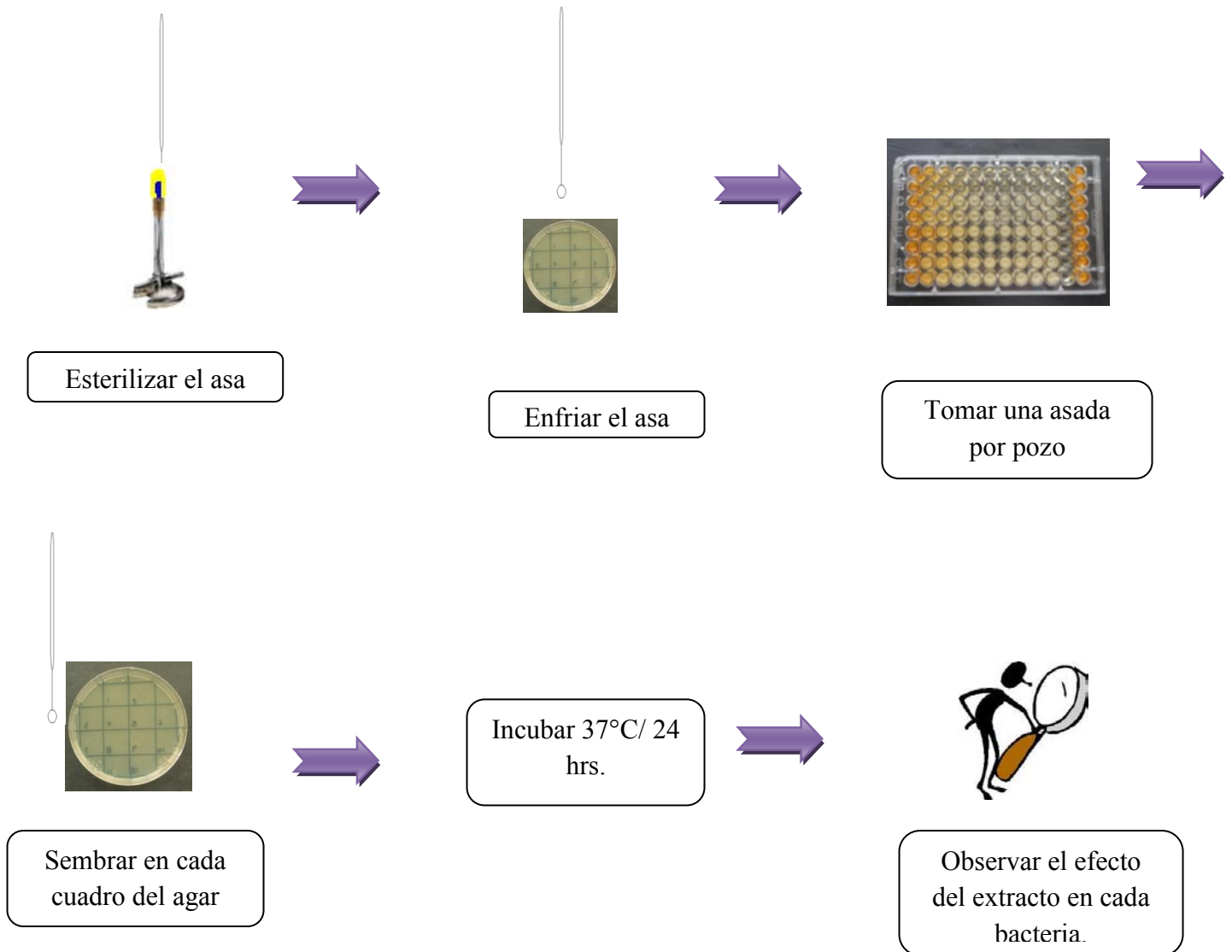
Esta técnica nos permite determinar la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) observando un cambio de coloración y así verificar la acción del extracto.

5.5.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

La Concentración Mínima Inhibitoria se determina observando los resultados de la microplaca y se considera que es la mínima concentración del extracto que inhibe la multiplicación y crecimiento visible de una cepa bacteriana, así como su viabilidad este se logró observar utilizando el MTT.

5.6 ENSAYO BACTERICIDA / BACTERIOSTÁTICO

Una vez transcurrido el tiempo de incubación de la microplaca y antes de agregar los 5 μL de MTT se realizó el procedimiento que indica el siguiente diagrama de trabajo:



Nota: Se utiliza una caja Petri con agar BHI por cada fila de la microplaca.

Diagrama 5. Procedimiento para realizar el ensayo de bactericida/bacteriostático

5.7 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET).

5.7.1 Preparación de bacterias.

- Se sembró una caja Petri con la bacteria *Bacillus subtilis* la cual mostró tener un efecto bactericida y se incubó a 37°C por 24 hrs. (Imagen 20 inciso D)
- Se prepararon 20 mL de BHI a doble concentración y se distribuyeron en 3 tubos de ensayo con tapón de rosca y se esterilizaron a 15 lb/ 121°C/15 min.
- También se prepararon 100 mL de SSFE al 0.85% la cual se esterilizó en las mismas condiciones que el BHI, además de esterilizar pipetas graduadas de 3 y 5 mL.

5.7.2 Preparación de las bacterias para MET.

Se estandarizó la bacteria *Bacillus subtilis*, sembrada 24 horas antes en un tubo de ensayo con BHI estéril, a 0.5 del nefelómetro de Mac Farland.

- En un tubo de ensayo se colocaron 3 mL de la bacteria estandarizada + 3 mL del extracto de *Citrus bergamia*.
- El control (+) contiene 3 mL de la bacteria estandarizada en BHI a doble concentración (2x) + 3 mL de SSFE.
- Los tubos que se prepararon se incubaron durante 24 horas a 37°C.
- A las 24 horas de incubación los tubos se centrifugaron a 2500 rpm por 15 minutos, se desechó el sobrenadante y se re-suspendió la pastilla con 3 mL de SSFE, este procedimiento se realiza por triplicado.
- Posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm por 15 minutos, se desechó el sobrenadante y se le agregó a cada tubo 3 mL de reactivo de Karnosky* y se dejó reposar por una hora.
- Después del reposo se centrifugaron a 2500 rpm por 30 minutos y posteriormente se eliminó el sobrenadante y se re-suspendió la pastilla en 3 mL de SSFE.

*Reactivo de Karnosky: Glutaraldehido-paraformaldehido al 5%, es un fijador químico. (González & Hernandez, 2003)

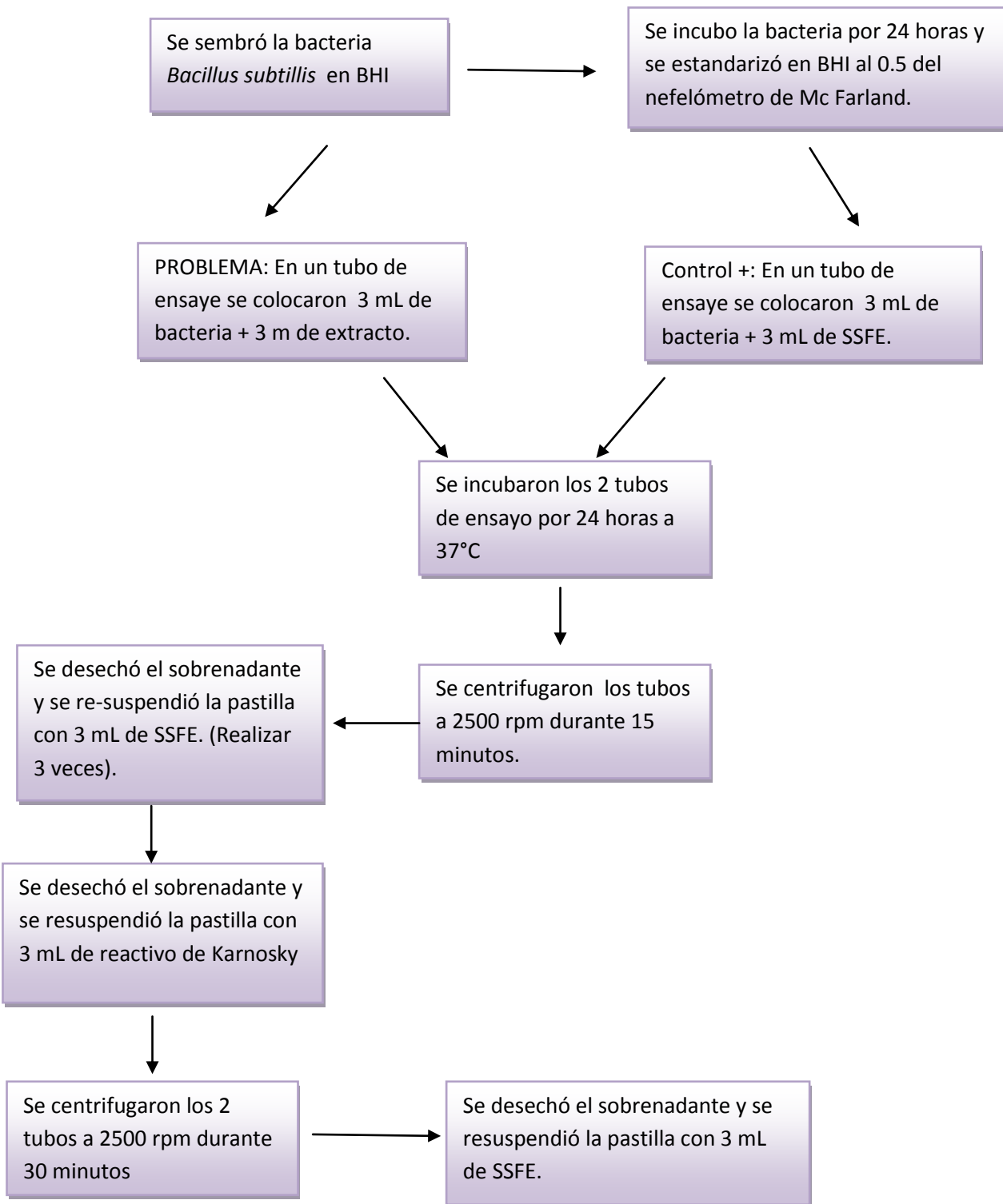


Diagrama 6. Preparación de *Bacillus subtilis* para microscopia electrónica.

5.7.3 Preparación de las rejillas con membrana Formvar*.

- Las rejillas deben estar lavadas con acetona y estar secas previamente.
- Se prepara una solución formvar* al 0.1 % en cloroformo, si se hacen con parlodión* se prepara una solución 0.1 % de parlodión en acetato de amilo.
- En un vaso de precipitados, bien limpio (un litro o más) se pone un litro de agua destilada.
- Se impregna de formvar en portaobjetos y se deja en reposo hasta que se seque la película, después se corta con la ayuda de las uñas los lados del portaobjetos y sobre el baño de agua destilada se sumerge poco a poco el portaobjetos hasta separar la película plástica y sí la película es de color dorado – plateado es adecuada.
- Las rejillas son colocadas sobre una membrana y posteriormente se recogen con papel filtro. Las rejillas se deben secar perfectamente antes de volverse a usar.



Imagen 15 Preparación de rejillas con membrana de Formvar.

*Membrana formvar: Es una resina que forma una película de soporte para las rejillas de MET.

*Membrana de Parlodión: es una película de nitrocelulosa que se usa para las rejillas de MET.

5.7.4. Tinción Negativa.

- Una gota de suspensión bacteriana se depositó sobre un papel parafilm y se colocaron dos rejillas con membrana para adsorber la muestra durante 5 minutos, posteriormente se toman las rejillas y el exceso se absorbe con papel filtro y enseguida se tiñeron con una gota de ácido fosfotúngstico (AFT solución al 1% con pH=7.2) durante un periodo que varía de 1 – 3 minutos, las rejillas se recogieron y se absorbió el exceso de colorante, y se secaron en la estufa a 35°C. Las muestras son observaron y fotografiaron en el microscopio de transmisión (JEOL JEM 100S).

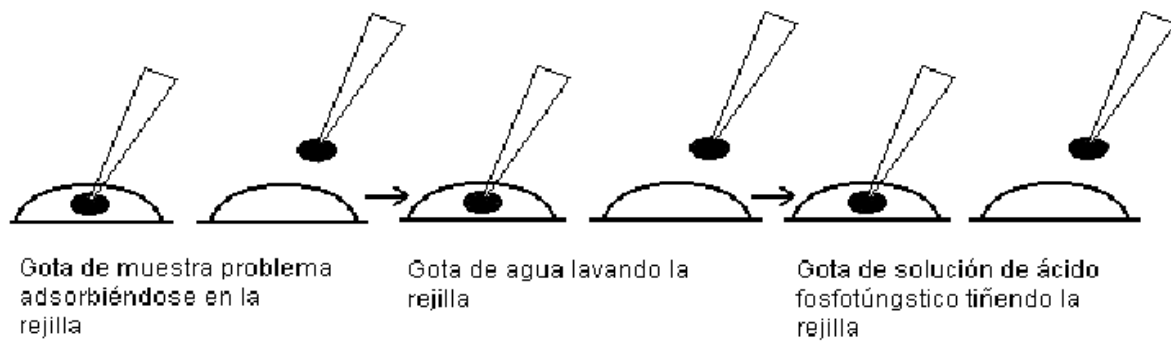


Imagen 16. Procedimiento para la tinción negativa.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS.

Se utilizaron 10 bacterias asociadas a heridas algunas fueron muestras donadas por el hospital de traumatología del IMSS de lomas verdes (Diagrama 3). Debido a la escases de muestras y a que ya son tomadas con jeringa además de que las muestras no pueden ser desechadas hasta que se obtenga el resultado tomamos algunas bacterias asociadas a heridas del cepario de Microbiología en posgrado anteriormente a cargo del profesor Gerardo Cruz Jiménez, las bacterias utilizadas fueron escogidas ya que están asociadas a heridas.

A las 10 cepas (Tabla 4) se les realizó tinción de Gram, catalasa y oxidasa para identificar el género, además de realizar pruebas bioquímicas secundarias para identifica la especie. (APÉNDICE 2)

6.2 ESTERILIDAD DEL EXTRACTO.

El extracto fue donado por extractos sigma, ya que no logramos conseguir la planta, este extracto se dejó secar en un cristizador por semanas a 46°C una vez seco se raspo con una espátula en condiciones de esterilidad. Al polvo obtenido se le realizaron pruebas de esterilidad en BHI (imagen 17). De este polvo se obtuvieron 1.9 g de los cuales los 0.7 g se utilizaron para la preparación de soluciones de trabajo pero ninguna de las anteriores mostro algún efecto (APÉNDICDE 3).

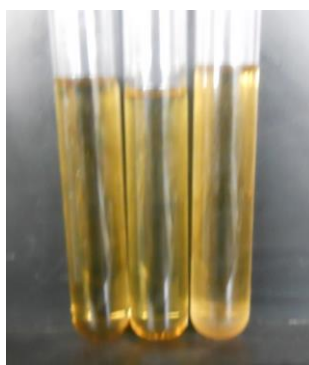


Imagen 17. Resultados de la prueba de esterilidad a la solución de trabajo.

6.3 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRABAJO.

Los 0.5 g del extracto seco restante se disolvieron en 2.5 mL de DMSO (El DMSO se utilizó para tener una disolución total del extracto y un manejo óptimo de las micropipetas) y se llevó a un aforo de 10 mL con SSFE obteniéndose la solución de trabajo a una concentración de:

$$\frac{500 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} = \frac{50 \text{ mg}}{1 \text{ mL}} \times \frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} = 50\,000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

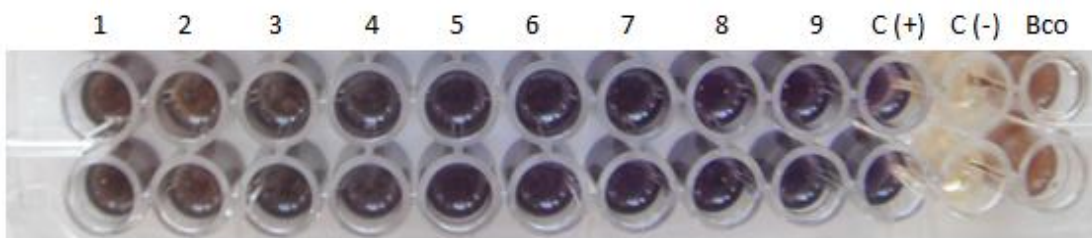
La concentración de la solución de trabajo fue de 50 000 $\mu\text{g/mL}$, comparando esta concentración con la reportada en Mandalari G., et al en 2007 fue mucho mayor, ya que la concentración reportada es de 200 a 800 $\mu\text{g/mL}$, pero el extracto fue expuesto a la enzima pectinasa 62L que convirtió los glucósidos flavonoides de bergamota en sus agliconas, y este tratamiento dio lugar a una mayor actividad antimicrobiana de los flavonoides (Mandalari G., et al en 2007) , en esta evaluación se llevaron las concentraciones al doble, al triple, pero no inhibieron a ninguna bacteria, hasta que llegamos a la concentración de 50 000 $\mu\text{g/mL}$.

6.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO DE *Citrus bergamia*, SOBRE LAS BACTERIAS IDENTIFICADAS.

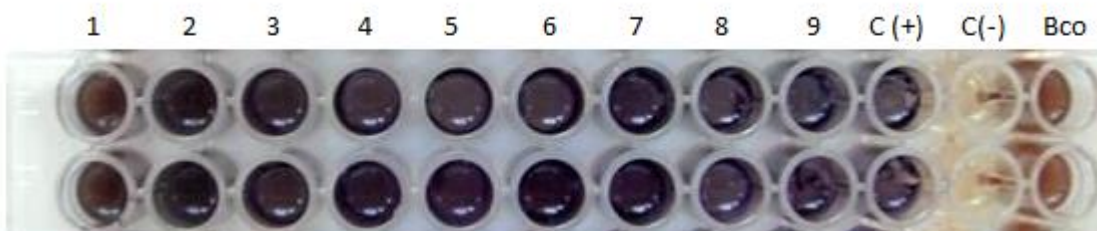
La técnica de MTT nos permitió conocer la Concentración Mínima Inhibitoria de las 10 bacterias identificadas. (Tabla 5, 6 y 7)

La lectura de la Concentración Mínima inhibitoria se realizó de manera visual obteniendo resultados semicuantitativos (de acuerdo a Murillo Alejandra en 2009), mostrados a continuación

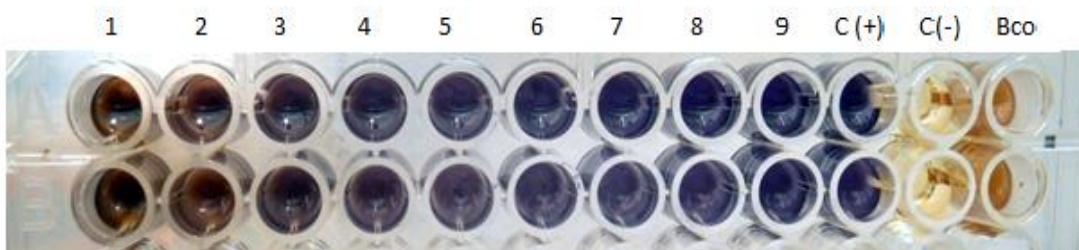
MICROPLACAS DE LAS BACTERIAS EVALUADAS.



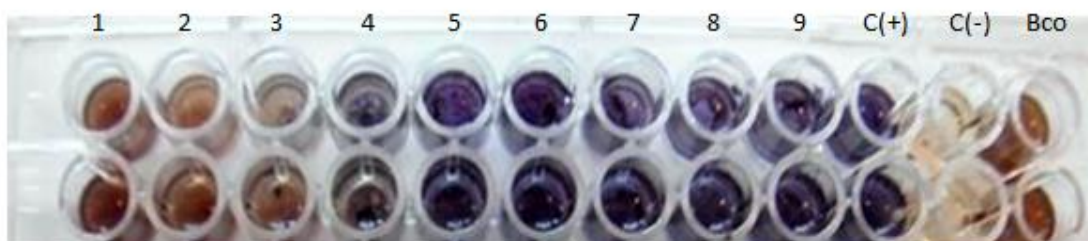
A



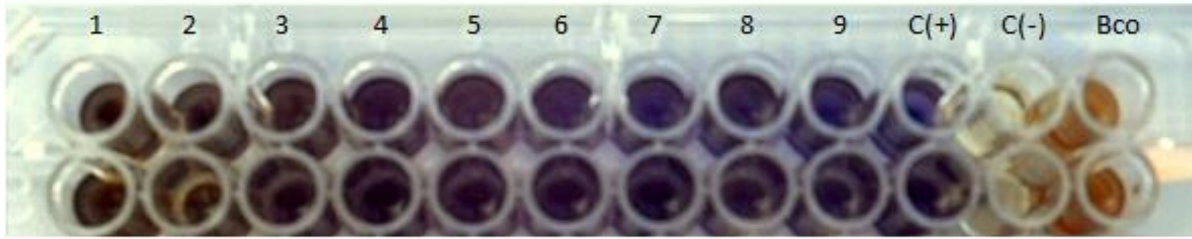
B



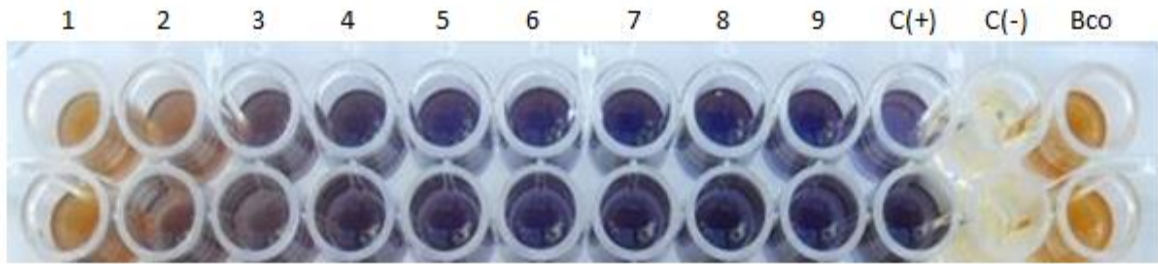
C



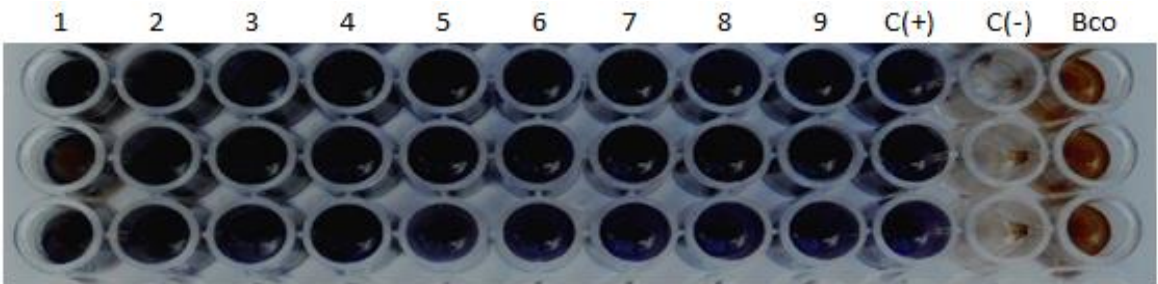
D



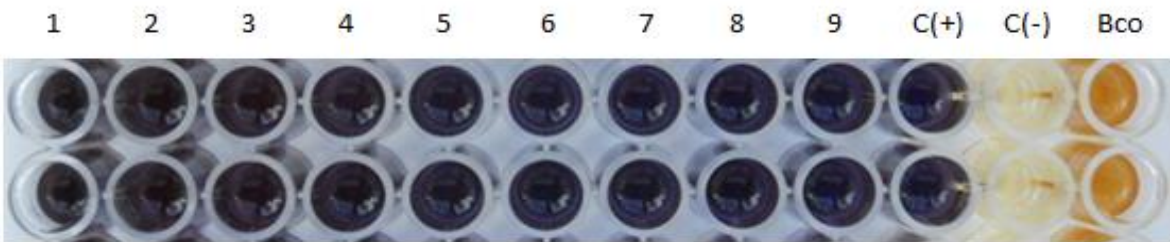
E



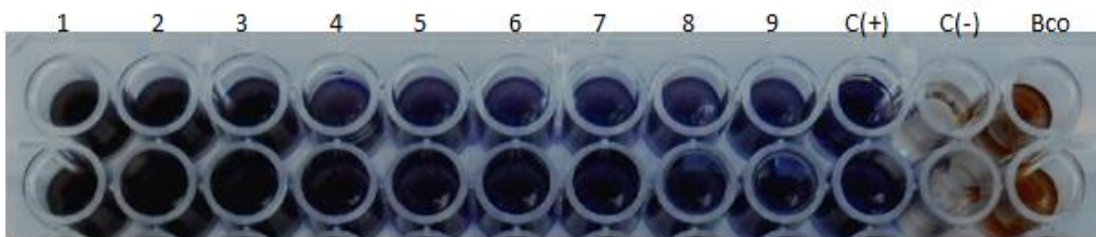
F



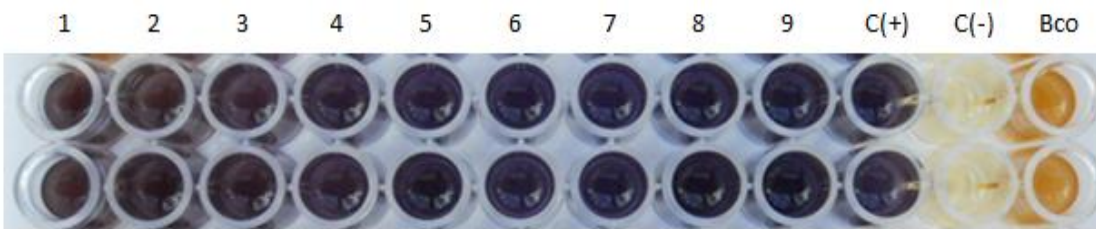
G



H



I



J

Imagen (18) Ensayo de la técnica de doble dilución en microplaca con el extracto de *Citrus bergamia*. A) *Staphylococcus epidermidis*, B) *Staphylococcus aureus*, C) *Streptococcus pyogenes*, D) *Bacillus subtilis*, E) *Propionibacterium acnes*, F) *Escherichia coli*, G) *Proteus mirabilis*, H) *Enterobacter aerogenes*, I) *Pseudomonas aeruginosa* y J) *Klebsiella pneumoniae*.

El ensayo de dilución en microplaca consiste en colocar en el primer pozo la solución stock que fue de 50 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y a partir de ahí se realizaron diluciones dobles.

Para poder evidenciar los resultados obtenidos por la dilución en microplaca donde solo 6 mostraron sensibilidad, también se empleó el método de Mosmann, este nos permitió comprobar si el extracto de *Citrus bergamía* inhibió el crecimiento bacteriano.

Al realizar las lecturas espectrofotométricas de las microplacas, observamos que en los primeros pozos no existe cambio una vez agregado el MTT, esto nos indica que no hay bacterias viables, y que existe una inhibición causado por el extracto, pero las lecturas no pudieron tomarse adecuadamente ya que el extracto tiene una concentración muy elevada y un color café intenso, lo cual interfiere en las lecturas dándonos absorbancias mayores o iguales que el control positivo.

Posteriormente se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) con dicho ensayo colorimétrico semicuantitativo (Murillo, 2009), cuyo fundamento se basa en la apertura del anillo de la sal de tetrazoilo (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 formazan que es una sal insoluble en agua de color azul-violeta. Donde el color es directamente proporcional a la proliferación celular. (Madigan, 2004)

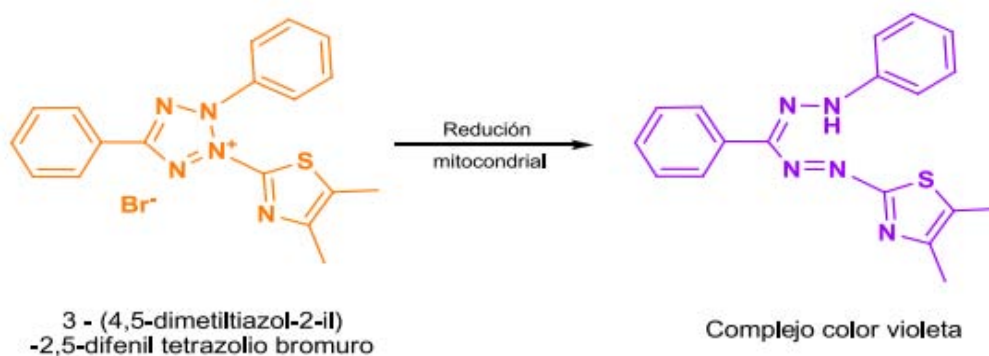



Imagen 19. Proceso de reducción del MTT (Banks, 09)

Con este ensayo se pudieron analizar los datos y se obtuvieron las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI's) de las bacterias utilizadas, las cuales fueron para *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Propionibacterium acnes* y *Escherichia coli* de 25 000 µg/mL; *Staphylococcus aureus* de 50 000 µg/mL y *Bacillus subtilis* de 12 500 µg/mL. (Tabla 5).

Las bacterias sensibles a este extracto fueron las 5 Gram positivas que utilizamos las cuales fueron *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*; y solo 1 Gram negativa la cual fue *Escherichia coli*.

Una vez realizado el ensayo en microplaca y antes de colocar el MTT se realizó el ensayo bactericida/bacteriostático, en una caja petri con agar BHI se dividió en 12 y en cada división se sembró cada uno de los pozos de la microplaca.

Tabla 6. Ejemplificación de la Concentración Mínima Inhibitoria en una microplaca.

Nótese que la + señala que hubo crecimiento, el – representa que hubo inhibición y nos  indica la Concentración Mínima Inhibitoria de cada bacteria.

Bacterias	µg/ mL											
	50 000	25 000	12 500	6250	3125	1562.5	781.25	390.62	195.31	Control (+)	Control (-)	Blanco
<i>Staphylococcus epidermidis.</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Tabla 7. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto de Citrus bergamia.

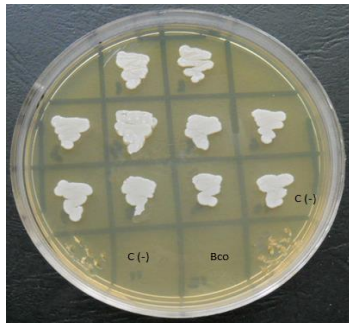
Clasificación	Bacterias	CMI µg/ mL
Bacterias Gram (+)	<i>Staphylococcus epidermidis.</i>	25 000
	<i>Staphylococcus aureus</i>	50 000
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	25 000
	<i>Bacillus subtilis</i>	12 500
	<i>Propionibacterium acnes</i>	25 000
Bacterias gram (-)	<i>Escherichia coli</i>	25 000
	<i>Proteus mirabilis</i>	Sin efecto
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Sin efecto
	<i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	Sin efecto
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sin efecto

6.5 EFECTO BACTERICIDA/ BACTERIOSTÁTICO DEL EXTRACTO DE *Citrus bergamia*.

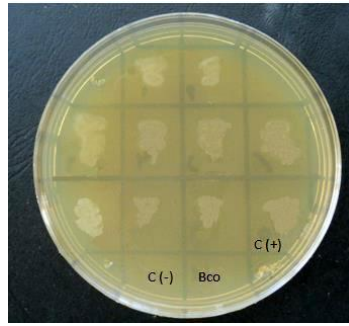
El efecto bactericida es el efecto de un antibiótico, antiséptico o extracto natural que provocan la lisis de las bacterias (Madigan, 2004) (Biología Celular) como en este ensayo fue el caso de *Bacillus subtilis* (D). El efecto es evidente cuando al tomar una asada de el pozo en el que hubo inhibición y sembrarla nuevamente en agar BHI la bacteria no crece, esto nos indica que al estar expuesta con el extracto la bacteria muere.

El efecto bacteriostático es el efecto de un antibiótico, antiséptico o extracto natural de inhibir el crecimiento de una bacteria debido a que inhibe la síntesis de la pared celular, afectan la membrana celular, inhiben la síntesis de proteínas o afectan el metabolismo de los ácidos nucleicos, pero cuando la bacteria se coloca nuevamente en Agar donde ya no está el inhibidor vuelve a crecer, ^(44,46) como fue el caso de *Staphylococcus epidermidis* (A), *Staphylococcus aureus* (B), *Streptococcus pyogenes* (C), *Propionibacterium acnes* (E) y *Escherichia coli* (F).

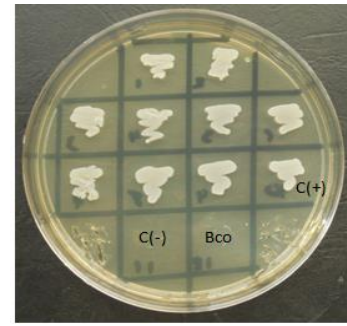
Las bacterias que no mostraron ningún efecto a esta concentración fueron: *Proteus mirabilis* (G), *Enterobacter aerogenes* (H), *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* (J).



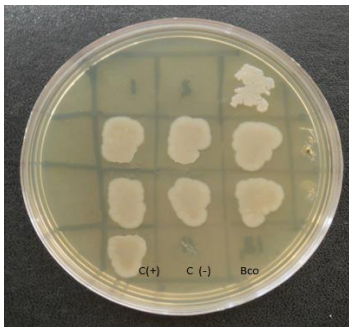
A



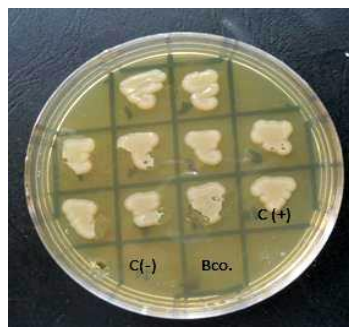
B



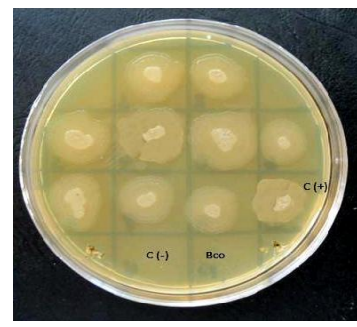
C



D



E



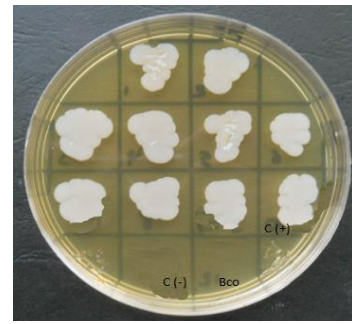
F



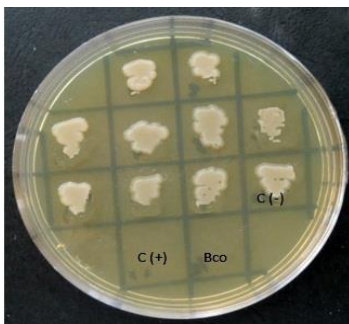
G



H



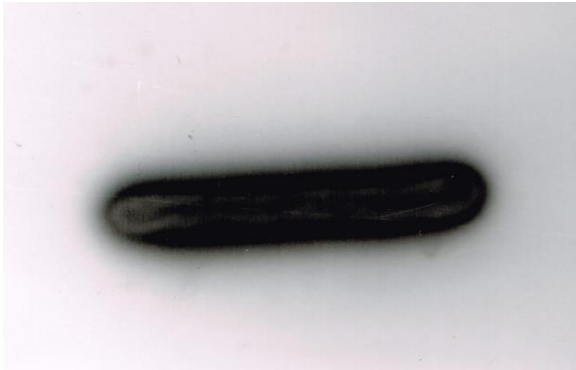
I



J

Imagen 20. Ensayo bactericida / bacteriostático. A) *Staphylococcus epidermidis*, B) *Staphylococcus aureus*, C) *Streptococcus pyogenes*, D) *Bacillus subtilis*, E) *Propionibacterium acnes*, F) *Escherichia coli*, G) *Proteus mirabilis*, H) *Enterobacter aerogenes*, I) *Pseudomona aeruginosa* y J) *Klebsiella pneumoniae*.

6.6 OBSERVACIÓN DEL EFECTO POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.



A



B

Imagen (21) Bacillus Subtilis sin exponer al extracto de Citrus bergamia.



C



D

Imagen (22) Bacillus subtilis expuesta al extracto de Citrus bergamia

Al observar las bacterias tratadas con *Citrus bergamia* detectamos que la población se ve disminuida además de observarse daño en la pared, esto es evidenciado al comparar con la bacteria que no fue expuesta al extracto, la superficie de la membrana del tratado no era tan lisa y presento daño al observarse que el colorante penetró obteniéndose una tinción positiva, con deformación de la estructura bacteriana.

Las observaciones se realizaron a 5000 y 6000 ampliaciones. En la bacteria que no fue tratada con el extracto, la cual nos sirvió como control, se observan bordes definidos y se logra ver el septo asimétrico que nos indica que se está llevando a cabo el proceso de esporulación además de observarse los bordes de la bacteria *Bacillus subtilis* bien definidos.

Lo que se ve dentro de la bacteria en color oscuro es debido a la subtilina y otras enzimas se encuentran a su máxima potencia para el proceso de esporulación. (Imagen A)

Mientras que las muestras tratadas con el extracto de *Citrus bergamia* se observan con irregularidades en su tamaño y forma, además del estallamiento de la bacteria.

El extracto de *Citrus bergamia* mostró efecto en todas las bacterias Gram positivas probada y solo en *Escherichia coli*, (bacteria Gram negativa), pero este efecto se obtuvo a concentraciones de 12 500 a 50 000 $\mu\text{g/mL}$ por lo que un posible tratamiento con este extracto en heridas sería muy alto.

7. CONCLUSIONES

- Se obtuvo un extracto seco de *Citrus bergamia* y se realizaron ensayos a diferentes concentraciones llegando a una concentración de trabajo de 50 000 µg/mL ya que a esta concentración se obtuvo inhibición.
- Se realizaron pruebas bioquímicas primarias y secundarias para lograr la identificación bacteriana.
- Se determinó el efecto inhibitorio y las CMI's del extracto de Citrus bergamia en 10 bacterias comúnmente asociadas a heridas, utilizando el método de Mossman en el cual se obtuvo que las 5 bacterias gram (+) y una Gram (-) (*Escherichia coli*) presentaron sensibilidad al extracto.
- En Microscopía Electrónica de Transmisión la cual se realizó a *Bacillus subtilis* se observó daño en la pared celular.

8. *PERSPECTIVAS*

- ▣ Considerar utilizar la enzima pectidasa 62L para evidenciar si el efecto del extracto incrementa la actividad.
- ▣ Realizar pruebas de identificación de componentes.
- ▣ Realizar pruebas para checar su tiempo de vida media.

9. APÉNDICE 1

9.1 MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS.

Medios de cultivo en placa:

- ▣ Agar Sangre
- ▣ Agar Sales Manitol
- ▣ Agar Mac Conkey
- ▣ Agar BHI (Inducción Cerebro Corazón)
- ▣ Agar Cetrimida
- ▣ Agar EMB (Eosina azul de Mertileno)

Medios de cultivo en tubo:

- ▣ Medio SIM
- ▣ Medio MIO
- ▣ Medio Citratos
- ▣ Medio TSI
- ▣ Caldo Urea
- ▣ Caldo Nitratos
- ▣ Caldo MR-VP
- ▣ Caldo BHI doble concentración
- ▣ Medio BHI para conservación

Reactivos:

- ▣ Aceite de inmersión
- ▣ Etanol al 70%
- ▣ Agua destilada
- ▣ Cloruro de sodio

- ▣ Solución salina fisiológica estéril
- ▣ Dimetil sulfoxido DMSO
- ▣ 3- (4,5-DIMETILTIAZOL-2-il) -2,5-dimetiltetrazolio bromuro (MTT)
- ▣ Rojo de Metilo
- ▣ Alfa naftol 5%
- ▣ Hidroxido de potasio 40%
- ▣ Reactivo de Ehrlich o Kovac's
- ▣ Alfa naftilamina
- ▣ Ácido sulfanilico
- ▣ Zinc metálico
- ▣ Cristal violeta
- ▣ Lugol
- ▣ Alcohol-acetona
- ▣ Safranina
- ▣ Peróxido de Hidrógeno

MATERIAL

- ▣ Vaso de precipitados de 50, 100,250, 500 y 1000 mL
- ▣ Probeta graduada de 100, 250 y 500 mL
- ▣ Matraz Erlenmeyer 250, 500 y 1000 mL
- ▣ Matraz aforado de 10, 50 y 100 mL
- ▣ Varilla de vidrio
- ▣ Cajas Petri desechables y estériles.
- ▣ Tubos de vidrio con tapón de rosca
- ▣ Pipetas graduadas 1, 2, 5 y 10 mL
- ▣ Micropipeta de 5 μ L y 100 μ L

- ▣ Puntas para micropipetas estériles
- ▣ Termómetro
- ▣ Frasco ambar de 20 mL
- ▣ Mechero bunsen
- ▣ Soporte universal
- ▣ Portaobjetos
- ▣ Microplacas de 96 pozos estériles
- ▣ Filtro de bala
- ▣ Manguera de latex
- ▣ Espátula
- ▣ Gradilla
- ▣ Asas bacteriológicas
- ▣ Papel filtro
- ▣ Membrana millipore de 0.45 μm

EQUIPO

- ▣ Autoclave
- ▣ Estufa bacteriológica
- ▣ Balanza Granataria
- ▣ Balanza analítica
- ▣ Agitador vortex
- ▣ Parrilla con agitadores
- ▣ Centrifuga
- ▣ Bomba de vacío
- ▣ Horno Pasteur
- ▣ Microscopio óptico Olympus

Microscopio Electrónico de Transmisión

Campana de flujo laminar

9.2 Preparación de Medios de Cultivo

1. Agar Mac Conkey

Fórmula para 1000 mL de agua destilada

Peptona de caseína	1.500 g
Peptona de gelatina	17.000 g
Peptona de carne	1.500 g
Lactosa	10.000 g
Sales biliares	1.500 g
Agar	13.500 g
Rojo Neutro	3.030 g
Cristal violeta	0.001 g

pH final 7.1 +/- 0.2

Método de Preparación:

Disolver 50 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Mezclar bien hasta que se obtenga una suspensión uniforme. Dejar reposar de 10 a 15 minutos. Calentar suavemente agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121° C /15 libras/ 15 minutos.

2. Agar Infusión de cerebro y corazón

Fórmula para 1000 mL de agua destilada

Infusión de cerebro de ternera	200.0 g
Infusión de corazón de res	250.0
Peptona de gelatina	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato disódico	2.5 g
Dextrosa	2.0 g

pH final 7.1 +/- 0.2

Método de Preparación:

Disolver 37 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Para cultivos de sangre agregar de 0.5 a 1.0 gr de agar por litro de medio hidratado y hervir durante un minuto. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121° C /15 libras / 15 minutos.

3. Agar Eosina-Azul de metileno

Fórmula para 1000 mL de agua destilada

Peptona de caseína	10.0 g
Lactosa	5.0 g
Sacarosa	5.0 g
Fosfato dipotásico	2.0 g
Eosina	0.4 g
Azul de metileno	0.065 g
Agar-Agar	13.5 g

pH del medio listo para usarse a 37°C 7.1 +/- 0.1

Método de Preparación:

Disolver 36 g del medio deshidratado en un litro de agua recién destilada o desmineralizada dejar remojar durante 15 minutos. Hervir a baño de vapor hasta la completa dilución. Esterilizar en autoclave a 121° C /15 libras /15 minutos.

4. Agar Sales Manitol

Fórmula para 1000 mL de agua destilada

■ Extracto de carne	1.0 g
■ Peptona especial	10.0 g
■ Cloruro de Sodio	75.0 g
■ D (-) Manitol	10.0 g
■ Rojo de Fenol	0.025 g
■ Agar-Agar	12.0 g

pH del medio listo para usarse a 37°C 7.4 +/- 0.1

Método de Preparación:

Disolver el contenido de un sobre en un litro de agua destilada o desioniza. Dejar remojar durante 15 minutos. Hervir a baño de vapor hasta la completa dilución. Esterilizar en autoclave a 121° C /15 libras /15 minutos. Vaciar en agitación continua.

5. Base de Agar Sangre

Fórmula para 1000 mL de agua destilada

■ Agar	15.0 g
■ Cloruro de Sodio	5.0 g
■ Infusión de Músculo Cardíaco	10.0 g
■ Peptona	10.0 g

pH 7.3 +/- 0.2

Método de Preparación:

Rehidratar 40 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante un minuto hasta disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121° C /15 libras /15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45 °C y agregar del 5 al 10 % de sangre de carnero o conejo estéril desfibrinada girando suavemente el matraz para evitar la formación de burbujas homogenizar y vaciar en cajas Petri estériles.

10. APÉNDICE 2 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Tabla 8. Identificación de bacterias Gram (+) ⁽⁴⁵⁾

Bacteria	Prueba	Resultado
<i>Staphylococcus epidermidis.</i>	Gram	Cocos G (+) en racimos.
	Catalasa	+
	Oxidasa	-
	Coagulasa	-
	Manitol	-
	Novobiocina	Resistente
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram	Cocos G (+) en racimos.
	Catalasa	+
	Oxidasa	-
	Coagulasa	+
	Manitol	+
	Hemolisis	β
	Novobiocina	Sensible
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Gram	Cocos G (+) en cadenas
	Catalasa	-
	Hemolisis	β
	Bacitracina	Sensible

Tabla 9. Continuación de tabla de identificación de bacterias Gram (+) ⁽⁴⁵⁾

Nota* En *Bacillus subtilis* no se realizaron pruebas bioquímicas debido a que no contábamos con los medios necesarios.

Bacteria	Prueba	Resultado		
<i>Bacillus subtilis</i> *	Gram	Bacilos G (+)		
	Catalasa	+		
	Motilidad	+		
<i>Propionibacterium acnés</i>	Gram	Bacilos cortos G (+)		
	Catalasa	+		
	Gelatina	+		
	MIO	Motilidad	-	
		Descarboxilación de la Ornitina	-	
	Carbohidratos	Galactosa	+	
		Maltosa	+	
		Xilosa	+	
		Glucosa	+	
		Sacarosa	+	
	Nitratos	+		

Tabla 10. Identificación de Bacterias Gram (-) ⁽⁴⁵⁾

Bacteria	Gram	Motilidad	Catalasa	Oxidasa	Indol	MR	VP	Citratos	Urea	H ₂ S en TSI	Malonatos
<i>Escherichia coli</i>	Bacilos Gram (-)	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	Bacilos Gram (-)	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Bacilos Gram (-)	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	Bacilos Gram (-)	+	+	+	-	-	-	+	-	-	NR
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacilos Gram (-)	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+

NR= No se realizó

11. APÉNDICE EVALUACIONES PREVIAS DEL EXTRACTO DE *Citrus bergamia*.

El rendimiento obtenido del extracto seco fue de 1.9 g por 3 litros donados por extractos sigma, de estos se tomaron 0.8 g y se llevaron a un aforo de 50 ml de Solución Salina Fisiológica Estéril y 2.5 mL de DMSO, logrando una concentración de 16 000 µg/mL de la solución madre, a esta concentración no hubo inhibición como se muestra en la siguiente imagen*:

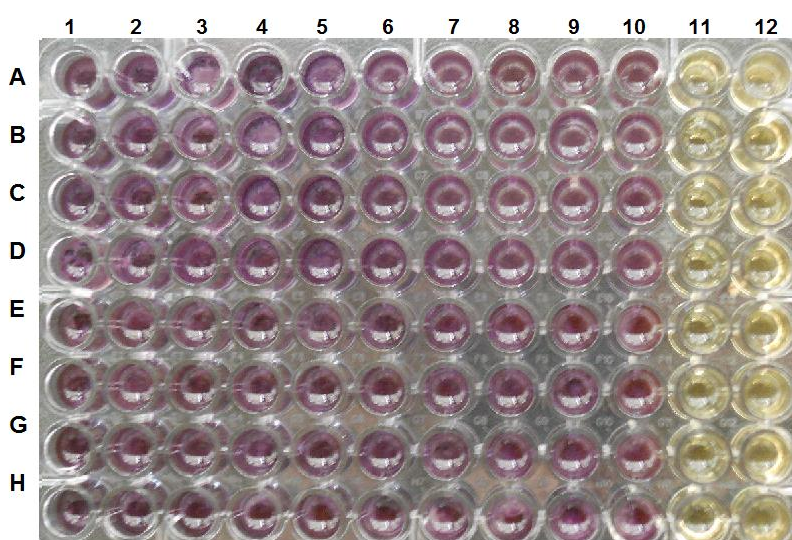
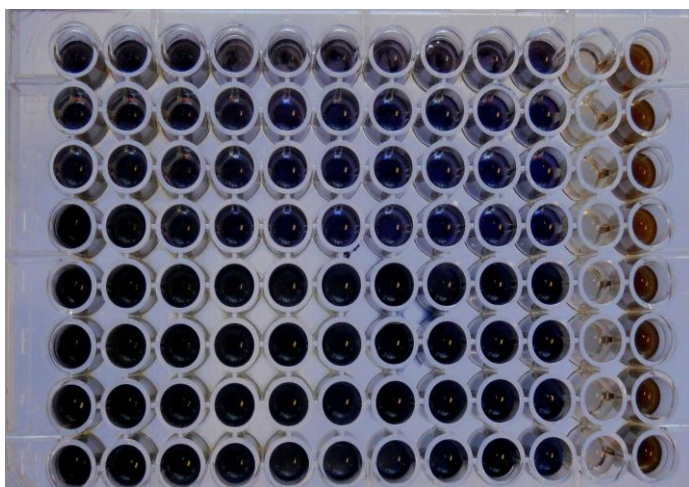


Imagen 23. Ensayo de la técnica de doble dilución en microplaca con el extracto de *Citrus bergamia*. A) *Bacillus subtilis*, B) *Staphylococcus aureus*, C) *Streptococcus pyogenes*, D) *Enterobacter aerogenes*, E) *Propionibacterium acnes*, F) *Escherichia coli*, G) *Proteus mirabilis* y H) *Staphylococcus epidermidis*.

*Nota: En esta imagen solo se utilizó 1 cepa de las bacterias mencionadas.

Pozo	Concentración µg/mL
1	16 000
2	8 000
3	4 000
4	2 000
5	1 000
6	500
7	250
8	125
9	62.5
10	Control +
11	Control -
12	Blanco

Al no mostrar inhibición en las bacterias evaluadas decidimos concentrar más el extracto tomando 0.8 g y lo llevamos a un aforo de 25 mL con SSFE y DMSO, llegando a una concentración de la solución madre de 32 000 µg/mL, al enfrentar las bacterias con el extracto de *Citrus bergamia* con el método de doble dilución en microplaca no hubo ninguna inhibición.



Pozo	Concentración µg/mL
1	32 000
2	16 000
3	8 000
4	4 000
5	2 000
6	1 000
7	500
8	250
9	125
10	Control +
11	Control -
12	Blanco

Imagen 24. Ensayo de la técnica de doble dilución en microplaca con el extracto de *Citrus bergamia*. A) *Bacillus subtilis*, B) *Staphylococcus aureus*, C) *Streptococcus pyogenes*, D) *Enterobacter aerogenes*, E) *Propionibacterium acnes*, F) *Escherichia coli*, G) *Proteus mirabilis* y H) *Staphylococcus epidermidis*.

*Nota: En esta imagen solo se utilizó 1 cepa de las bacterias mencionadas, utilizando una concentración más elevada.

12. REFERENCIAS

Bibliográficas:

- Azotla, J. E. (2000). *Tesis de Licenciatura QFB: Estudio retrospectivo de la incidencia Microbiana en heridas*. Estado de México Cuautitlán Izcalli.: UNAM FES-C.
- Baileys, & Baileys, S. (1989). *Diagnóstico Microbiológico*. España: Panamericana.
- Bautista, C. (2000). Evaluacion del Bioensayo de MTT para determinar la proliferacion in vitro de linocitos de bovino frescos y congelados. *Veterinaria México*, 101 - 106.
- Conyer, R. (1999). *Infecciones Nosocomiales*. Cuernavaca: Salud Pública.
- Cotran, R., Kumar, V., & Collins, T. (2000). *Patología Estructural y Funcional*. Madrid: McGraw Hill Interamericana.
- Cruz, G., Sainz, J., & Segura, P. (1994). *Manual de Bacteriología Clínica*. Edo de México: UNAM-FESC.
- Cuevas, J., & Gallegos, B. (2012). *Tesis de Licenciatura QFB: Manual de Bacteriología Diagnostica*. Edo. de México Cuautitlán Izcalli: UNAM.FESC.
- Evans, W. (1991). *Farmacognosia Trease - Evans*. México: Interamericana.
- Flores, J., Armijo, J., & Mediavilla, Á. (2003). *Farmacología Humana*. España: Masson.
- Garrity, G. e. (2001). *Bergey's Manula of systematic Bacteriology* . Estados Unidos: Springer.
- Gerlier, D., & Thomasset, N. (1986). "Use off MTT colorimetric assay measure cell activation". *Journal of Inmunology methods*", 57-63.
- González, S., & Hernandez, E. (2003). *Guía de microscopía electrónica*. México: UNAM.
- Hernández, T. (2002). *Tesis de Licenciatura Q.F.B. Manual de Bacteriología Diagnóstica*. Edo. de México Cuautitlán Izcalli: UNAM- FESC.
- Koneman, E. (1999). *Diagnóstico microbiológico*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Madigan, M. M. (2004). *Biología de microorganismos*. Madrid: Prentice Hall.
- Mandalari, G., Benett , R., Bisignano , G., Saija, A., Dugo, G., Lo Curto, R., y otros. (2006). Characterization of flavonoids and pectins from bergamot (Citrus bergamia Risso) peel , a major by-product of the essential oil extraction. *Food Chem*, 8307-8313.

- Mandalari, G., Bisignano, G., Trombetta, D., Saija, A., Faulds, C., Gasson, M., y otros. (2007). Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. *Journal of Applied Microbiology*, 2056-2064.
- Montero, A., Hervás, A., Morera, R., & Ramos, A. (2007). Toxicidad sobre la piel y mucosas: tratamientos de soporte. *Hospital Ramon y Cajal*, 402-407.
- Morales, M. (2002). *Tesis de Licenciatura Q.F.B.: Efecto de *Cálen dula officinalis* en *Pseudomona aeruginosa* evidenciado por microscopia electrónica*. México: UNAM FES-C.
- Murillo, A. (2009). "*Tesis de Licenciatura Q.F.B.: Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de *Styrax benzoin dryander* (Benjui) en 10 bacterias que se asocian a heridas humanas*". México: UNAM FES-C.
- Murray, R., & Rosenthal, S. (2006). *Microbiología Médica*. España: Panamericana.
- Shiva, C. (2007). *Estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento (Tesis Doctoral)*. España: Universidad Autónoma de Barcelona.
- Tortora, G. (2002). *Principios de Anatomía y Fisiología*. México: Médica Panamericana.
- Zarate, M., Diego, Y., Guevara, M., & Smayevsky, J. (2009). Absceso cerebral posquirúrgico causado por *Propionibacterium acnes*. 170-172.

Electrónicas:

- ADAM. (s.f.). Recuperado el 10 de Junio de 2012, de <http://www.ugr.es/~cusaludlaboral/Templates/Tema%203%20-%20Heridas.pdf>
- Alvi olor*. (s.f.). Recuperado el 15 de Junio de 2012, de <http://www.alviolor.com/caucanaficha>.
- Aromas y sabores del mundo*. (s.f.). Recuperado el 10 de Junio de 2012, de http://aromasysaboresdelmundo.com/index.php?route=product/product&product_id=68
- Banks, P. B. (10 de Diciembre de 09). *BioTek*. Recuperado el 2012 de Junio de 15, de <http://www.biotek.com/resources/articles/quontification-cell-viability-epoch.html>
- Biología Celular*. (s.f.). Recuperado el 31 de Mayo de 2012, de <http://pamelon3.blogspot.mx/2010/11/tema-desmosomas.html>
- Biología Médica*. (14 de Septiembre de 2010). Recuperado el 18 de junio de 2012, de <http://biologiamedica.blogspot.mx/2010/09/bacterias-gram-positivas-y-gram.html>
- Caride, O. C. (23 de Noviembre de 2009). *Slideshare*. Recuperado el 8 de Junio de 2012, de <http://www.slideshare.net/Olgacabaleiro/heridas-primeros-auxilios>

- Dagnino, U., & Ramírez, A. (2006). *Revistas electrónicas UACH*. Recuperado el 11 de junio de 2012, de http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?pid=S0718-28642006000100017&script=sci_arttext
- femeninas.com*. (s.f.). Recuperado el 30 de Mayo de 2012, de <http://www.vibracionalterapias.net/vademecums/vademecum>
- González, J. R. (s.f.). *Hipertextos del área de la biología*. Recuperado el 13 de Agosto de 2013, de <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/micro4.htm>
- Organización Muncial de la Salud*. (s.f.). Recuperado el 11 de Junio de 2012, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- Pharma cosmetic*. (s.f.). Recuperado el 23 de Mayo de 2012, de <http://www.pharmacosmetic.es/Glandulas%20sudoripadas.html>
- profesor en linea*. (s.f.). Recuperado el 31 de Mayo de 2012, de <http://www.profesorenlinea.cl/flora/Bergamota.htm>
- Salem, C., Pérez, J. A., Henning, E., Uherek, F., & Schultz, C. (2000). *Minga online*. Recuperado el 8 de Junio de 2012, de <http://mingaonline.uach.cl/pdf/cuadcir/v14n1/art15.pdf>
- Salud, S. d. (11 de Noviembre de 2011). *Secretaria de Salud*. Recuperado el 8 de Junio de 2012, de http://www.dged.salud.gob.mx/contenidos/dess/descargas/NOSOCOM_EXT.pdf
- Slideshare*. (s.f.). Recuperado el 10 de Junio de 2012, de http://www.slideshare.net/analucia_romero/heridas-7960266
- Sott.net*. (s.f.). Recuperado el 30 de Mayo de 2012, de <http://es.sott.net/article/4995-DMSO-solucion-milagrosa-y-un-antidoto-para-el-envenenamiento-por-radiacion>
- The Nebraska Medical Center*. (s.f.). Recuperado el 30 de Mayo de 2012, de <http://www.nebraskamed.com/health-library/234174/anatom%C3%ADa-de-la-piel>
- Villa, A. A. (Abril de 2004). Recuperado el 12 de Junio de 2012, de <http://www.bdigital.unal.edu.co/1173/1/angelaandregonzalezvilla.2004.pdf>