



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
DEL EXTRACTO DE *Eucalyptus globulus* CON *Bacillus*
cereus, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*,
Escherichia coli y *Candida albicans* TODAS ESTAS DE
IMPORTANCIA MÉDICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

GABRIELA AGUSTINA RAMÍREZ ZUÑIGA

ASESORES: MVZ. GERARDO CRUZ JIMENEZ.
MVZ. JOSE ANTONIO LICEA VEGA.
M. en C. SOFIA GONZALEZ GALLARDO.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios por todo lo que me has dado y por acompañarme en todo momento de mi vida.

A mis padres (Conchita y Tito) por todo su amor, consejos y regaños por que me han ayudado para crecer como persona y sobre todo para la realización de este trabajo.

A mis hermanitos Dania, Ale y José por todo su cariño que he recibido de su parte, los quiero mucho.

A mis sobrinos Omar, Tania y a mí cuñado Omar por hacer que el tiempo que pasamos juntos sea muy grato, por todo el cariño recibido, los quiero.

A todos mis amigos, no menciono nombres para no omitir alguno, sin embargo ustedes saben quienes son por que han estado conmigo apoyándome en las etapas diferentes de mi vida. Los quiero mucho y gracias por hacerme pasar momentos inolvidables.

Al profesor Gerardo Cruz Jiménez por su apoyo y amistad.

A la máxima casa de estudios UNAM por darme el privilegio de formar parte de esta institución.

**INDICE GENERAL**

Índice general	I
Índice de figuras	III
Índice de tablas	IV
Índice de gráficas	IV
Índice de abreviaturas	V
Resumen	
1. Introducción	01
1.1 Origen de los antibióticos	01
1.2 Definición y características de un antibiótico	02
1.3 Clasificación y mecanismo de acción de los antibióticos	03
1.3.1 Efecto bactericida y/o bacteriostático	03
1.3.2 Efecto producido por el antibiótico a nivel estructural en la bacteria	04
1.4 Concepto de resistencia bacteriana	07
1.4.1 Antecedentes de resistencia bacteriana	07
1.4.2 Resistencia bacteriana	09
1.4.3 Tipos de resistencia	10
1.4.4 Mecanismos de resistencia	11
1.4.5 Criterios y sugerencias para elegir antibióticos	16
1.5 Concepto de infección nosocomial	18
1.5.1 Factores de transmisión de enfermedades nosocomiales	18
1.5.2 Concepto de infección comunitaria	21
1.6 Bacterias de importancia médica	21
1.6.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	21
1.6.2 <i>Salmonella typhi</i>	23
1.6.3 <i>Candida albicans</i>	25
1.6.4 <i>Escherichia coli</i>	28
1.6.5 <i>Bacillus cereus</i>	29
1.7 Antecedentes de los extractos naturales	32
1.7.1 Eucalipto	36
1.7.2 Nombre científico	36
1.7.3 Nombres populares	36
1.7.4 Historia del eucalipto	36
1.7.5 Descripción botánica	37
1.7.6 Hábitat	38
1.7.7 Parte utilizada	39
1.7.8 Composición química	39
1.7.9 Acciones farmacológicas	40
1.7.10 Actividad antimicrobiana	41



1.7.11	Actividad hipoglucemiante.....	42
1.7.12	Efectos adversos y/o tóxicos.....	42
1.7.13	Contraindicaciones.....	43
1.7.14	Interacciones medicamentosas.....	44
1.7.15	Preparados, vías de administración y dosis.....	44
1.8	Justificación.....	46
2.	Hipótesis.....	47
3.	Objetivo general.....	47
3.1	Objetivos particulares.....	48
4.	Material.....	49
4.1	Cepas bacterianas utilizadas.....	49
4.2	Extracto a evaluar.....	49
4.3	Equipo de laboratorio.....	49
4.4	Material general de laboratorio.....	50
5.	Metodología.....	51
5.1	Obtención de cristales.....	51
5.2	Preparación de la solución problema.....	52
5.3	Identificación de cepas bacterianas.....	52
5.4	Preparación de inóculos bacterianos para el ensayo.....	53
5.5	Ensayo en microplaca.....	53
5.6	Efecto bactericida/bacteriostático.....	55
5.7	Método cualitativo de Mosmann (MTT).....	55
5.8	Microscopía electrónica de transmisión.....	56
5.8.1	Preparación de las bacterias.....	56
5.8.2	Preparación de rejillas con membrana fomvar.....	57
5.8.3	Técnica de tinción negativa.....	58
6.	Resultados.....	59
6.1	Obtención de cristales de <i>Eucalyptus globulus</i>	59
6.2	Efecto antibacterial de la solución problema.....	59
6.3	Evaluación del efecto bactericida/bacteriostático de <i>E. globulus</i> en las bacterias.....	60
6.4	Evaluación del efecto inhibitorio del extracto sobre las bacterias.....	62
6.5	Efecto del extracto de <i>E. globulus</i> con <i>Escherichia coli</i>	64
6.6	Efecto del extracto de <i>E. globulus</i> con <i>Bacillus cereus</i>	66
6.7	Efecto de l extracto de <i>E. globulus</i> con <i>Staphylococcus aureus</i>	68
6.8	Observaciones obtenidas en microscopio electrónico.....	70
7.	Discusión de resultados.....	72
8.	Conclusiones.....	78
9.	Apéndices.....	79



9.1	Composición y preparación de medios de cultivo.....	79
9.2	Preparación de reactivos.....	81
9.3	Características morfológicas y bioquímicas de las bacterias.....	82
9.4	Hoja técnica del extracto de Eucalipto	88
10.	Referencias.....	89

INDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Mecanismo de acción de los diferentes antibióticos.....	06
Figura 2:	Resistencia adquirida a través de un plásmido.....	11
Figura 3:	Modificación de permeabilidad en la membrana bacteriana.....	12
Figura 4:	Modificación genética de la proteína fijadora de penicilina.....	14
Figura 5:	Modificación del RNA ribosomal.....	15
Figura 6:	Sobreproducción de bombas de flujo bacteriano.....	16
Figura 7:	Imagen de <i>Eucalyptus globulus</i>	38
Figura 8:	Imagen de la estructura química del 1,8 cineol (eucaliptol).....	40
Figura 9:	Ejemplo de ensayo en microplaca utilizando diferentes concentraciones de <i>E. globulus</i>	54
Figura 10:	Efecto antibacterial de la solución problema.....	59
Figura 11:	Efecto bactericida/bacteriostático de <i>Eucalyptus globulus</i> en <i>Escherichia coli</i>	61
Figura 12:	Efecto bactericida/bacteriostático de <i>Eucalyptus globulus</i> en <i>Bacillus cereus</i>	61
Figura 13:	Ejemplo de ensayo en microplaca con reactivo MTT para establecer el efecto inhibitorio frente a los organismos ensayados.....	62
Figura 14:	Fotografía de <i>Escherichia coli</i> . no tratada con el extracto hidroalcohólico obtenidas con microscopio electrónico.....	70
Figura 15:	Fotografía de <i>Escherichia coli</i> . tratada con el extracto hidroalcohólico obtenidas con microscopio electrónico.....	70
Figura 16:	Fotografía de <i>Bacillus cereus</i> . no tratada con el extracto hidroalcohólico obtenidas con microscopio electrónico.....	71
Figura 17:	Fotografía de <i>Bacillus cereus</i> . tratada con el extracto hidroalcohólico obtenidas con microscopio electrónico.....	71



INDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Clasificación de los antibióticos según su efecto bacteriano.....	03
Tabla 2:	Mecanismos de acción de las principales clases de antibióticos.....	05
Tabla 3:	Patógenos en diferentes sitios de infección en UCI médico quirúrgicos (2003).....	20
Tabla 4:	Compuestos químicos con actividad antimicrobiana obtenidos de las plantas.....	35
Tabla 5:	Efecto bactericida/bacteriostático del extracto hidroalcohólico <i>Eucalyptus globulus</i>	60
Tabla 6:	Resultados cualitativos e inhibición en microplaca con el extracto hidroalcohólico <i>Eucalyptus globulus</i>	63
Tabla 7:	Concentración Mínima Inhibitoria de <i>Eucalyptus globulus</i> con <i>Escherichia coli</i>	64
Tabla 8:	Concentración Mínima Inhibitoria de <i>Eucalyptus globulus</i> con <i>Bacillus cereus</i>	66
Tabla 9:	Concentración Mínima Inhibitoria de <i>Eucalyptus globulus</i> con <i>Staphylococcus aureus</i>	68
Tabla 10:	Pruebas de identificación de <i>Bacillus cereus</i>	83
Tabla 11:	Pruebas de identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	84
Tabla 12:	Pruebas de identificación de <i>Escherichia coli</i>	85
Tabla 13:	Pruebas de identificación de <i>Salmonella typhi</i>	86
Tabla 14:	Pruebas de identificación de <i>Candida albicans</i>	87

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1:	Absorbancia con respecto a la concentración de <i>Eucalyptus globulus</i> con <i>Escherichia coli</i>	65
Gráfica 2:	Absorbancia con respecto a la concentración de <i>Eucalyptus globulus</i> con <i>Bacillus cereus</i>	67
Gráfica 3:	Absorbancia con respecto a la concentración de <i>Eucalyptus globulus</i> con <i>Staphylococcus aureus</i>	69



LISTA DE ABREVIATURAS

OMS	Organización Mundial de la Salud
SSA	Secretaría de Salud
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
BHI	Infusión Cerebro Corazón (Medio de cultivo)
SSF	Solución Salina Fisiológica
AFT	Acido Fosfotúngstico
DMSO	Dimetil Sulfoxido
UCF	Unidad Formadora de Colonias
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol (Sal de Tetrazolium)
MET	Microscopia Electrónica de Transmisión
SAMR	<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino Resistente
RHOVE	Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
DAEC	<i>Escherichia coli</i> adherente difusa
LA	Adherencia Localizada
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
Abs	Absorbancia
rpm	Revoluciones por minuto
h	Hora
µl	Microlitros
ml	Mililitros
g	Gramo
mg	Miligramos
µg	Microgramos
nm	Nanometros
°C	Grado Celsius



RESUMEN

Las infecciones comunitarias y nosocomiales siguen constituyendo hoy en día una de las principales causas de morbilidad a nivel mundial; si bien las vacunas y las condiciones de vida han permitido mejorar la esperanza de vida en muchas regiones del mundo, la gran mayoría de ellas sigue padeciendo de males infecciosos.

Sin duda la aparición de los antibióticos han sido y son una importante arma para el tratamiento de muchas causas infecciosas, algunas de las cuales causaban gran mortalidad, y su uso permitió disminuir en forma importante y notable la morbimortalidad de alguno de estos males, por ello se pensó en forma equivocada que infecciones respiratorias en general y neumonías adquiridas en la comunidad en particular podrían ser controladas. Sin embargo el primer problema que surgió con su uso fue la aparición de reacciones adversas (leves a severas), y posteriormente se ha sumado la aparición cada vez más frecuente de bacterias resistentes y multirresistentes a uno o a varios antibióticos.

Actualmente se ha incrementado el interés del uso de extractos naturales como alternativa complementaria a la profesional para el control de microorganismos patógenos al hombre. El estudio se realizó en la FESC-Campo 1, Unidad de Posgrado. El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus*, a diferentes concentraciones con, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*, utilizando el método de Mosmann (prueba cualitativa) en el cual se utiliza bromuro de 3-(4,5-dimetiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) que determina la presencia de bacterias vivas a partir de su reducción de éste por la acción de una deshidrogenasa producida por las



bacterias, la cantidad de éstas fue determinada por un método espectrofotométrico obteniendo los resultados con un lector de ELISA, los cuales fueron tratados estadísticamente para determinar la MIC. También se utilizó una prueba cualitativa para determinar el efecto bacteriostático y/o bactericida y finalmente se utilizó Microscopía Electrónica de Transmisión para observar el daño causado por el extracto a nivel estructural.

Eucalyptus globulus mostró tener un mayor efecto bactericida para *B. cereus* y *Staphylococcus aureus*, pues para el resto de las cepas el efecto fue principalmente bacteriostático. Además se encontró que la MIC para *B. cereus*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi* se presentó a una concentración del extracto de 3,125 µg/ml; mientras que *E. coli* evidenció una mayor resistencia al extracto al presentar la MIC a una concentración de 6,250 µg/ml. También fue posible determinar gracias al uso del Microscopio Electrónico de Transmisión el efecto producido por el extracto, para *E. coli* el daño se presentó a nivel de la pared celular debido a la formación de un esferoblasto, mientras que para *B. cereus* se muestra que el daño provocado por el extracto también se presentó a nivel de la pared pues se aprecia claramente la inestabilidad, el tamaño y la forma irregular de la bacteria. En este estudio también se observó, la diferencia de sensibilidad frente al extracto entre las cepas Gram positivas y Gram negativas.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Origen de los antibióticos

El empleo de agentes farmacológicos en el tratamiento de infecciones comienza cuando los chinos hace más de 2 500 años, utilizaron la cáscara enmohecida de la soja en el tratamiento de carbuncos, forúnculos e infecciones similares. En el año 1877 *Pasteur y Joubert* reconocen las potencialidades clínicas de los microorganismos como agentes terapéuticos. *Ehrlich* fue el primero en formular los principios de la toxicidad selectiva y en reconocer las relaciones químicas específicas entre los parásitos y los medicamentos, el desarrollo de resistencia a medicamentos en los parásitos y el papel de la terapéutica combinada para combatir dicha resistencia. Los experimentos de *Ehrlich* en la primera década del siglo pasado condujeron al descubrimiento de las arsfenaminas, primer triunfo importante de la quimioterapia planeada.³⁷

La era moderna de la terapéutica antimicrobiana se inicia en 1934 con la descripción de *Dogmak* de la efectividad de la primera sulfonamida en el tratamiento de las infecciones experimentales por estreptococos. La llamada “Edad de Oro” de los antibióticos comienza en 1941 con la producción de penicilina a gran escala y su utilización con buenos resultados en ensayos clínicos. En la actualidad se calcula que aproximadamente el 30 % de todos los pacientes hospitalizados que padecen algún proceso infeccioso, reciben uno o más ciclos de antibiótico-terapia. Sin embargo al mismo tiempo dichos compuestos son utilizados de manera errónea por el médico en su práctica o incluso han sido objeto de abuso.



Un resultado de la automedicación y del mal uso, ha sido la aparición de microorganismos patógenos resistentes a ellos, y esto ha su vez a sido un punto de partida de la necesidad cada vez mayor de contar con nuevos fármacos y/o alternativas.³⁶

1.2 Definición y características de un antibiótico

Los antibióticos son sustancias producidas por diversas especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomecetos) o sintetizados por métodos de laboratorio que suprimen la proliferación de otros microorganismos y pueden eventualmente destruirlos.^{36, 37} Estos compuestos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano.³⁷

Con frecuencia se han utilizado de manera indistinta los términos antibiótico, antimicrobiano y quimioterápico para designar sustancias químicas definidas con actividad contra microorganismos específicos, como ya señalamos, el antibiótico es una sustancia producida en la naturaleza por microorganismos vivos, los sintetizados en el laboratorio y aquellos producidos por los microorganismos que son modificados químicamente (síntesis parcial), por lo que se considera un producto de la evolución y puede conferir una ventaja selectiva a quienes los producen en un ecosistema específico.³⁶

Desde el punto de vista técnico, los antibióticos difieren de los quimioterápicos en que estos últimos son productos de síntesis química, aunque algunos como las sulfonamidas tienen actividad antibacteriana, por lo que se ha propuesto el término Antimicrobiano, para describir a todas las sustancias con esta actividad, ya sean naturales o de origen sintético.^{37, 40}



1.3 Clasificación y mecanismo de acción

Las clasificaciones que más se utilizan son las que se basan en la acción del antibiótico sobre la bacteria, su mecanismo de acción, y según su estructura química.³⁷

1.3.1 Efecto bactericida y/o bacteriostático

- a) **Bacteriostáticos:** aquéllos que inhiben la multiplicación bacteriana, la cual se reanuda una vez que se suspende el tratamiento.
- b) **Bactericidas:** poseen la propiedad de destruir la bacteria, su acción es terapéutica *irreversible*.³⁷ (ver tabla 1)

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos según su efecto bacteriano

<i>Bactericidas</i>	<i>Bacteriostáticos</i>
Penicilinas	Tetraciclinas
Cefalosporinas	Eritromicinas
Aminoglucósidos	Sulfonamida
Rifampicina	Novobiocina
Quinolonas	Cloranfenicol
Monobactámicos	
Polimixinas	

Tomado de (37)



1.3.2 Efecto producido por el antibiótico a nivel estructural en la bacteria

La clasificación que se basa en el mecanismo de acción de los antibióticos, resulta de gran utilidad, sobre todo si hay que utilizar simultáneamente varios agentes. Según su mecanismo de acción, los antibióticos se clasifican de la siguiente manera (ver tabla 2, gráfico 1):^{37,38}

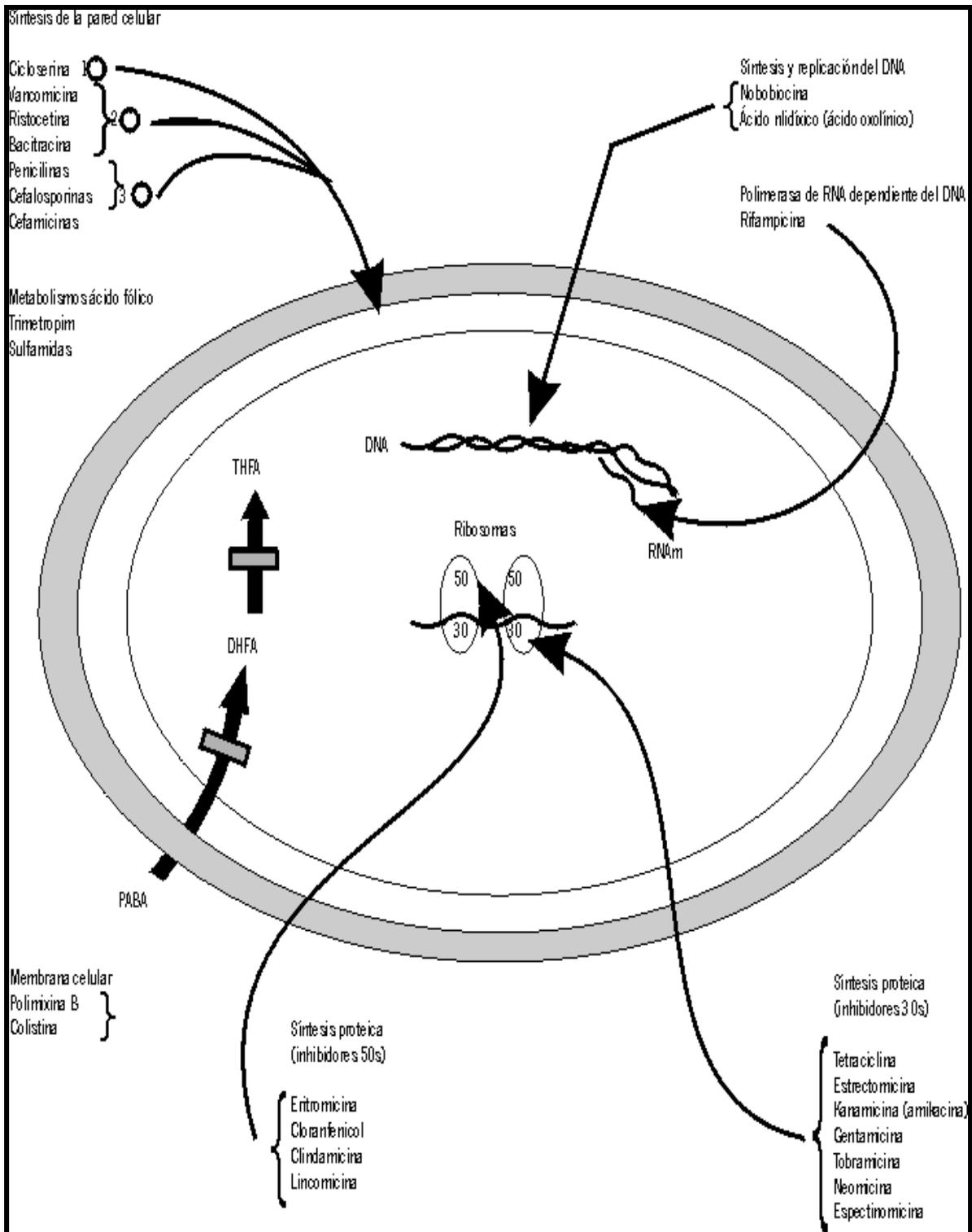
- Antibióticos que inhiben la síntesis de pared celular.
- Antibióticos que ejercen su acción a través de la membrana celular y afectan su permeabilidad.
- Fármacos que inhiben la síntesis proteica (inhibición de la transcripción y traducción del material genético).
- Inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos.
- Análogos a los metabolitos que bloquean fases metabólicas específicas que son esenciales para los microorganismos.

**Tabla 2.** Mecanismos de acción de las principales clases de antibióticos

Antibacteriano	Objetivo celular	Mecanismo de acción
<u>Betalactámicos</u> (penicilina y cefalosporinas)	Pared celular	Inhiben los enlaces en la pared celular. Etapa conocida como reacción de transpeptidación
<u>Vancomicina</u>	Pared celular	Interfiere en la adición de nuevas subunidades de la pared celular (muramyl-pentapéptidos)
<u>Bacitracina</u>	Pared celular	Impide la adición de subunidades de la pared celular inhibiendo el reciclaje del portador de lípido de membrana Se ligan a la subunidad 50 S del ribosoma
<u>Macrólidos</u> (eritromicina)	Síntesis proteica	Se ligan a la subunidad 50 S del ribosoma
<u>Lincosomidas</u> (clindamicina)	Síntesis proteica	Se ligan a la subunidad 50 S del ribosoma
<u>Cloranfenicol</u>	Síntesis proteica	Se ligan a la subunidad 50 S del ribosoma
<u>Tetraciclinas</u>	Síntesis proteica	Se ligan a la subunidad 30 S del ribosoma
<u>Aminoglucósidos</u> (gentamicina)	Síntesis proteica	Se ligan a la subunidad 30S del ribosoma
<u>Sulfamidas y trimetoprima</u>	Metabolismo celular	Inhibe competitivamente a las enzimas implicadas en dos etapas de la biosíntesis de ácido fólico
<u>Rifampicina</u>	Síntesis del DNA	Inhibe la polimerasa de RNA dependiente de DNA
<u>Metronidazol</u>	Síntesis del DNA	Genera intracelularmente productos metabólicos intermedios reactivos por el sistema de transporte electrónico
Quinolonas (ciprofloxacino)	Síntesis del DNA	Inhibición de la girasa de DNA (subunidad A)
Novobiocina	Síntesis del DNA	Inhibición de la girasa de DNA (subunidad B)
<u>Polimixinas</u> (polimixina B)	Membrana celular	Altera la permeabilidad de la membrana por alteración de la carga
<u>Garamicina</u>	Membrana celular	Forma poros

Tomado de (38)

Figura 1. Mecanismo de acción de los diferentes antibióticos



Tomado de (37)



1.4 Concepto de resistencia bacteriana

Se entiende por resistencia, el mecanismo a través del cual, la bacteria puede disminuir o inactivar la acción de los agentes antimicrobianos. Debe tenerse en cuenta que si bien la resistencia microbiana y resistencia clínica (fracaso terapéutico) están íntimamente relacionados, no son la misma cosa: la primera se refiere a la respuesta que desarrollan los patógenos susceptibles a las diferentes concentraciones de antibióticos mientras que la segunda, se refiere a la ineficiencia terapéutica, aun cuando las concentraciones del antimicrobiano sean correctas, las mismas dependen de factores extrabacterianos (selección inadecuada del antibiótico) o del huésped (neutropenia, etc.).³⁷

1.4.1 Antecedentes de resistencia bacteriana

El primer mecanismo de resistencia se reportó en 1940, por Abraham y Chain, quienes aislaron y caracterizaron una enzima de *E. coli* (entonces llamada *Bacterium coli*) que fue capaz de hidrolizar a la penicilina. Los años 50 se caracterizaron por epidemias por *Staphylococcus aureus* resistente a la penicilina, tetraciclinas, estreptomicina y eritromicina en hospitales.⁴¹

Durante ese periodo, bacterias como *Klebsiella sp.*, *Proteus sp.* y *Pseudomonas sp.* fueron resistentes a algunos antimicrobianos y emergieron como la principal causa de infecciones nosocomiales. En la década de los 60, se introducen al mercado las cefalosporinas y las infecciones por *S. aureus* fueron controladas. En 1970, cepas bacterianas de *Shigella sp.* y *N. gonorrhoeae* desarrollaron resistencia. A fines de este periodo y a principios de los 80 se introdujeron los antibióticos de amplio espectro, incluyendo cefalosporinas de tercera generación, carbapenems y quinolonas y con ellos la esperanza de detener la resistencia bacteriana.



Sin embargo, tanto en infecciones nosocomiales como en las adquiridas en la comunidad, la aparición de resistencia a múltiples agentes antimicrobianos ha complicado esta situación.

Staphylococcus aureus meticilino-resistente (SAMR), *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae* y *Mycobacterium tuberculosis* son hoy día algunos de los organismos que se consideran más difíciles de tratar debido a una mayor resistencia.⁴¹

En 1983, el mercado mundial de antibióticos fue de 9 mil millones de dólares y se estimó que podría aumentar hasta 40.5 mil millones de dólares para el año 2000. Sin embargo, para el año 2000 se reportaron 160 millones de prescripciones de antibióticos, lo que correspondió a aproximadamente 25,000 toneladas de antibióticos, de los cuales 50% se utilizó en pacientes y el otro 50% en animales y agricultura.⁴¹

Con una población de 275 millones de habitantes en Estados Unidos, se estimó que se dieron 30 prescripciones de antibióticos por cada 100 personas/año, lo que correspondió a 4.1 kg de antibióticos por 100 personas/año. Ningún otro factor es más importante en el desarrollo de resistencia bacteriana que el uso de antibióticos en hospitales.

Aproximadamente 30% de los pacientes hospitalizados reciben antibióticos y más de 60% son juzgados inapropiados en algún aspecto. Kunin, en el Hospital de la Universidad de Virginia, reportó que en los servicios quirúrgicos el 62% de los antibióticos se daban de manera inapropiada, comparado con un 42% de los servicios médicos.⁴¹



Entre los pacientes hospitalizados en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) y los pacientes quirúrgicos, el porcentaje de uso de antibióticos es mayor. Las dosis de antibióticos frecuentemente son más altas en estas áreas, especialmente cuando se trata de administración parenteral. Se cree que estas altas dosis crean una fuerte presión selectiva para la resistencia. Una revisión de 22 estudios, realizada por Mc Gowan, mostró una fuerte asociación entre el uso y la resistencia bacteriana.

Sin embargo, otros estudios no han logrado demostrar esta asociación. En un estudio de casos y controles realizado en la unidad de cuidados intensivos de la UMAE, Hospital de Especialidades Núm. 25 del IMSS, Monterrey, N.L., no se encontró asociación significativa entre la aparición de sepsis por *Acinetobacter sp.* y el uso de antibióticos.⁴¹

1.4.2 Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana es un problema de salud pública mundial con consecuencias graves de morbi-mortalidad en los hospitales y con pérdidas económicas para las instituciones de salud.¹⁹

La resistencia bacteriana ocurre cuando la bacteria que causa infección no es eliminada por el antibiótico utilizado para detener esa infección. La bacteria sobrevive y continúa multiplicándose y causando daño. Los últimos 50 años han sido marcados por el continuo desarrollo de nuevos antimicrobianos y, a la vez, por el incremento de la resistencia, entre las diferentes cepas bacterianas. Existe una estrecha relación causa-efecto entre las características cambiantes de las infecciones y el uso de antimicrobianos.⁴¹



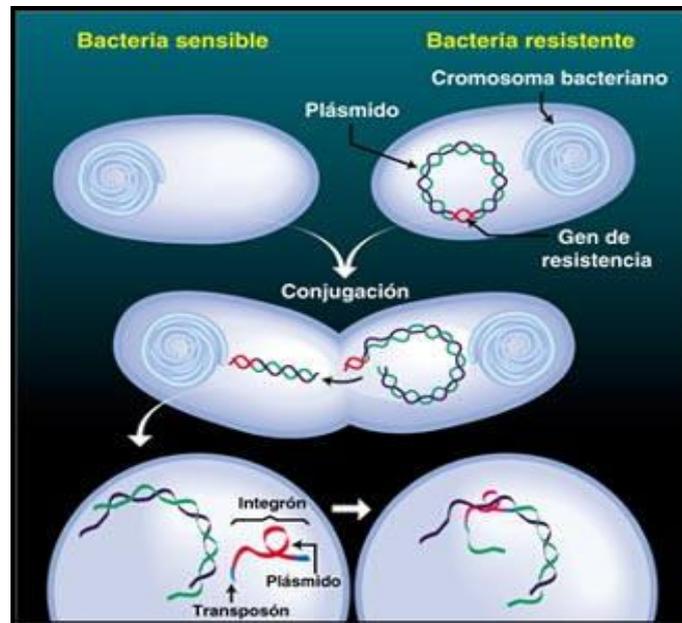
Desde 1934, con el descubrimiento del Prontosil (precursor de las sulfonamidas), ha sido descubierta una variedad de compuestos con actividades particulares. El descubrimiento de nuevas moléculas de antibióticos es lento. Desde 1987, después de las oxazolidinonas, no se conoce ninguna nueva clase de antibióticos, sólo se han realizado modificaciones estructurales a los antibióticos en particular.⁴¹

1.4.3 Tipos de resistencia

La resistencia bacteriana puede ser:

- **Natural:** Cuando es una propiedad específica de algunas bacterias y no tienen contacto con el antibiótico.
- **Adquirida:** Cuando se produce una mutación cromosómica o la bacteria adquiere un plásmido de resistencia, es decir, un fragmento extracromosómico de DNA portador de genes que modifican la resistencia al antibiótico. La información genética presente en algunos plásmidos, es un factor importante en la patogenicidad o la invasividad de las bacterias, en la velocidad de aparición de cepas patógenas o invasivas resistentes a las drogas antimicrobianas y en la evolución del cuadro clínico (ver Figura 2):³⁷

Figura 2. Resistencia adquirida a través de un plásmido



Tomado de (43)

1.4.4 Mecanismos de resistencia

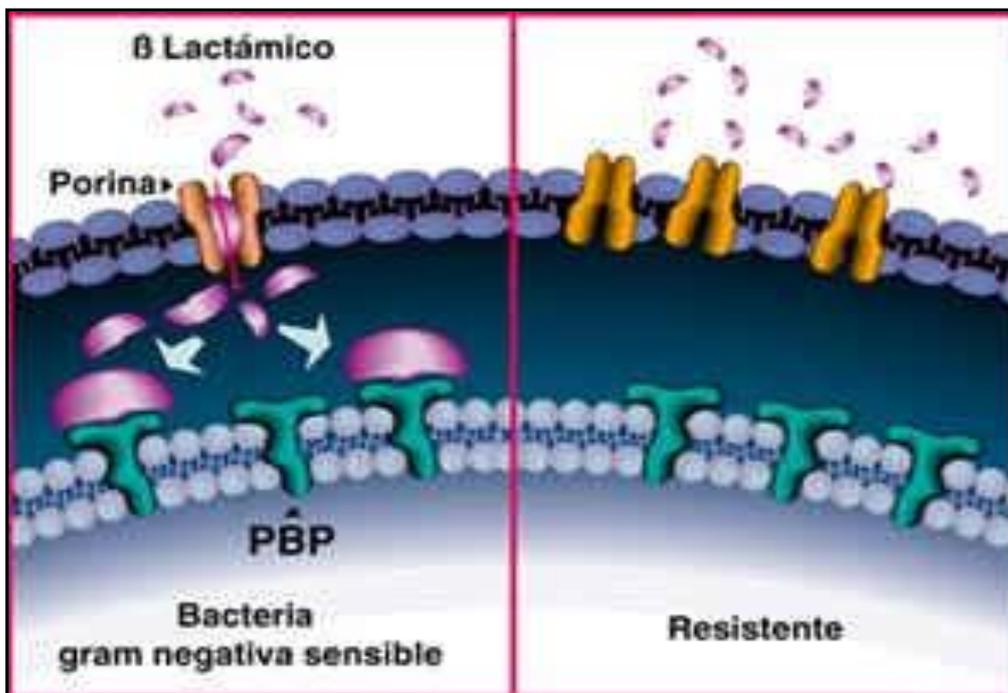
Los mecanismos de resistencia bacteriana pueden clasificarse de la siguiente manera:

- a. **Disminución de la permeabilidad:** Este cambio en la permeabilidad de la bacteria ocurre debido a la modificación de las proteínas de membrana externa “porinas” (OmpF y OmpC).⁴² En estos casos el antibiótico no puede penetrar la superficie bacteriana y alcanzar el núcleo celular, esta es la forma más frecuente de resistencia natural.³⁷ La permeabilidad de la pared celular está determinada por la naturaleza de ésta. En las bacterias grampositivas, la pared usualmente no es una barrera que impide la

penetración de los antibióticos; sin embargo en las gramnegativas, representa una barrera difícil de vencer y que varía según las diferentes especies; así por ejemplo, la pared celular es más permeable en algunas especies de *Neisseria* y *H. influenzae*, que en *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* y *Proteus* indol positivo. *Escherichia coli* y otras bacterias entéricas, tienen una proteína específica (PORINS) que impide la entrada de antibióticos hidrófilos con un peso molecular de hasta 650 daltons.³⁷

Ejemplos de resistencia por disminución de permeabilidad son la resistencia de los bacilos gramnegativos a penicilina G, eritromicina, clindamicina y vancomicina; así como la resistencia de *P. aeruginosa* y otras bacterias anaerobias a los aminoglucósidos (Ver figura 3).³⁷

Figura 3. Modificación de permeabilidad en la membrana bacteriana



Tomado de (43)



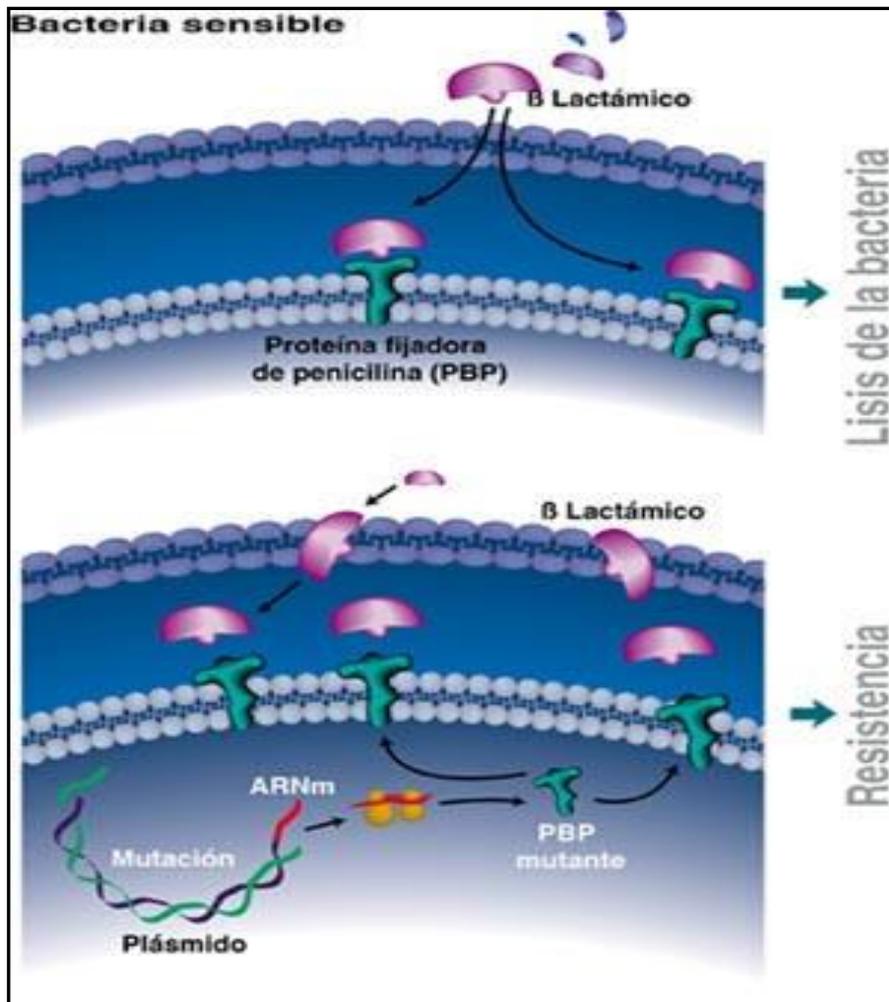
b. Modificación o activación del antibiótico: La modificación o inactivación del antibiótico, es el mecanismo más común de resistencia adquirida.³⁷ Este se presenta ya sea de forma química (acetilación, fosforilación y adenilación) o hidrolizándolo (β -lactamasas).⁴² Las betalactamasas representan un grupo diferente de enzimas producidas por gérmenes grampositivos, gramnegativos aerobios y anaerobios capaces de hidrolizar el anillo betalactámico e inactivar el antibiótico correspondiente.³⁷

Abraham y Cham, en 1940, publicaron los primeros informes en relación con su mecanismo de acción. Se ha demostrado que constituye un factor importante de resistencia de gérmenes como *Staphylococcus aureus*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *Bacteroides fragilis* y algunas enterobacterias.³⁷

La información genética para la síntesis de estas enzimas puede estar contenida en un cromosoma o en un plásmido y su producción puede ser una característica del germen (tasa de producción constante), aunque también la misma puede ser inducida en presencia de un sustrato apropiado.³⁷

Recientemente se han identificado algunas cepas de betalactamasas que pueden hidrolizar los nuevos betalactámicos; en este grupo se incluyen enzimas mediadas por plásmidos aislados de cepas de *Klebsiella pneumoniae* que pueden hidrolizar la cefotaxina y otras cefalosporinas de tercera generación, así como el aztreonam y enzimas mediadas por cromosomas presentes en cepas de *Xantomonas (Pseudomonas) maltophilia*, así como *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* y *Bacteroides fragilis*, capaces de hidrolizar imipenem y meropenem (Ver figura 4).

Figura 4. Modificación genética de la proteína fijadora de penicilina

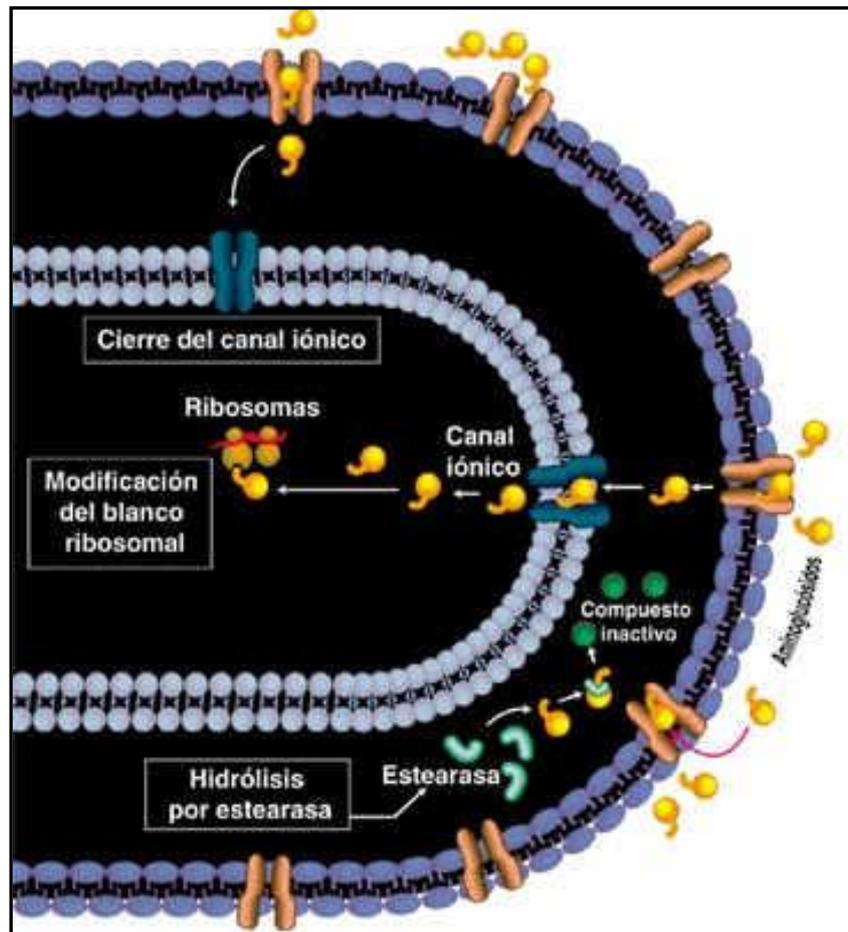


Tomado de (43)

- c. **Modificación del sitio blanco:** Estos mecanismos de resistencia se refieren a mutaciones espontáneas en los genes que codifican para éstos (RNA polimerasa, mutaciones en el RNA ribosomal 23S) sobre los que ejercen su acción (Ver figura 5).⁴²

Este tipo de resistencia se puede presentar por incremento de la concentración de una sustancia competitiva, o por modificación de las diferentes estructuras bacterianas alternas.³⁷

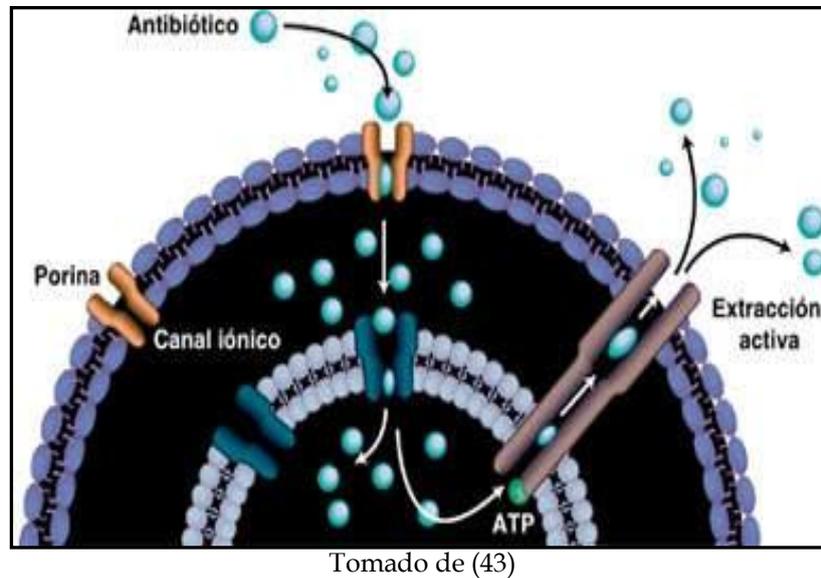
Figura 5. Modificación del RNA ribosomal



Tomado (43)

- d. **Expulsión del antibiótico:** Este tipo de resistencia ocurre mediante la sobreproducción de bombas de eflujo (Mex AB, OprD) lo cual impide el acceso del antibiótico al sitio blanco de la bacteria (Ver figura 6).

Figura 6. Sobreproducción de bombas de flujo bacteriano



1.4.5 Criterios y sugerencias para elegir antibióticos

El objetivo fundamental del tratamiento antimicrobiano es destruir o inhibir el crecimiento de un patógeno infectante sin causar daño al huésped, por lo que debe existir una interacción entre el huésped infectado, el microorganismo y el antibiótico que se utiliza.³⁷ Es necesario tener en cuenta además, que las bacterias durante el tratamiento, pueden cambiar sus propiedades patogénicas hacia el huésped, y desarrollar mecanismos de resistencia. Por ello algunos aspectos más importantes a tener en cuenta a la hora de seleccionar el antibiótico adecuado son:

- Identificación y sensibilidad del germen para seleccionar el antibiótico.
- Reconocimiento de los factores que dependen del huésped y que son capaces de modificar la eficacia terapéutica.



- Vías de administración, dosis, costos y complicaciones del tratamiento antimicrobiano.³⁷

Algunas recomendaciones que resultan útiles para un tratamiento con antibióticos son:

- Trabajar en estrecha y activa colaboración con el laboratorio de Microbiología para realizar antibiogramas que nos permitan reducir la lista de posibles patógenos y así lograr una selección más racional de la antibioticoterapia. El uso de los antibióticos en la terapia empírica óptima exige conocer los microorganismos infectantes más frecuentes y su sensibilidad a los antimicrobianos. El cuadro clínico puede sugerir la identidad del microorganismo específico.
- En casos de sepsis graves usar bactericidas, como Gentamicina (bacteremia causada por *Listeria monocytogenes*) o Penicilina G (meningococos provocado por *Neisseria meningitidis*). Debido a que la sepsis puede matar rápidamente al paciente, por lo que la quimioterapia antimicrobiana debe iniciarse tan pronto como se hayan tomado las muestras de sangre y obtenido material de otros lugares de interés para efectuar los cultivos. Siempre tomando en cuenta los patrones de sensibilidad antimicrobiana de las bacterias aisladas en la población, el hospital y el paciente; instaurando un tratamiento antimicrobiano eficaz contra bacterias grampositivas y gramnegativas, mientras se esperan los resultados de los cultivos.
- No utilizar antibióticos sin conocer su toxicidad, debido que el uso de dos antimicrobianos o más tiene algunas bases y se recomienda en algunas situaciones bien definidas; sin embargo la elección de los



fármacos para la combinación adecuada exige conocer sus posibilidades de interacción. Las interacciones pueden tener consecuencias en el microorganismo y en el huésped. Por ejemplo la vancomicina administrada sola casi siempre muestra mínima nefrotoxicidad, al igual que la tobramicina sin embargo utilizadas en combinación pueden ocasionar deterioro importante de la función renal.

- No utilizar antibióticos de alta toxicidad en pacientes ambulatorios, ya que en este tipo de pacientes es de suma importancia el monitoreo de la función renal y hepática, lo cual no puede realizarse si el paciente recibe el tratamiento de manera extrahospitalaria.

1.5 Concepto de infección nosocomial

Las infecciones que se adquieren en el hospital son consecuencia de la atención médica que reciben los pacientes y se definen como aquellas que no estaban presentes o en período de incubación al momento en que el paciente ingresó al hospital.

La infección nosocomial constituye una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad en Estados Unidos de Norteamérica. En ese país se reportan tasas de incidencia de infección entre 5 y 10%. En México la incidencia de las infecciones nosocomiales varía de un hospital a otro y se estima alrededor de 3 a 17 casos por cada 100 egresos hospitalarios; el impacto más sustancial de este problema es la mortalidad, la cual se calcula de 5% en promedio.⁴⁴

1.5.1 Factores de transmisión en enfermedades nosocomiales

Las infecciones nosocomiales son consecuencias directa de la atención integral a pacientes hospitalizados relacionadas con múltiples factores de riesgo; el



medio ambiente juega un papel muy importante ya que a partir de él se diseminan al huésped, además, que se caracterizan por una mayor virulencia y resistencia antimicrobiana.¹⁹

Los microorganismos pueden sobrevivir fácilmente en el medio hospitalario y de allí transmitirse a los pacientes por contacto directo o indirecto. Es por ello que algunas formas de transmisión de gran importancia son:

- El personal hospitalario puede ser el vehículo más frecuente, ya sea por colonización en piel y mucosas, y transmitirlos a través de fomites (objetos de uso personal del enfermo).
- Equipo médico.
- Manipulación inadecuada de procedimientos invasivos del paciente.
- Uso de antisépticos contaminados.

De esta forma, los patógenos nosocomiales se identifican con mayor frecuencia de acuerdo a la exposición del paciente. En las unidades de terapia intensiva la frecuencia de infecciones nosocomiales incrementa cinco a diez veces más de lo que ocurre en hospitalización, debido a la gravedad de los pacientes y a los procedimientos invasivos que se requieren para mantener el estado de salud; en la tabla 3 se muestran los microorganismos más frecuentes de acuerdo al tipo de infección en estas unidades.¹⁹

El conocimiento de los diferentes mecanismos mediante los cuales puede transmitirse un microorganismo a un paciente hospitalizado, facilita la vigilancia de las actividades del personal para limitar o evitar esta transmisión, sin embargo es indispensable mantener un programa de capacitación continuo al personal para no olvidar las medidas de prevención y control requeridas en cada una de las áreas de riesgo en hospitales.¹⁹



Tabla 3. Patógenos en diferentes sitios de infección en UCI médico-quirúrgica (2003)*

Infección	No.	Gram positivas (%)	Gram negativas (%)	Hongos (%)	
<u>Bacteremia primaria</u>	4,394	SNC	39	<i>Enterobacter spp.</i> 3.8	<i>Candida albicans</i> 6.1
		<i>S. aureus</i>	12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3.7	Otras 3.6
		<i>Enterococcus spp</i>	11	<i>K. pneumoniae</i> 2.3	<i>C. glabrata</i> 1.8
		<i>S. pneumoniae</i>	0.4	<i>Escherichia coli</i> 2.3	
				Otros gram negativos 15.7	<i>Candida albicans</i> 5.7
<u>Neumonía</u>	9,877	<i>S. aureus</i>	17	<i>P. aeruginosa</i> 15.6	Otros hongos 2.5
		<i>S. pneumoniae</i>	1.6	<i>Enterobacter spp.</i> 10.9	Otras Candida 1
		<i>Enterococcus spp</i>	1.8	<i>K. pneumoniae</i> 7	<i>Aspergillus spp.</i> 0.5
				<i>E. coli</i> 4.4	<i>C. glabrata</i> 0.2
				<i>Serratia spp.</i> 4.3	
				<i>Acinetobacter</i> 2.9	
				<i>Citobacter spp.</i> 1.4	
<u>Infección urinaria</u>	7,547	<i>Enterococcus spp.</i>	14.3	<i>E. coli</i> 18.5	<i>Candida albicans</i> 15.3
		SNC	3.1	<i>P. aeruginosa</i> 10.3	Otras 6
		<i>S. aureus</i>	1.4	Otros gram negativos 7.1	<i>C. glabrata</i> 3.5
				<i>K. pneumoniae</i> 5.2	
				<i>Enterobacter spp.</i> 4	
				<i>Citobacter spp.</i> 2	
<u>Infección de sitio quirúrgico</u>	<u>3,315</u>	<i>Enterococcus spp.</i>	17.1	<i>P. aeruginosa</i> 9.6	<i>Candida albicans</i> 5.9
		SNC	11.7	<i>E. coli</i> 8.5	Otros hongos 1.7
		<i>S. aureus</i>	8.8	<i>Enterobacter spp.</i> 8.4	Otras Candida 1.7
		Otros Gram (+)	9.2	<i>K. pneumoniae</i> 3.9	<i>C. glabrata</i> 1.8
					<i>Aspergillus spp.</i> 0.1
<u>Oídos, nariz y garganta</u>	1,175	SNC	15	<i>P.aeruginosa</i> 10.3	<i>Candida albicans</i> 9.2
		<i>S. aureus</i>	13	<i>Enterobacter spp.</i> 7.2	Otros hongos 2
		<i>Enterococcus spp.</i>	4.9	<i>K. pneumoniae</i> 3.4	Otras Candida 1.7
		<i>S. pneumoniae</i>	0.5	<i>E. coli</i> 2.6	<i>C. glabrata</i> 1.4
				<i>H. influenzae</i> 2	<i>Aspergillus spp.</i> 0.3
<u>Cardiovascular</u>	1,651	SNC	54.2	<i>P. aeruginosa</i> 4	<i>Candida albicans</i> 3.8
		<i>S. aureus</i>	8.6	<i>Enterobacter spp.</i> 3	Otros hongos 0.8
		<i>Enterococcus</i>	8.7	<i>K. pneumoniae</i> 2.1	Otras Candida 1.5
				<i>E. coli</i> 1.8	<i>C. glabrata</i> 0.6

*Seminars in respiratory and critical care medicine· 19



1.5.2 Concepto de infección comunitaria

Una infección se considera comunitaria si hay indicios de que el paciente la tuviera en la fase clínica o de incubación en el momento de ingreso. En Neonatología son comunitarias las que se desarrollan durante las primeras 72 horas de vida por un microorganismo que sea flora normal del canal de parto y/o en los que se demuestre que están presentes en el canal genital de la madre aunque no sean de flora habitual de la misma.

1.6 Bacterias de importancia médica

Cada una de los microorganismos con los cuales trabajamos tiene particularidades diferentes, es por ello que a continuación se muestran algunas características de cada una de ellas.

1.6.1 *Staphylococcus aureus*

Este microorganismo coloniza la piel sobre todo en sitios de inserción de cabello y mucosas del humano y se le considera reservorio natural en un 20% a 50% en los adultos normales. El hombre es portador intermitente en el 90%, sólo 10 a 20% se consideran colonizados permanentemente. El sitio de mayor colonización son las narinas anteriores, por lo cual se asocia al personal hospitalario con la transmisión de cepas con alta virulencia como *S. aureus* meticilino-resistente (SAMR) a través de las secreciones nasofaríngeas, manos y fomites.¹⁹

S. aureus puede transmitirse a otras regiones de la piel o las membranas mucosas; si estas barreras son interrumpidas por trauma o una cirugía, *S. aureus* que es un patógeno oportunista, puede acceder al tejido provocando una lesión local. Debido a su amplia versatilidad, esta bacteria es capaz de causar



enfermedades de amplio espectro, infecciones menores en la piel e infecciones invasoras serias como: bacteremia, infecciones del sistema nervioso central, osteomielitis, infecciones en tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario y síndrome de choque tóxico.²⁰

En Estados Unidos de América (EUA), *S. aureus* ocupa el segundo lugar después de los estafilococos coagulasa negativa como causa de bacteremia adquirida en el hospital y es una causa letal y potencial en las infecciones.

En México la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) notifico que los porcentajes de mortalidad entre pacientes infectados con *S. aureus* varían entre el 5 y 70% y que los porcentajes de mortalidad atribuibles pueden ser elevados (50%). Con datos provenientes de hospitales generales, pediátricos, universitarios y de especialidad, esta misma red reportó que en el periodo de 1997-2003, *S. aureus* ocupó el tercer lugar de morbilidad y el cuarto lugar de mortalidad. Un hospital pediátrico de tercer nivel en México, registro un gran predominio de *S. aureus* relacionado con bacteriemias nosocomiales. Una revisión retrospectiva de 23 años, sobre las infecciones intrahospitalarias en un hospital pediátrico en Guadalajara-México, reconoce que actualmente el género *Staphylococcus* tiene una prevalencia de 36% en esas infecciones.²⁰

En México diversos estudios de vigilancia de las infecciones nosocomiales indicaron que de 8.3 a 36% fueron atribuibles a *S. aureus*.

Dentro de los factores que afectan el éxito de la transmisión nosocomial de *S. aureus* se encuentran los siguientes: características fenotípicas y genotípicas de las cepas, factores del huésped, esquemas de tratamiento antimicrobiano y medidas de control implementadas en las instituciones. Los factores relacionados en la epidemividad son poco claros.²⁰



En México existe un número limitado de estudios sobre la susceptibilidad antimicrobiana en *S. aureus* meticilina-resistente (SAMR). En 1993, en el Hospital General de León, Guanajuato, se identificó una resistencia global a meticilina de 24.1%. Asimismo, en el Hospital Civil de Guadalajara, se obtuvieron resultados que indicaron un incremento en la resistencia a oxacilina en *S. aureus* de 7%, en 1989, a 20% en 1998. Un estudio llevado a cabo entre 1998 y 1999 en un Hospital de tercer nivel de México registró una frecuencia de resistencia de *S. aureus* de 14.2%.²⁰

1.6.2 *Salmonella typhi*

La salmonelosis se considera un problema de salud pública mundial. *Salmonella enterica* causa infección intestinal aguda en personas de todas las edades y puede ocasionar infecciones invasivas graves como bacteremia y meningitis en lactantes, ancianos y pacientes inmunosuprimidos. En los países industrializados se han establecido sistemas de vigilancia, que les permite conocer con relativa certeza la incidencia de las infecciones por *Salmonella* y otros patógenos causales de diarrea, así como el impacto de cada una de éstas en la morbilidad y mortalidad de la población.²¹

La comunidad científica y las autoridades asumen que, en general, los pollos, cerdos y bovinos son los reservorios, más frecuentes de *Salmonella*; que la ingestión de alimento directa o indirectamente contaminado es la causa más común de las infecciones en el humano; y que todas las serovariedades tienen el mismo grado de patogenicidad. Por las dificultades técnicas y logísticas, existen pocos estudios sobre la transmisión de este patógeno a lo largo de toda la cadena alimenticia y las condiciones necesarias para producir enfermedad en un hospedante humano. Por ende, la legislación referente a inocuidad alimentaria establece medida de control o límites de tolerancia basados en



información epidemiológica obtenida de estudios transversales realizados en las naciones industrializadas. En muchas ocasiones esta información no puede ser extrapolada al panorama de los países en desarrollo.²¹

En México no se cuenta con estadísticas nacionales de infecciones por *Salmonella*. Con frecuencia el médico hace el diagnóstico basándose en el cuadro clínico del paciente, pero sin contar con los estudios microbiológicos necesarios para establecer un diagnóstico certero. La falta de un sistema de vigilancia con comunicación entre epidemiólogos, clínicos, y el sector veterinario, así como la falta de infraestructura necesaria, impide que países como el nuestro pueda identificar las principales serovariedades de *Salmonella* en las diferentes clases de alimentos, así como el riesgo que cada una de estas provoca en la salud de los humanos. Esta información es indispensable para establecer las intervenciones necesarias, para disminuir la morbilidad y mortalidad por las infecciones causadas por *Salmonella*.²¹

Anualmente, en el mundo hay al menos 16 millones de casos de fiebre tifoidea, resultando en 600,000 muertes. En México se han reportado alrededor de 15 mil casos al año de fiebre tifoidea. Es importante insistir, como ya se mencionó con anterioridad, que esta incidencia se basa primordialmente en una valoración clínica, sin que se hayan aplicado métodos confiables de diagnóstico. Esto implica por tanto, un grado de incertidumbre en las estadísticas.²²

Para obtener mayor información sobre la transmisión de *Salmonella* a través de la cadena alimenticia en México, la Dra. Mussaret B. Zaidi y colaboradores en el 2003 y 2005 establecieron un sistema de vigilancia activa, que incluyó a los Estados de Yucatán, San Luis Potosí, Michoacán y Sonora. La vigilancia incluyó muestras de humanos, carnes crudas e intestinos de animales sacrificados en rastros.



Cabe mencionar que durante el periodo de estudio, los hospitales participantes de los cuatro Estados antes mencionados, reportaron 26 casos de bacteremia y meningitis, de los cuales destacaron las serovariedades de *S. enteritidis* (seis),

S. typhi (seis) y *S. typhimurium* (siete). Otro hallazgo, importante del programa de vigilancia fue la resistencia a múltiples antibióticos en la serovariedad *typhimurium*. En el 2002 se detectó la aparición de *S. typhimurium* resistente a diez antibióticos, tales como ampicilina, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol, aminoglucósidos, ácido nalidíxico y cefalosporinas de espectro extendido, en el Estado de Yucatán.²¹

Zaidi y sus colaboradores también indican que *Salmonella enterica* continua siendo una importante causa de morbimortalidad en México; *S. typhimurium* y *S. enteritidis* son las serovariedades más frecuentemente aislados de niños con diarrea; además que junto con *S. typhi*, han sido causa de sepsis y meningitis fatales.²¹

1.6.3 *Candida albicans*

Durante los años se ha reportado un incremento dramático en la incidencia de infecciones nosocomiales causadas por levaduras y hongos filamentosos, una proporción substancial de pacientes han sido colonizados por *Candida* sp. durante su estancia intrahospitalaria, pero sólo unos cuantos desarrollan, subsecuentemente, infecciones graves.²³

Existen más de 150 especies de *Candida*, pero sólo nueve son considerados como patógenos para el ser humano. Éstas son: *C. albicans*, *C. guillermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata* y *C. dubliniensis*; esta última descrita recientemente, antes incluida dentro de *C. albicans*.²⁴



Las infecciones ocasionadas por levaduras del género *Candida*, especialmente *C. albicans*, predominan en la mayoría de los reportes (60–80%). Se estima que de 10 a 20% de todas las infecciones nosocomiales en unidades de terapia intensiva son causadas por especies de *Candida*. La mitad de las infecciones fúngicas ocurren en terapias intensivas, siendo el sitio más frecuente de aislamiento en sangre con 40.2%, seguido por el de orina e infecciones de mucosas.

En hospitales de tercer nivel se ha observado que la especie más frecuente aislada en fungemias en niños es *C. albicans* (25% en neonatos), seguida de *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. tropicalis*. En niños en general se aísla más frecuentemente *C. albicans* (58%) seguida de *C. parapsilosis* (27%).^{23, 25}

La incidencia de candidemia se ha incrementado, principalmente en las unidades de cuidados intensivos más que en otras áreas hospitalarias. Para que este microorganismo comensal se convierta en un patógeno, es necesario la interrupción de mecanismos de defensa normales; existiendo ciertas condiciones como: leucemia, leucopenia, quemaduras, enfermedad gastrointestinal, y prematuridad. Los principales factores predisponentes son el uso previo de antibióticos de amplio espectro por tiempos prolongados, uso de catéteres permanentes, hemodiálisis, y aislamiento de *Candida* en otros sitios fuera de hemocultivos.²³

Los principales procedimientos que se han asociado a un mayor riesgo son: nutrición parenteral total (43.3%), cánulas endotraqueales (29.9%), catéter venoso central (25.8%), cirugía previa (14.4%) y uso de antibióticos de amplio espectro (90%).²³



La mortalidad en neonatos por candidemia es de 29 a 38%, con factores asociados como: desnutrición y cirugía previa. Se ha observado mortalidad más baja en adultos que en niños (21 vs 72%). De particular interés son los pacientes inmunosuprimidos, de los cuales se puede mencionar a los pacientes con leucemia linfocítica, y los que están bajo tratamiento antibiótico, especialmente con vancomicina e imipenem; además de que la colonización de heces parece ser otro factor predisponente.²⁶

En México se han realizado pocos estudios clínico-epidemiológicos enfocados a determinar la frecuencia de infecciones micóticas en pacientes inmunodeprimidos, por lo que se desconoce la magnitud del problema para establecer las medidas terapéuticas y preventivas oportunas.²⁷

Por otro lado deben considerarse otros factores predisponentes para infecciones causadas por especies de *Candida* como agentes nosocomiales. Es por eso que Yildirim y col; en México durante el año 2005-2007 analizaron las manos del personal de un hospital y señalaron que las diferentes especies de *Candida* son un factor de riesgo que debe controlarse con la sencilla práctica de lavado de manos. Esto indica que, además de las especies comúnmente encontradas en la piel, la expectoración, el aparato gastrointestinal y genital femenino y la orina de los pacientes, puede adquirirse la infección por especies de *Candida* en ambientes hospitalarios. Por ende su objetivo fue conocer la prevalencia del género *Candida* aislada de hemocultivos de pacientes pediátricos y adultos internados en el Hospital General Dr. Manuel Gea González. Los resultados obtenidos a partir de los hemocultivos analizados (4,381) fue que a pesar de haber hemocultivos positivos para *Candida* u otras levaduras, como *Cryptococcus* sp; la más frecuente es *Candida albicans* (45 a 57%), aislada principalmente de la unidad de cuidados intensivos, cirugía general y neonatología; además que especies no *albicans* han



emergido y tomado importancia en este tipo de infecciones (42-54%). Siendo el género femenino más afectado con un 58%.^{28, 29}

1.6.4 *Escherichia coli*

Escherichia coli es el principal anaerobio facultativo de la flora microbiana que reside en el colon humano. El huésped se coloniza desde el nacimiento con una o dos cepas que residen de manera permanente en el intestino y establecen una relación simbiótica con el individuo durante toda la vida. Sin embargo, se ha precisado que seis grupos patógenos o patotipos de *E. coli* ocasionan diarrea en sujetos sanos: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC), adherente difusa (DAEC) y enteropatógena (EPEC).³⁰

Estudios epidemiológicos realizados en países en vías de desarrollo, incluidos Latinoamérica y México, han demostrado que ETEC y EPEC son dos de los principales patógenos aislados en los casos de diarrea infantil. Dentro de la vigilancia epidemiológica que llevan a cabo las autoridades de salud en México, se ha comunicado que EPEC se presenta en forma endémica hasta en 6% de la población, una cifra muy parecida a la informada para países industrializados como Alemania y Australia, en los que se ha encontrado que 5.9 y 7.6%, respectivamente, de niños sanos son portadores normales de cepas de EPEC.

En lo que respecta a niños con diarrea, en México se ha detectado un alto porcentaje de pacientes infectados con EPEC. En un estudio que se condujo en Guadalajara, Jalisco, en 1987, se logró aislar cepas de EPEC en 17.5% de los casos de niños menores de dos años con diarrea. En este estudio se identificó EPEC con



mayor frecuencia que otros patógenos típicos, como *Shigella*, *Giardia*, *Salmonella* o Rotavirus. Por otro lado, en 1991 Cravioto y colaboradores llevaron a cabo un estudio en niños con diarrea de una población rural del estado de Morelos. Ellos aislaron cepas de EPEC en 19% de los casos de diarrea en niños de esa región. El grupo de investigación de los autores, en colaboración con el laboratorio de bacteriología médica del Hospital Infantil de México (SSA), ha logrado aislar *E. coli* con adherencia localizada (LA) en 7% de 208 casos de niños con un cuadro diarreico grave. Asimismo, 12% de los casos se identificaron en cepas con adherencia parecida a la localizada (LAL) en este mismo grupo de pacientes.

Con estos datos epidemiológicos es posible advertir que EPEC es una bacteria causante de 17 a 19% de los casos de diarrea infantil en diversas regiones del país, lo que indica que en México uno de cada cinco niños que enferman de diarrea puede estar infectado con este virotipo de *E. coli*.

En otras naciones en vías de desarrollo como Brasil y Chile, la epidemiología de EPEC es similar, Gomes y colaboradores (1989).³⁰

1.6.5 *Bacillus cereus*

Es un bacilo formador de esporas responsable de intoxicaciones alimentarias, siendo su hábitat natural el suelo, contamina con frecuencia cereales, leche, budines, cremas pasteurizadas y especias, entre otros alimentos.

Bacillus cereus causa intoxicaciones alimentarias a través de la ingesta de alimentos contaminados. En general se admite que debido a la levedad del cuadro y a que la detección microbiológica de esta bacteria no se realiza rutinariamente en pacientes



diarreicos, la incidencia real puede ser superior a la estimada. Mas si tenemos en cuenta, que el cuadro clínico se confunde a menudo con los producidos por *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*, dependiendo de que toxina esté involucrada.⁴⁵

La intoxicación alimentaria puede ocurrir cuando los alimentos son preparados y mantenidos sin la adecuada refrigeración durante horas antes de ser servidos. El consumo de alimentos que contiene entre 10^5 *B. cereus*/g o más puede provocarla. Los alimentos vinculados a brotes han sido carne y verduras cocidas, arroz frito o hervido, crema de vainilla, sopas, leche y brotes de vegetales crudos.⁴⁶ *Bacillus cereus* produce dos enterotoxinas durante su crecimiento exponencial: la toxina diarreica y la toxina emética que dan lugar a dos formas clínicas distintas de intoxicación alimentaria.

El síndrome emético está producido por una toxina preformada y termoestable, al igual que la de *S. aureus*. Se asocia frecuentemente con arroz frito contaminado, tiene un período de incubación corto, habitualmente de 1 a 6 horas y predominan los síntomas gastrointestinales altos manifestados por náuseas y vómitos. Este hecho ha llevado a confundir la intoxicación por *B. cereus* y atribuirle a *S. aureus*. El síndrome diarreico por el contrario, está producido por la ingestión de alimentos inadecuadamente refrigerados. Resulta de la esporulación del organismo in vivo y de la producción de una enterotoxina diferente de la anterior, preformada y termolábil que tiene un período de incubación más largo y generalmente promedia entre 10 y 12 horas. Las manifestaciones se relacionan con la afectación gastrointestinal baja similar a la intoxicación por *Clostridium perfringens*.⁴⁶ Los síntomas son dolor abdominal, diarrea acuosa profusa, tenesmo y náuseas que generalmente duran 12-24 hrs. y en algunos pacientes pueden durar más tiempo, de 2 a 10 días.⁴⁷



La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que las enfermedades causadas por alimentos contaminados constituyen uno de los problemas sanitarios más difundidos en la actualidad.⁴⁵

Los casos de intoxicaciones o enfermedades por alimentos mal preparados o contaminados por este microorganismo suelen ser frecuentes a pesar de que son perfectamente evitables; la primera descripción de un brote de gastroenteritis data de principios de 1900.⁴⁵

En general, la incidencia de *B. cereus* en la intoxicación alimentaria es subestimada ya que no es una enfermedad notificable y los procedimientos de presentación de informes varían según los países. Hay una tendencia de *B. cereus* en muchos más casos de envenenamiento de alimentos del que se informa en Estados Unidos. En Noruega *B. cereus* fue el microorganismo más común aislado en enfermedades generadas por alimentos durante 1990. En Finlandia fue identificado como agente causal en brotes de intoxicación alimentaria en un 14%. La investigación de brotes de origen alimentario en la República Federal de Alemania de las Fuerzas Armadas mostraron que *B. cereus* fue el patógeno más frecuente aislado en conservas de alimentos y fue responsable de 42% de los brotes notificados entre 1985 y 2000. Mientras que en países como Noruega, Finlandia, Hungría, Reino Unido, Japón y los Estados Unidos reportaron una mayor incidencia de envenenamiento de alimentos por la toxina emética.⁴⁷

El aislamiento e identificación de *B.cereus* no es un análisis de rutina, realizándose la búsqueda e identificación en aquellos alimentos que por su naturaleza y por los datos clínicos ante una denuncia pudieran guiar a la posible presencia de este microorganismo. Por este motivo, la incidencia es baja en las intoxicaciones, si se



suma que no siempre se obtiene restos de alimentos representativos de lo consumido por las personas intoxicadas.⁴⁶

En nuestro país han sido identificados 3 brotes debido a este microorganismo en los últimos 9 años que afectaron un total de 115 personas, siendo los alimentos farináceos identificados en un 33% de los casos. El mayor número de personas afectadas en un solo brote fue de 65 debido a una intoxicación en un comedor. De este total de casos notificados al sistema de Vigilancia epidemiológica solo un caso corresponde a los últimos 3 años con un total de 9 personas afectadas en el interior del país.⁴⁵

1.7 Antecedentes de los extractos naturales

Los extractos de plantas se han utilizado desde hace siglos para el tratamiento de un gran número de procesos patológicos.

El uso de compuestos naturales obtenidos de las plantas data desde mucho tiempo atrás. Si nos remontamos en la Historia, el descubrimiento de un hombre congelado en los Alpes de más de 5.300 años de antigüedad, perfectamente conservado tenía entre sus bienes varios frutos de *Piptous betulinus*, de reconocida actividad antifúngica, antiparasitaria, y frente al género *Mycobacterium*, nos aporta una idea del conocimiento empírico por parte del poblador de aquellas épocas sobre el beneficio que producía el consumo de algunas plantas.¹

El primer texto escrito sobre plantas medicinales data del año 3.000 a.C. y se debe a los Sumerios. Mas adelante los griegos también usaron las plantas para sus tratamientos. Dada la abundancia de vegetales en Creta, esta civilización, desempeñó un papel importante en el desarrollo de la medicina alrededor del mar



Mediterráneo especialmente en los siglos I y II d.C., como principal exportador de plantas a los países del área del mediterráneo.² El primer tratado Helénico completo en materia de plantas medicinales del que se tiene conocimiento fue escrito por Diocles de Carystos (siglo IV d.C.). El tratado llamado Phizotomicon, expone el origen de reconocimiento y el valor medicinal de diversas plantas.³

El descubrimiento del nuevo Continente y la extensión de imperios Europeos por África y Oriente aportaron un sin número de nuevas plantas con propiedades medicinales por lo que se extendió el uso terapéutico para el tratamiento de múltiples enfermedades. Estas plantas se consumían de forma más variada en: infusiones, vapores, ingesta directa, entre otras.¹

En la actualidad los extractos naturales de plantas es una industria que mueve millones de euros alrededor del mundo. Se conocen aproximadamente 1340 plantas con potenciales de fuentes de antimicrobianos, pero se conocen más de 250,000 de especies de plantas que contienen una gran diversidad de componentes bio-activos. Sólo en el año de 1999 el negocio global de la venta de suplementos naturales de plantas en humanos excedió de 15 billones de dólares, de los cuales 7 billones fueron en Europa, 2,4 billones en Japón, 2,7 en el resto de Asia y 3 billones en Norte América.^{1,31}

A menudo los extractos naturales deben su actividad biológica al sinergismo entre los diversos compuestos ya que éstos por separado poseen mucha menor actividad que cuando se encuentran juntos. Se considera que la toxicidad de los extractos es más reducida cuando se encuentran todos sus compuestos que cuando se encuentran purificados, este fenómeno se denomina *buffering*.

Diversos productos derivados de las plantas han mostrado un efecto antimicrobiano. Entre estos compuestos destacan los flavonoides, fenoles,



terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos (Cowan 1999). Sus mecanismos de acción son variables: por ejemplo, la toxicidad de los fenoles en microorganismos se atribuye a inhibición enzimática por oxidación.

El modo de acción de los terpenos y aceites esenciales no ha sido dilucidado por completo, pero se postula que pueden causar rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos. De los alcaloides se ha postulado que se intercalan con el DNA, y de las lectinas y polipéptidos se conoce que pueden formar canales iónicos en la membrana microbiana o causar la inhibición competitiva por adhesión de proteínas microbianas a los polisacáridos receptores del hospedero.⁷

Las plantas tienen una capacidad ilimitada de sintetizar, compuestos, la mayoría relacionados con el fenol, y sus derivados. Los principales grupos de compuestos generados por plantas se resumen tabla 4.⁵



Tabla 4. Compuestos químicos más importantes con actividad antimicrobiana obtenidos de las plantas

<i>Grupo químico</i>	<i>Compuesto</i>	<i>Planta</i>	<i>Actividad</i>
Fenoles simples	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Timol ▪ Ácido antémico ▪ Terpenoide 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Thymus officinalis</i> (tomillo) ▪ <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) ▪ <i>Ocimum basilicum</i> 	<p>General</p> <p><i>S. aureus, S. thyphimurium</i></p> <p><i>Salmonella</i></p>
Quinonas	Hipericina	<i>Hypericum perforatum</i> (hipérico)	VIH
Taninos		<p><i>Quercus rubra</i> (roble)</p> <p><i>Eucaliptus globulus</i> (eucalipto)</p> <p><i>Melissa officinalis</i> (melisa)</p>	Bacterias y virus
Cumarinas		<i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla)	virus
Flavonas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Catequina ▪ Isoflavona ▪ Quercitina 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Camellia sinensis</i> ▪ <i>Milletia thonningii</i> ▪ <i>Quercus rubra</i> (roble) 	<p><i>Shigella, Vibrio, S. mutans</i></p> <p>Schistosoma</p>
Alcaloides	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Coca ▪ Piperina ▪ Mescalina 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Erhynchroxyllum coca</i> (coca) ▪ <i>Piper nigrum</i> ▪ <i>Lophophora williamsii</i> (peyote) 	<p>Cocos Gram positivos</p> <p>Hogos,</p> <p>Lactobacillus</p> <p>General</p>

Tomado de (5)



1.7.1 EUCALIPTO

1.7.2 Nombre científico

*Eucalyptus globulus labill*⁶

1.7.3 Nombres populares

- Español: eucalipto, gomero azul
- Portugués: eucalipto, comeiro-azul, mogno-blanco
- Inglés: eucalyptus, fever tree, blue gum
- Francés: gommier blue
- Italiano: eucalipto
- Alemán: Fieberbaum, Schonmutz, Eucalyptus⁶

1.7.4 Historia del Eucalipto

Su nombre científico deriva del griego *eu* = “normal” y *calyptra* = “pozo con tapa”, en alusión a la forma que adquieren los sépalos y pétalos al fusionarse, conformando un fruto completamente cerrado. Por su parte *globulus* hace referencia a la forma redondeada del fruto.

No existen demasiados datos sobre el empleo del eucalipto por los aborígenes australianos, aunque existe la certeza que no sólo usaban las hojas sino también la resina (o quino) y la corteza. Con esta última preparaban decocciones en casos de disentería y para lavar llagas. El carbón de la corteza era empleado como antiséptico.



El árbol fue descubierto y dado a conocer en ese país por Labillardiere a fines del siglo XVII. En las postrimerías del siglo XVIII fue introducido en América y en 1792 se empezó a utilizar medicinalmente en Europa. En el siglo XIX fue muy apreciado por su madera, aceite y sombra, a la vez que sirvió para drenar los suelos de algunas regiones pantanosas de África. Fue también en este siglo donde se comenzó a emplear el aceite de eucalipto como antiséptico en problemas urinarios en los hospitales ingleses. En 1860 dio inicio la producción industrial de aceite de eucalipto en Victoria (Australia).^{6, 10, 17}

1.7.5 Descripción botánica

Aparece de forma natural en el sur de Australia (Victoria), Tasmania y las islas del estrecho de Bass, además es cultivado en el sur de Europa y California. Debido a su facilidad de adaptación a los diferentes climas alrededor del mundo, se le ha llamado “el errante”, ya que en la actualidad, no hay árbol que se haya propagado más en nuestro planeta.^{8, 32}

El eucalipto es un árbol perteneciente a la familia de las Mirtáceas, caracterizado por presentar una altura cercana a los 70-90 metros; tronco grisáceo y liso. Las hojas de las ramas jóvenes son ovaladas o lanceoladas, con forma de corazón, sin pecíolo, cubiertas por glándulas oleíferas, cerosas, con el limbo rodeado y se disponen opuestas entre sí y horizontalmente respecto del árbol; por lo que el sol sólo incide en una cara y ambas caras presentan coloración diferente. Las hojas más viejas son alargadas, con forma de lanza, sin pecíolo, limo falciforme y se disponen de forma alterna y verticalmente respecto al árbol, por lo que el sol incide



por igual sobre las dos caras y sólo tiene una coloración (verde grisáceo). Las hojas de ramas viejas contienen más aceite esencial. Las flores son poco vistosas de unos 4 cm de diámetro, solitarias o en grupo de 2-3 sobre pedúnculos cortos, con un receptáculo en la que quedan encerrados los estambres. La flor y el fruto tienen una forma piramidal cuadrangular muy característica (Ver figura 7).^{6, 9, 11, 17, 33}

Fig. 7. *Eucalyptus globulus*



(Tomado de 8)

1.7.6 Hábitat

El eucalipto es oriundo del sur de Australia y Tasmania, siendo introducido posteriormente en países subtropicales, región mediterránea. Requiere pocas exigencias del suelo por lo que tiende a distribuirse ampliamente conformando poblaciones forestales propias como en el caso de las famosas “Blue Montains” en Australia, que da un colorido azulado al paisaje debido al tono de sus hojas. Los principales cultivos se encuentran en España, sur de Francia, Portugal, Marruecos, ex -URSS, Brasil, California y Congo. Se conocen como eucalipto muchas variedades regionales de esta especie.⁶



1.7.7 Parte utilizada

El género *Eucalyptus* comprende más de 600 especies, australianas en su inmensa mayoría, pocas se utilizan en la actualidad. Uno de los intereses del género, es la diversidad de composición del aceite esencial, diversidad muy grande ya que son muy frecuentes los quimiotipos para una misma especie.¹¹

Los cladodios (hojas adultas) sin pecíolo es la parte más utilizada. El olor es fuertemente aromático, de tipo alcanforado, mucho más marcado cuando se tritura la hoja. El sabor es algo amargo y astringente. Medicinalmente suelen emplearse en muchos países tanto *globulus* como variedades o especies locales, aunque en las farmacopeas se tome en cuenta al primero únicamente.

Las normas exigidas por la farmacopea precisan un contenido no menor al 2% de aceite esencial (principalmente 1,8 cineol) y una cantidad de elementos extraños inferior al 2%. Las variedades consideradas también como eucalipto deben tener como mínimo un 50% de eucaliptol.⁶

1.7.8 Composición química

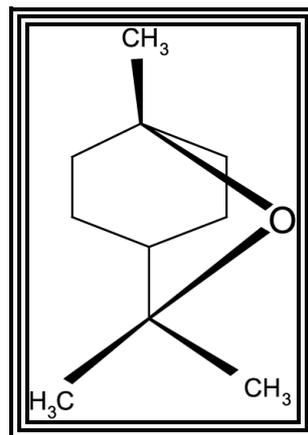
- **Aceite esencial (0.5-3.5%):** Compuesto principalmente por 1,8 cineol o eucaliptol (óxido terpénico) en una concentración del 70-80%. También son importantes las monoterpenos (α y β -pineno, d-limoneno, ρ -cimeno, α - felandreno y γ -terpineno), los sesquiterpenos (aromadendreno, aloaromadendreno, globulol, epiglobulol, eucaliptona, macrocarpalos H, I, J y viridiflorol) y demás compuestos minoritarios como son aldehídos (myrtenal) y cetonas (carvona, ponocarvona). El contenido en aceite esencial



tiene un pico máximo en las hojas basales de los brotes, mientras que el contenido de cineol aumenta con la edad de la hoja y alcanza su máximo en las hojas adultas de tallos ya lignificados. Los compuestos de aldehído le dan un olor desagradable y es por ese motivo que se purifica (Ver figura 8).¹⁸

- **Flavonoides:** eucaliptin, hiperósido, quercetina, quercitrina y rutina.
- **Otros:** taninos (2-4%) y ácidos asociados (gálico, protocatéquico), ácidos polifenólicos (ferúlico, cefeico, y gentísico), resina (rica en taninos) ceras, ácido ursólico y derivados. De la corteza se han obtenido ramnósidos del ácido elágico.^{6, 10, 11, 12, 13}

Fig. 8. 1,8-cineol (eucaliptol).



(Tomado 8)

1.7.9 Acciones farmacológicas

La principal actividad del eucalipto se centra a nivel del aparato respiratorio y está en función de su aceite esencial; ya que no sólo incrementa la fase secretoria



bronquial sino también disminuye la tensión superficial entre el agua y el aire en la superficie del alveolo, cual contribuye con la acción expectorante.

Este aceite ha demostrado ser un buen inductor enzimático a nivel del hepatocito, promoviendo la metabolización de algunos medicamentos tales como la cimetidina o la ranitidina, por lo anterior en casos de disminución en la efectividad de estos fármacos debido a la lentitud de su procesamiento en el cuerpo humano, se recomienda la administración simultánea de los aceites de esta planta.^{14, 15}

Otras acciones importantes derivan de su poder antioxidante, hipoglucemiante (hojas), padecimiento gastrointestinal y antimicrobiano.⁶

1.7.10 Actividad antimicrobiana

La mayor actividad evidenciada por diferentes extractos alcohólicos de eucalipto, fue más marcada frente a microorganismos Gram (+) tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Micrococcus glutamios*. Frente a gérmenes Gram (-) el espectro fue menor, observándose únicamente actividad frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, en este último caso siendo útil también el extracto acuoso.

De las doce especies estudiadas farmacológicamente de eucaliptos, todas han demostrado en mayor o menor medida actividad antimicrobiana; tanto *E. coli* como *Staphylococcus aureus* resultaron ser sensibles al aceite esencial y a la tintura de las hojas de *E. globulus*. También resulto ser sensible a ambas formas galénicas el hongo *Candida albicans*.⁶



1.7.11 Actividad hipoglucemiante

Recientes estudios *in vitro* demostraron que extractos acuosos de *E. globulus* disminuyeron la neoglucogénesis hepática al interactuar con la enzima glucosa-6-fosfatasa, lo cual genera una disminución en la producción de glucosa en hígado. Así mismo en la prueba *in vitro* de difusión de glucosa a nivel intestinal, el extracto acuoso de hojas de *E. globulus* (50g/l) redujo el pasaje, aunque en menor medida que los extractos acuosos de *Agrimonia eupatoria* y *Persea americana* (Gallagher A. et., al., 2003).⁶

1.7.12 Efectos adversos y/o tóxicos

Estudios en humanos: En las dosis recomendadas tanto en extractos de las hojas como el aceite esencial de eucalipto presenta por lo general una muy buena tolerancia. En cambio en dosis más altas puede ocasionar náuseas, vómitos, gastroenteritis (debido principalmente al alto contenido en taninos), sofocación, hematuria, neurotoxicidad (convulsiones epileptógenas, pérdida de conciencia, delirio y miosis). En casos más graves produce depresión bulbar respiratoria y coma.

Durante usos muy prolongados el aceite esencial de eucalipto puede inhibir la movilidad ciliar (Newall C. et al., 1996). Los niños constituyen el grupo de riesgo mayor con la ingesta de aceite esencial de eucalipto. Entre 1981 y 1992 fueron detectados en Australia 109 casos de intoxicación por ingesta accidental de aceite de eucalipto.



Es importante no confundir la hoja con el aceite esencial puro cuando se hable de toxicidad. En dosis que varían entre 3.5 y 21 ml (equivalente a 3.5 y 21g) el aceite esencial puro resulta mortal en humanos (dosis como expectorante es de 0,6-0.2 ml). La hoja al contener sólo un 3% de aceite esencial como máximo, requeriría la ingesta de 100-700 para obtener el mismo resultado fatal. Aplicado sobre la piel puede ocasionar dermatitis de contacto.

Otros componentes del aceite que pueden resultar tóxicos son el *benzaldehído*, *borneol*, *butiraldehído*, *ácido butírico*, entre otros.⁶

1.7.13 Contraindicaciones

No se recomienda en embarazo (el *eucaliptol* ha demostrado atravesar la placenta en roedores), lactancia y niños menores de dos años. La Comisión de Alemania contraindica su empleo, además, en enfermedades inflamatorias gastrointestinales, de las vías biliares y en hepatopatías graves. No se recomienda emplear preparados de eucalipto sobre áreas de la cara y nariz de niños y jóvenes. Deberá evitarse la preparación de aceite esencial en niños pequeños (salvo expresa decisión facultativa), debido a la potencial toxicidad sobre el SNC y tracto gastrointestinal (Fetrow C. y Ávila J., 2001).⁶



1.7.14 Interacciones medicamentosas

La esencia de eucalipto produce a nivel hepático un incremento en la velocidad de metabolización (al activar al citocromo P450) por inducción enzimática sobre ciertos fármacos, a las cuales le haría perder su eficacia. Ello ha podido constatarse *in vitro* y en humanos (Jori A. et al., 1970).

Tampoco se recomienda su administración junto a sedantes, analgésicos o anestésicos. Asimismo puede interferir con los tratamientos hipoglucemiantes en pacientes diabéticos (Newall C. et al., 1996).⁶

1.7.15 Preparados, vías de administración y dosis

- **Infusión:** 1 cucharada de hojas en 150 ml de agua. Dosis 3 tazas diarias. La OMS y la Comisión "E" preconizan para la hoja 4-6 g/día.
- **Tintura:** relación 1:8 en etanol al 35%. La dosis es de 1-3ml. La Comisión "E" de Alemania recomienda 3-9 g de tintura diarios.
- **Jarabe:** se prepara al 10% del extracto fluido, administrándose 3-4 cucharaditas diarias.
- **Aceite esencial:** según la Farmacopea Británica, la dosis oral tanto para el aceite esencial como para el cineol (*eucaliptol*) es de 0,05-0,2 ml. Se dosifica a razón de 1-3 gotas, 2-3 veces al día. La OMS recomienda 0,3-0,6 ml.
- **Extracto seco:** se prepara en relación 5:1, prescribiéndose hasta 1 g diarios, repartido en 2-3 tomas.
- **Extracto fluido:** relación 1:1, a razón de 20- 30 gotas, 2-3 veces al día.
- **Supositorios:** bajo la norma de supositorios: 0,1-0,4 g de esencia por unidad, a razón de 1-3 diarios.



- **Uso externo:** la OMS recomienda 30 ml de aceite en 500 ml de agua tibia, aplicar por vía externa. Para preparaciones hidroalcohólicas, con un 5-10% de aceite esencial.
- **Inhalaciones:** se pueden preparar en base a la infusión o con la esencia (12 gotas en 150 ml de agua hirviendo). No practicar inhalaciones a menores de 2 años.
- **Aerosoles:** 3-5 gotas de aceite esencial por cada 50 ml de preparado.⁶



1.8 JUSTIFICACIÓN

La utilización de sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades, incluidas las de etiología infecciosa, constituye en la actualidad un desafío en la medicina y se ofrece como una alternativa o bien complemento a la profesional, especialmente en aquellas en donde no existe un remedio adecuado, aunado al problema que enfrentan los tratamientos médicos frente a la resistencia bacteriana ocasionada por el uso indiscriminado de antibióticos. Las infecciones bacterianas, se han convertido en un problema de salud importante en todo el mundo. Por esta razón es preciso investigar y experimentar con la fitoterapia, caso de *Eucalyptus globulus* que por sus propiedades antimicrobianas nos brinda nuevos conocimientos para proponer nuevas alternativas para ser empleando como un producto de origen vegetal.



2 HIPOTESIS

Si el extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* presenta una actividad antimicrobiana contra las bacterias (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*) entonces podríamos proponerlo como una alternativa para el tratamiento de infecciones bacterianas.

3 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* frente a bacterias de importancia médica, empleando el método de Mosmann y microscopía electrónica.



3.1 Objetivos particulares

- ❖ Obtener a *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* puras e identificadas empleando pruebas bioquímicas para poder utilizarlas con seguridad en el ensayo.
- ❖ Obtener el extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* con calidad microbiológica.
- ❖ Utilizar el método calorimétrico de Mosmann (MTT) para dilucidar de manera cualitativa la MIC de *Eucalyptus globulus* en las bacterias antes mencionadas.
- ❖ Obtener las Concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) que presenta *Eucalyptus globulus* utilizando el método de microdilución para establecer la actividad del extracto frente a *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.
- ❖ Determinar el efecto bactericida y/o bacteriostático que ejerce el extracto *Eucalyptus globulus* en *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*, utilizando una prueba cualitativa.
- ❖ Emplear la Microscopia Electrónica de Transmisión para establecer el posible daño generado por el extracto *Eucalyptus globulus* en cada una de las bacterias y compararlo con un control.



4 MATERIAL

Para el estudio experimental *in vitro* las bacterias fueron facilitadas por el cepario de Ciencias de la Salud Humana y el laboratorio número 10 de Microbiología Experimental (Posgrado), ambos ubicados en FES-Cuautitlán Campo 1.

4.1 Cepas bacterianas utilizadas

- *Bacillus cereus*
- *Staphylococcus aureus*
- *Salmonella typhi*
- *Escherichia coli*
- *Candida albicans*

4.2 Extracto a evaluar

- Extracto etanólico de eucalipto fue donado por EXTRACTOS SIGMA (Ver apéndice 9.4 hoja técnica).

4.3 Equipo de laboratorio

- Estufa bacteriológica (RIOSSA)
- Autoclave (All American Modelo 1925X)
- Campana de flujo laminar (VELO)
- Espectrofotómetro(SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR Modelo FLX800)
- Horno Pasteur (RIOSSA Modelo HS-41)
- Vortex (SCIENTIFIC INDUSTRIES)
- Centrífuga
- Parrilla eléctrica (NOVA II)



- Microscopio óptico (Olympus Modelo CHS)
- Microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM 100S)
- Refrigerador (IEM)

4.4 Material general de laboratorio

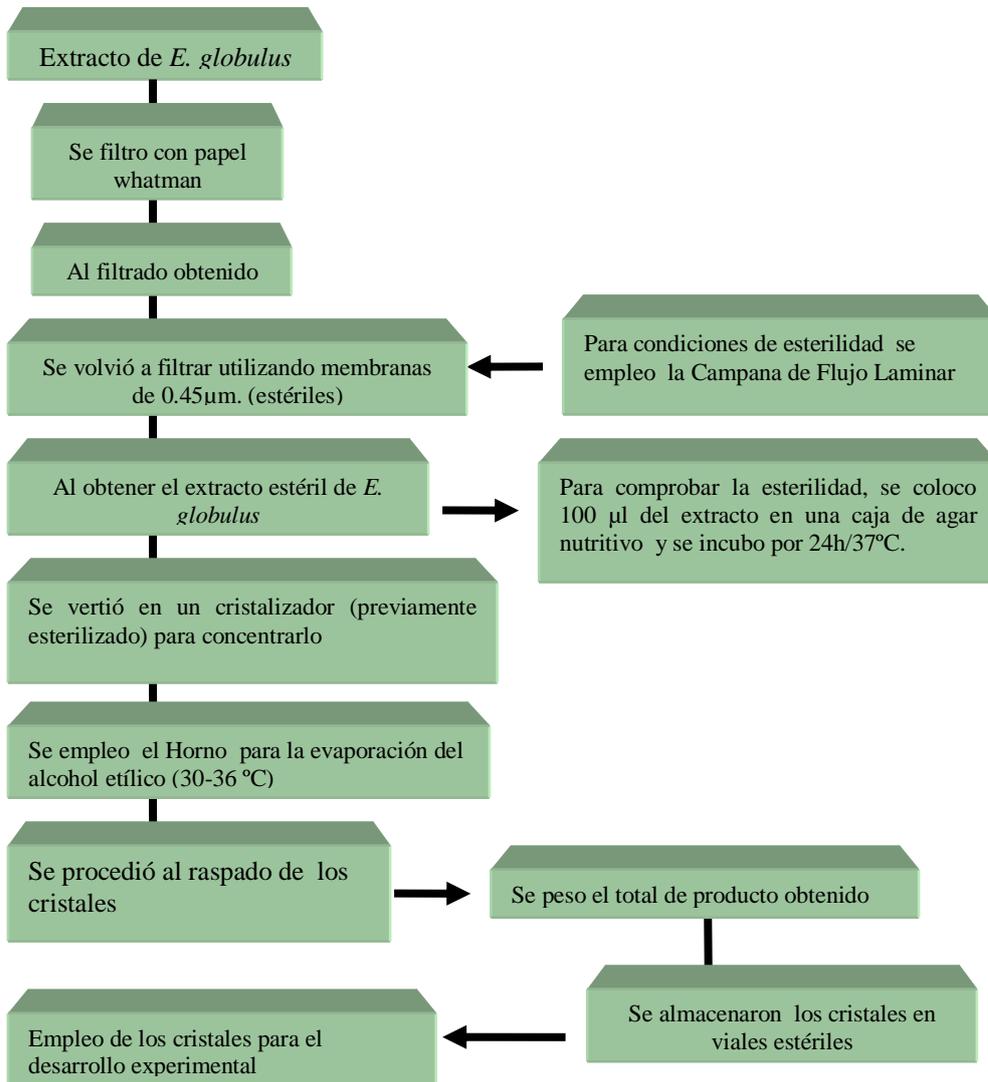
El material de uso común usado para el proyecto fue:

- Papel filtro (Whatman)
- Matraces Erlenmeyer de 250ml y 1Lt (Pirex)
- Membranas de filtración Millipore de 0.45 micras
- Cristalizador (Pyrex)
- Pipetas graduadas estériles de 10 ml (Kimax)
- Pipetas volumétricas estériles de 2 ml (Kimax)
- Cajas Petri (Pyrex)
- Espátula y gradillas
- Tubos de ensaye con tapón de rosca estériles de 10 ml (Kimax)
- Micropipeta de 100 μ l (SAMPLER SYSTEM)
- Puntas estériles para micropipeta de 100 μ l
- Guantes estériles
- Asas de platino
- Hisopos estériles
- Mechero bunsen
- Papel aluminio
- Frasco ámbar con tapón de rosca estéril de 10 ml
- Parafilm, etc.

5 Metodología

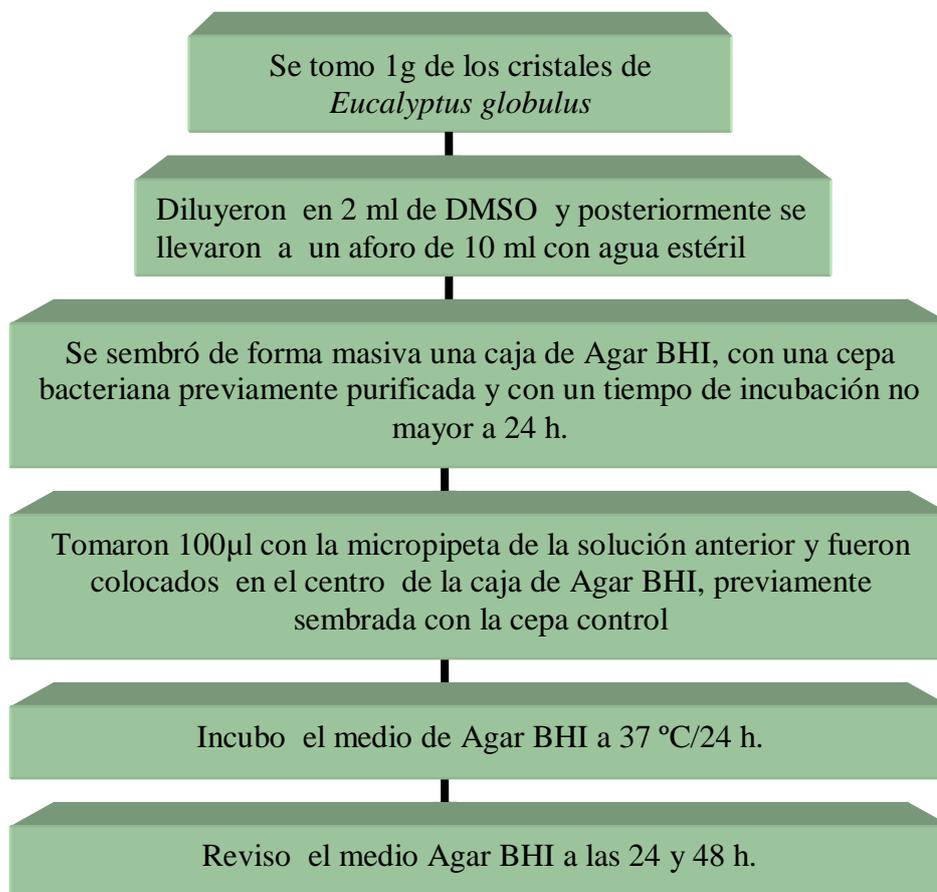
5.1 Obtención de cristales

Para la obtención de los cristales de *Eucalyptus globulus* a partir del extracto etanólico se empleó la metodología que se muestra en el siguiente diagrama de flujo:



5.2 Preparación de la solución problema

Para poder emplear la solución de *Eucalyptus globulus* en la parte experimental del ensayo a una concentración de 50,000 $\mu\text{g/ml}$ y corroborar su calidad microbiológica, se empleó la siguiente metodología mostrada en el diagrama:



5.3 Identificación de cepas bacterianas

La identificación se realizó utilizando agares ricos, selectivos y diferenciales para su crecimiento; además de emplearse pruebas bioquímicas primarias y secundarias



para poder determinar el género y la especie en cada una de las cepas utilizadas (Ver apéndice 9.3).

5.4 Preparación de inóculos bacterianos para el ensayo

Para la preparación de los inóculos bacterianos se procedió en primer lugar a la incubación de las bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhi* en las condiciones específicas (incubación no mayor de 18 a 24 h).

Obtenidos los cultivos y comprobando que se trata de cultivos puros, se preparo una suspensión de cada uno de ellos, tomando entre 2 y 3 colonias de cada bacteria para inocular un tubo de 5 ml de caldo BHI a doble concentración.

Posteriormente el inóculo se ajusto a la concentración correspondiente al 0,5 de la escala del nefelómetro de Mac Farland (10^6 - 10^7 UFC/ml).

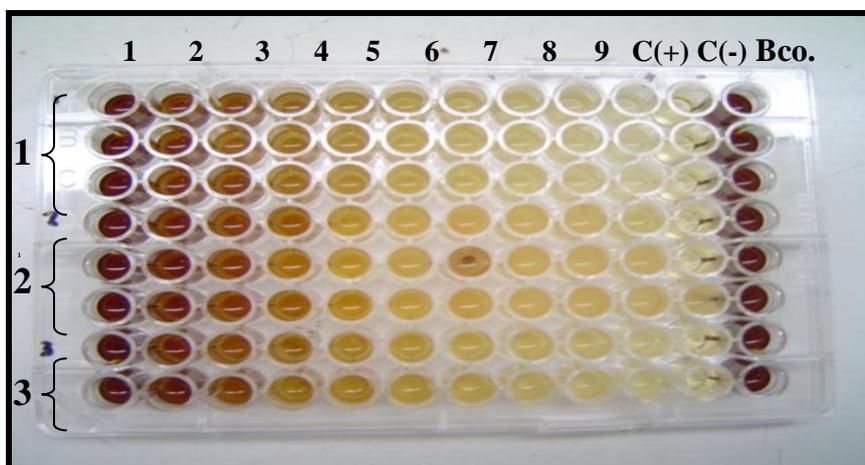
5.5 Ensayo en microplaca

El ensayo se realizó en una microplaca de 96 pozos estéril. Esta cuenta con 12 columnas (las primeras 9 columnas correspondieron a la dilución correspondiente del extracto, mientras que en la columna 10 y 11 se colocaron a los controles positivos y negativos y la columna 12 se tomo para el blanco), las filas están representadas por letras A - H. El ensayo por bacteria se realizó por triplicado en cada microplaca, tomando para ello tres filas por bacteria. (Ver fig. 9).



- En los pozos de la columna 1 y 2 se depositaron 100 μ l del extracto hidroalcohólico *Eucalyptus globulus*, posteriormente se adicionaron 100 μ l SSF estéril a los pocillos de la columna 2-9 y se prepararon las diluciones seriadas a partir de la segunda columna.
- Por último se pusieron 100 μ l del microorganismo previamente estandarizado, partiendo de la primera columna a la nueve.
- Se colocaron 100 μ l de SSF estéril en el pozo de la columna número 10 (*control positivo*) e inmediatamente después de adición 100 μ l de la bacteria a probar previamente estandarizada.
- En el pozo de la columna número 11 (*control negativo*), se colocaron 100 μ l de SSF y posteriormente agregaron 100 μ l de caldo BHI doble concentración sin bacterias.
- Para finalizar en los pozos de la columna 12 (*blanco*) se pusieron 100 μ l de caldo BHI doble concentración sin bacterias y posteriormente se adicionaron 100 μ l del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus*.
- Al finalizar el ensayo cada pozo presento un volumen final de 200 μ l. El tiempo de incubación fue de 37°C en aerobiosis por espacio de 24 horas.

Figura 9. Ejemplo de ensayo en microplaca utilizando diferentes concentraciones de *Eucalyptus globulus*





1. *Candida albicans*
2. *Salmonella typhi*
3. *Escherichia coli*

5.6 Efecto bactericida/bacteriostático

Una vez transcurrido el tiempo de incubación (37°C/24 h), se tomaron de cada uno de los pozos de la microplaca una asada y se inoculo en un medio de Agar BHI. Posteriormente se incubo a las condiciones de 37°C/24 h. Se observo el efecto bactericida o bacteriostático.

Este procedimiento debe de realizarse antes de adicionar a cada uno de los pozos el reactivo de MTT.

5.7 Método cualitativo de MOSMANN (MTT)

Este método se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la función mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Este método fue desarrollado por *Mosmann* en 1983 siendo modificado en 1986 por *Francois Denizot* y *Rita Langa*.²³



Durante el ensayo se adiciono a cada uno de los pozos de la microplaca 5 μ l del reactivo MTT (método de Mosmann modificado), se incubo nuevamente la microplaca a 37°C/2 horas y se observo la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano a través del cambio de color.

Finalmente se realizo la lectura de la microplaca en el Elisómetro a 590 nm de longitud de onda.

5.8 Microscopia Electrónica de Transmisión (MET)

Con la finalidad de observar los posibles efectos del extracto sobre las bacterias, se procedió a la preparación de los cultivos y a su posterior observación bajo el microscopio electrónico de transmisión, siguiendo la metodología que se describe a continuación:

5.8.1 Preparación de las bacterias

- Preparar 40 ml de caldo BHI a doble concentración.
- Obtener las bacterias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi* y *Candida albicans*), con un tiempo no mayor de 24 h de crecimiento.
- Numerar 2 tubos (1, 2) con capacidad de 10 ml. El tubo número 1 será para la muestra problema y el tubo número 2 se empleara para el control de muestra no tratada.



- En el tubo número 1 se adicionaron 2.5 ml del extracto hidroalcohólico concentrado más 2.5 ml de caldo BHI doble concentración con bacteria estandarizada al 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland.
- En el tubo número 2 se colocaron 2.5 ml de SSF estéril, más 2.5 ml de caldo BHI, previamente inoculado con la bacteria problema al 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland.
- Se incubaron los dos tubos a 37°C/24 h, en la estufa bacteriológica.
- Pasado el tiempo de incubación, se realizó a los dos tubos centrifugaciones a 2000rpm/10 min. empleando para los lavados SSF estéril, desechando el sobrenadante (observar el sobrenadante claro).
- Posteriormente se adiciono a cada tubo, 3 ml del reactivo de Karnovsky, dejando reposar durante hora; para posteriormente centrifugar a 2000 rpm/30 min.
- Para finalizar se elimino el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con 3 ml de Buffer de fosfatos (ver apéndice).
- La muestra se ajusto a 10^6 - 10^7 UFC/ml, igualando para ello al 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland.³⁵

5.8.2 Preparación de rejillas con membranas fomvar

- Las rejillas se deben lavar con acetona y esperar a que sequen.
- Se preparo una solución fomvar al 1% con cloroformo, si se hace con parlodion se prepara al 1% de parlodion en acetato de amilo.
- Llenar un vaso de precipitado con capacidad de un 1Lt, con agua destilada (Baño María).
- Se impregno un portaobjetos con fomvar, y se dejo reposar hasta observar la película seca.



- Posteriormente se cortaron las cuatro orillas del portaobjetos, se sumergió en el baño María, poco a poco hasta que se logró separar la película plástica.
- Las rejillas fueron colocadas sobre la membrana y posteriormente recogidas con papel filtro.³⁵

5.8.3 Técnica de Tinción Negativa

- Se colocó una gota de suspensión bacteriana sobre un papel parafilm, y encima de ésta se colocaron 2 rejillas con membrana para que se adsorbiera la muestra durante un tiempo aproximado de 20 minutos.
- Se tomaron las rejillas y el exceso se fue eliminado con papel filtro.
- Las rejillas fueron lavadas con SSF y el exceso de agua, se eliminó con papel filtro.
- Posteriormente se llevó a cabo la tinción de las rejillas con ácido fosfotúngstico (AFT solución al 1% con pH = 7.2), durante 1 minuto.
- Se lavaron las rejillas para eliminar el exceso de colorante con SSF estéril y dejaron secar a temperatura ambiente o en estufa a 35 °C/20 min.
- Una vez seca la rejilla se observó en el Microscopio Electrónico de Transmisión.
- Se tomaron fotografías para observar la morfología bacteriana.³⁵

6 RESULTADOS

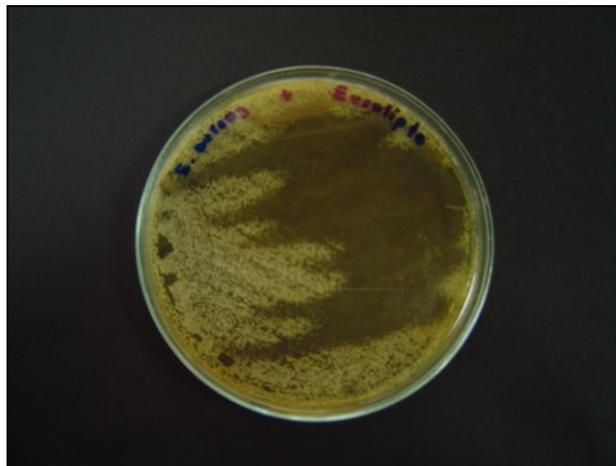
6.1 Obtención de cristales de *Eucalyptus globulus*

Después de corroborar la esterilidad del extracto etanólico de Eucalipto (donado por extractos SIGMA S.A de C.V.), este se vertió en un cristalizador previamente esterilizado para concentrarlo y fue colocado en Horno a una temperatura de 30-36°C. Posteriormente se llevo a cabo el raspado de los cristales de los cuales se obtuvo un total de 6,716 g/L de extracto, estos fueron colocados en viales estériles para proceder a preparar la solución problema.

6.2 Efecto antibacterial de la solución problema

En la figura 10 se aprecia el efecto antimicrobiano que mostró la solución problema la cual se preparo a una concentración de 50,000 µg/ml, se colocaron 100 µl en el centro de una caja de agar nutritivo, el cual fue sembrado con una cepa bacteriana cuyo tiempo de incubación era menor a 24 horas.

Figura 10. Efecto antibacterial de la solución problema





6.3 Evaluación del efecto bactericida/bacteriostático de *Eucalyptus globulus* en las bacterias

Después del tiempo de incubación de la microplaca (37°C/24hrs) y antes de adicionar a cada pozo el reactivo MTT se tomo una asada de cada pocillo, para observar el efecto que presenta el extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* a diferentes concentraciones sobre las cinco bacterias. El resultado obtenido se muestra en la siguiente tabla y algunos de los ejemplos de dicho efecto se aprecian mejor en las figuras 11 y 12.

Tabla No 5. Efecto Bactericida/Bacteriostático del extracto hidroalcohólico *Eucalyptus globulus*

Bacteria	Pozo	Concentración µg/ml	Efecto	
			Bactericida	Bacteriostático
<i>E.coli</i>	1	50,000	✓	
	2 a 9	25,000 - 195.31		✓
<i>Salmonella typhi</i>	1	50,000	✓	
	2 a 9	25,000 - 195.31		✓
<i>Bacillus cereus</i>	1 a 3	50,000 -12,500	✓	
	4 a 9	6,250 - 195.31		✓
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 a 3	50,000 -12,500	✓	
	4 a 9	6,250 - 195.31		✓
<i>Candida albicans</i>	1 a 2	50,000 - 25,000	✓	
	3 a 9	12,500 - 195.31		✓

Fuente: Base de datos

En estas fotografías se puede ver como fue inoculado cada pocillo de la microplaca con la dilución correspondiente en agar BHI durante 24hrs/37°C. Algunos ejemplos son los siguientes:

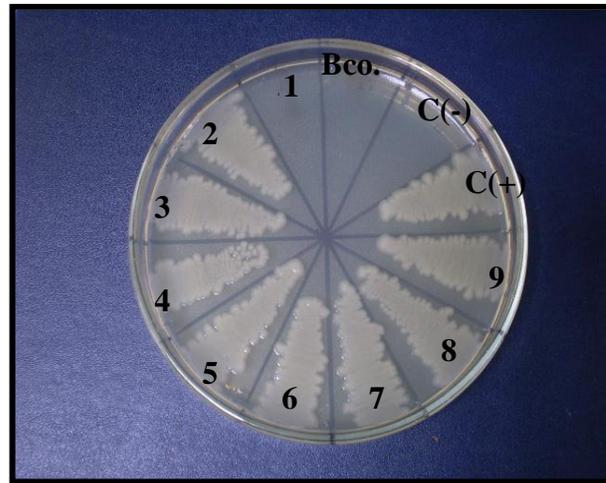


Figura 11. Efecto bactericida y/o bacteriostático de *Eucalyptus globulus* en *E. coli*

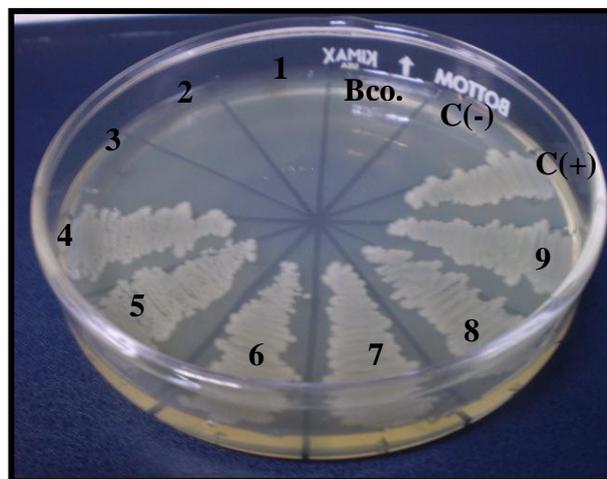


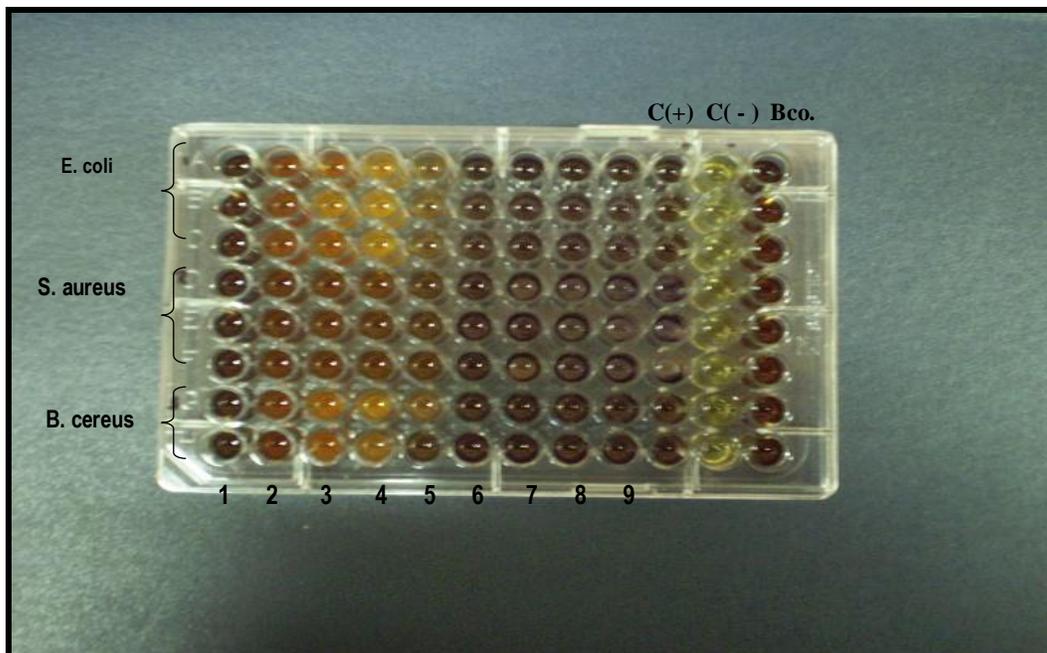
Figura 12. Efecto bactericida y/o bacteriostático de *Eucalyptus globulus* con *Bacillus cereus*.

6.4 Evaluación del efecto inhibitorio del extracto sobre las bacterias

Después de determinar el efecto bactericida/bacteriostático para cada bacteria, se determino el efecto inhibitorio de *Eucalyptus globulus* sobre las cinco bacterias. En la figura 13, podemos ver que después de adicionarle 5 μ l del reactivo MTT a cada uno de los pocillos de la microplaca y esperado el tiempo de incubación (2hrs/37 °C) se puede apreciar de manera cualitativa la reducción metabólica del reactivo a través del cambio de color (amarillo-azul), poniendo en evidencia la proliferación bacteriana

Finalmente se realizo la lectura de la microplaca en el Elisómetro a 590 nm de longitud de onda proporcionando resultados cuantitativos en valores de absorbancia los cuales coinciden con los resultados cualitativos mostrados en la figura 13.

Figura 13. Ejemplo de ensayo en microplaca con reactivo de MTT para establecer el efecto inhibitorio frente a los microorganismos ensayados.





Como se aprecia en la tabla 6, las bacterias *S. typhi*, *C. albicans*, *S. aureus* y *B. cereus* muestran mayor sensibilidad al extracto de *E. globulus* presentando una MIC en la concentración 3,125 µg/ml; mientras que *E. coli* tuvo una MIC de 6,250 µg/ml y con ello una mayor resistencia que el resto de las bacterias.

Tabla No 6. Resultados cualitativos de inhibición en microplaca con el extracto Hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus*

Concentración µg/ml	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Candida albicans</i>
50,000	-	-	-	-	-
25,000	-	-	-	-	-
12,500	-	-	-	-	-
6,250	-	-	-	-	-
3,125	-	-	+	-	-
1562.5	+	+	+	+	+
781.25	+	+	+	+	+
390.62	+	+	+	+	+
195.31	+	+	+	+	+
Control (+)	+	+	+	+	+
Control (-)	-	-	-	-	-
Blanco	-	-	-	-	-

Fuente: Base de datos

(-) Inhibición de crecimiento de la bacteria, (+) Desarrollo de crecimiento de la bacteria



6.5 Efecto del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* con *E. coli*

Las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* que se emplearon en la bacteria *E. coli* se muestran en la tabla No. 7, así como las absorbancias obtenidas en el Elisómetro. En ella podemos ver que en las concentraciones de 3,125; 1,562.5 y 390.62 ($\mu\text{g/ml}$) se presentó una absorbancia mayor con respecto al control positivo.

Tabla 7. MIC de *Eucalyptus globulus* con *E. coli*

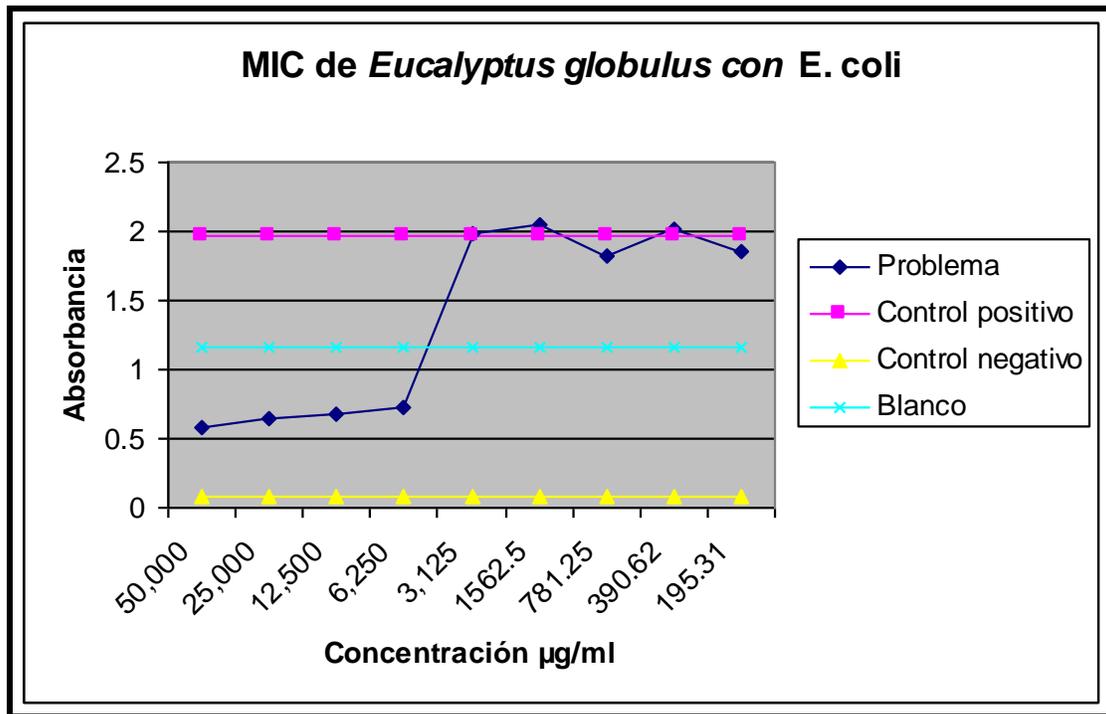
Pozo	concentración	Abs. problema	Abs. C(+)	Abs. C(-)	Abs. Blanco
1	50,000	0.575	1.96	0.0772	1.1655
2	25,000	0.648	1.96	0.0772	1.1655
3	12,500	0.672	1.96	0.0772	1.1655
4	6,250	0.7212	1.96	0.0772	1.1655
5	3,125	1.9919	1.96	0.0772	1.1655
6	1,562.5	2.0546	1.96	0.0772	1.1655
7	781.25	1.828	1.96	0.0772	1.1655
8	390.62	2.0239	1.96	0.0772	1.1655
9	195.31	1.8553	1.96	0.0772	1.1655

Fuente. Base de datos

Promedio de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 590 nm.



Grafica 1. Absorbancia con respecto a la concentración de *Eucalyptus globulus* con *E. coli*.



Fuente Base de datos

Se observa que la MIC de *Eucalyptus globulus*, se presenta a una concentración de 6,250µg/ml (ppm) puesto que a partir de la siguiente concentración se nota claramente la proliferación bacteriana; debido que en algunas concentraciones se presenta un crecimiento mayor al control positivo.



6.6 Efecto del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* con *Bacillus cereus*

En esta tabla podemos ver que a partir de los pozos 6, 7, 8 y 9 la absorbancia con respecto a la concentración del extracto de *Eucalyptus globulus* aumenta con relación al control positivo, indicando con ello un crecimiento microbiano, siendo más notorio en la grafica No 2.

Tabla 8. MIC de *Eucalyptus globulus* con *Bacillus cereus*

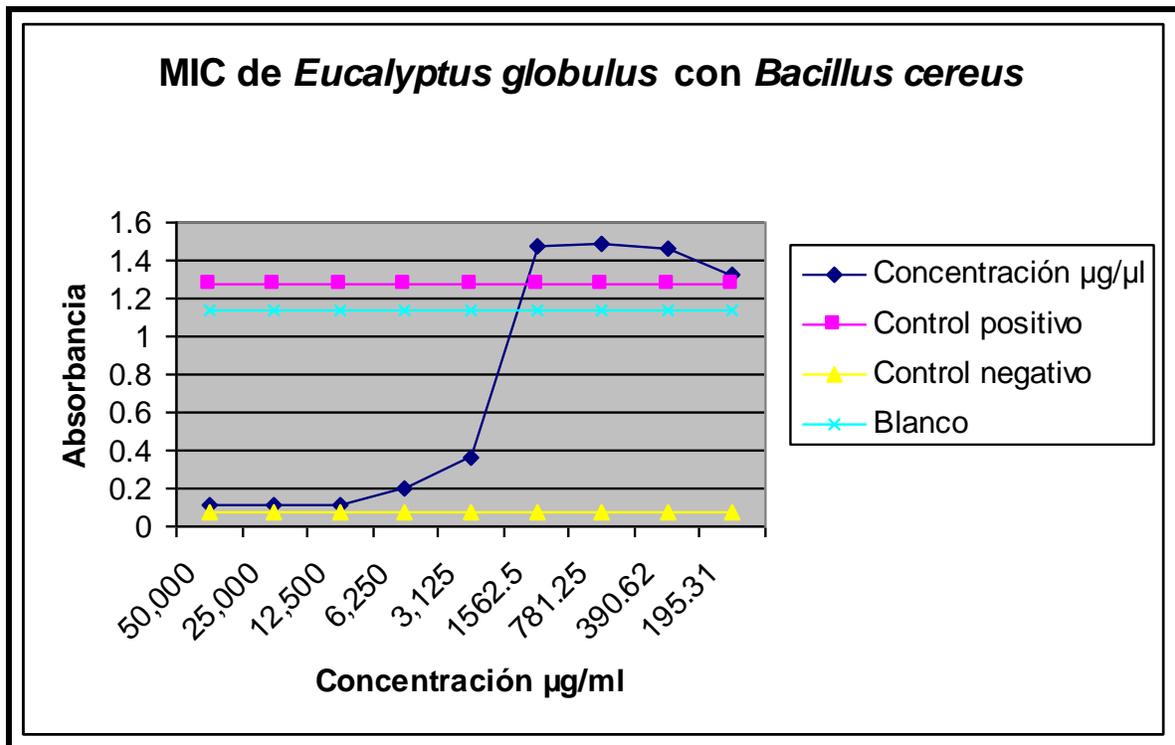
Pozo	Concentración	Abs. Problema	Abs. C(+)	Abs. C(-)	Abs. Blanco
1	50,000	0.11	1.2759	0.0727	1.137
2	25,000	0.114	1.2759	0.0727	1.137
3	12,500	0.1131	1.2759	0.0727	1.137
4	6,250	0.1958	1.2759	0.0727	1.137
5	3,125	0.3675	1.2759	0.0727	1.137
6	1562.5	1.4783	1.2759	0.0727	1.137
7	781.25	1.4891	1.2759	0.0727	1.137
8	390.62	1.4569	1.2759	0.0727	1.137
9	195.31	1.321	1.2759	0.0727	1.137

Fuente. Base de datos

Promedio de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 590 nm.



Grafica 2. Absorbancia con respecto a la concentración de *Eucalyptus globulus* con *B. cereus*



Fuente Base de datos

Se aprecia que la concentración óptima para que el extracto de *Eucalyptus globulus* pueda inhibir a *Bacillus cereus* se encuentra en 3,125 µg/ml, notando que a concentraciones menores del extracto la absorbancia aumenta significativamente, indicando con ello el crecimiento de la bacteria.



6.7 Efecto del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* en *Staphylococcus aureus*.

En este ensayo se determina que la concentración mínima a la cual el extracto es capaz de inhibir a *S. aureus* se presenta en el pozo 5 el cual presenta una concentración de 3,125 µg/ml, nótese que después de este pozo (6, 7, 8, y 9), las absorbancias aumentan pero aún son menores que el control positivo.

Tabla 9. MIC de *Eucalyptus globulus* con *Staphylococcus aureus*

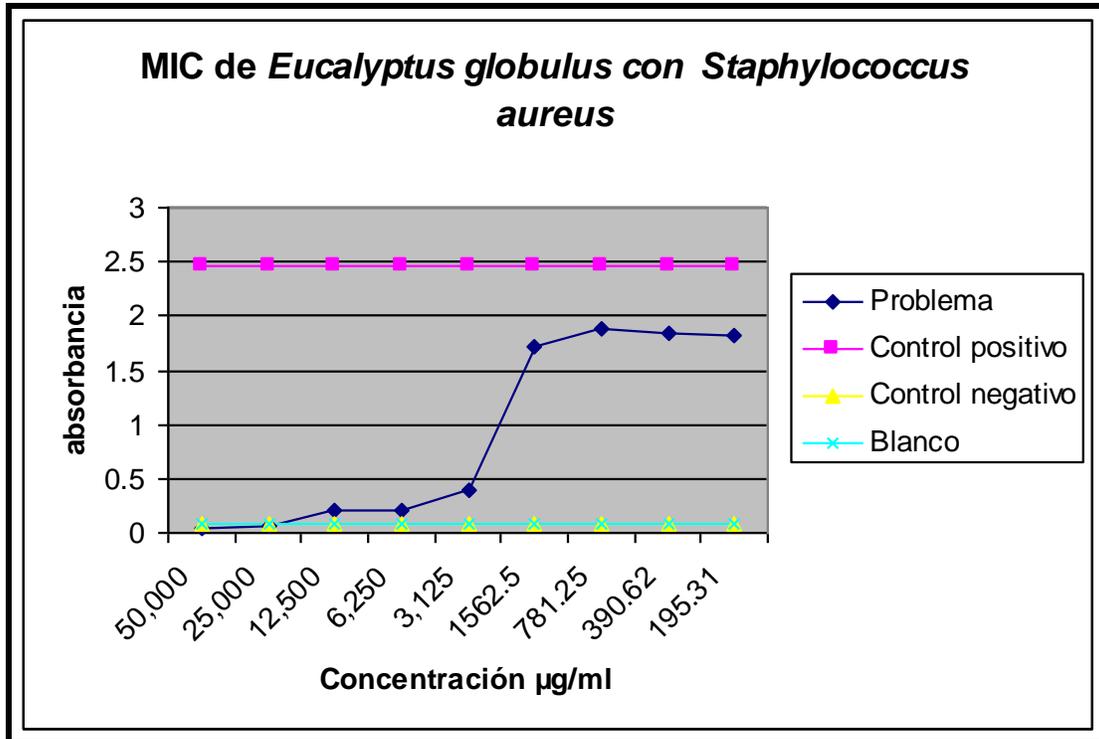
Pozo	Concentración	Abs. Problema	Abs. C(+)	Abs. C(-)	Abs. Blanco
1	50,000	0.0496	2.46695	0.0749	0.0749
2	25,000	0.0692	2.46695	0.0749	0.0749
3	12,500	0.2017	2.46695	0.0749	0.0749
4	6,250	0.2080	2.46695	0.0749	0.0749
5	3,125	0.3831	2.46695	0.0749	0.0749
6	1562.5	1.7163	2.46695	0.0749	0.0749
7	781.25	1.8927	2.46695	0.0749	0.0749
8	390.62	1.8422	2.46695	0.0749	0.0749
9	195.31	1.8266	2.46695	0.0749	0.0749

Fuente. Base de datos

Promedio de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 590 nm.



Grafica 3. Absorbancia con respecto a la concentración de *Eucalyptus globulus* con a *S. aureus*



Fuente Base de datos

En este grafico se muestran los resultados del extracto frente a *S. aureus*, indicando que la MIC se presenta a la concentración de 3,125 µg/ml.

6.8 Observaciones obtenidas en microscopio electrónico

Las micrografías obtenidas de microscopio electrónico a 10 000 magnificaciones nos permite observar la morfología de las bacterias no tratadas con respecto a las muestras tratadas con extracto. Se puede apreciar (figura 14) para *E. coli* correspondiente a la muestra no tratada una morfología característica bien definida. Mientras que para la muestra tratada con extracto concentrado (figura 15) se observa una forma ligeramente esférica de la bacteria (posible formación de un esferoblasto) lo que ocasiono una lisis provocada por la inestabilidad de la pared y con ello la liberación de su contenido, efecto que produce el extracto.



Figura 14. Fotografía de *E. coli* no tratada con extracto hidroalcohólico, de *Eucalyptus globulus* concentrado a 10 000 magnificaciones.



Figura 15. Fotografía de *E. coli* tratada con extracto hidroalcohólico, de *Eucalyptus globulus* concentrado a 10 000 magnificaciones.

Al realizar las observaciones en microscopio electrónico a 10 000 magnificaciones en *Bacillus cereus* se observa en la muestra no tratada (figura 16) una morfología normal, tamaño uniforme y bordes bien definidos. Mientras para la muestra tratada con extracto concentrado (figura 17) se aprecia una desorganización total de su pared celular, además de un tamaño y forma irregular.



Figura 16. Fotografía de *B. cereus* no tratado con extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* a 10 000 magnificaciones



Figura 17. Fotografía *B. cereus* tratado con extracto hidroalcohólico *Eucalyptus globulus* a 10 000 magnificaciones



7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la actualidad, la resistencia bacteriana es un problema muy grave al que se enfrentan los médicos. Desde el punto de vista epidemiológico, es un riesgo importante que la resistencia antibiótica que emerge en un lugar pueda diseminarse a otro, sobre todo en la misma ciudad e incluso a lugares distantes. Esta diseminación puede deberse a una falla en las medidas higiénicas de los hospitales, a la presión selectiva creada por el exceso de uso de antibióticos y a elementos genéticos móviles que pueden codificar los mecanismos de resistencia bacteriana.⁴¹

Las consecuencias del uso indiscriminado de antibióticos no han sido demostradas claramente, pero es muy probable que este uso influya en una hospitalización más prolongada, selección de organismos resistentes y aumento considerable en los costos para las instituciones. Aunque las infecciones bacterianas continúan causando mortalidad y morbilidad importantes a nivel mundial, no existen criterios estándar para determinar la relación entre infección y muerte, o la contribución de la resistencia a la mortalidad y a la morbilidad.⁴¹

La historia de la medicina recoge la experiencia de alquimistas, boticarios y curanderos desde antes del siglo XI, ellos preparaban pócimas para curar las más variadas enfermedades y esta materia prima era obtenida principalmente de las plantas.⁴⁸

El uso de la medicina tradicional ha tenido altas y bajas en el mundo occidental, sin embargo, a pesar del empuje de la medicina moderna, siempre hay un regreso a los orígenes, resurgiendo en forma de medicina homeopática, naturista, herbolaria



y tradicional o alternativa. Por ello, la Organización Mundial de la Salud en voz del Dr. Maller, su presidente en 1976, exhortó a la comunidad médica a someter a juicio experimental la medicina tradicional, asimismo, reconoció la necesidad de compilar la información disponible como vía para solucionar problemas de salud en varios países, para disponer de una fuente de información para tamizajes farmacológicos y fitoquímicos y para evitar la desaparición de los valores culturales⁴⁸

Es por ello que en el presente trabajo se utilizó el extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus*. Eucalipto es una planta perteneciente a la familia Myrtaceae cuyo aceite tiene la propiedad antibacteriana como antifúngica, sin embargo la eficacia del aceite y de su extracto dependen de su composición química.⁵⁰ Al igual que Libertad Alzamora et al. (2001),⁴⁹ se empleó para su extracción la técnica de destilación por arrastre de vapor de agua. Antes de su utilización el extracto fue filtrado con papel whatman 0.45 μm ; Liu B. Humberto et al. (2000) Además de utilizar el papel whatman 0.5 μm , centrifugó el extracto a 3000rpm para retirar por completo cualquier materia extraña. Posteriormente para corroborar la esterilidad se depositaron 100 μl en agar BHI y se sembraron de forma masiva, registrando crecimiento negativo después del tiempo de incubación (24 y 48 h/37°C) demostrando con ello que esta técnica puede ser una forma viable, sencilla y económica para los compuestos que no resisten altas temperaturas.

Para obtener al extracto de forma seca, éste fue colocado en horno teniendo un rango de temperatura de 30 y 36°C para la evaporación del solvente. Vera y Gardea en 2006, proponen para la evaporación un rotavapor; sin embargo nuestro método permite optimizar tiempo además de que ofrece ser una técnica muy sencilla. Una desventaja de nuestro método es la forma de recolectar la materia seca, ya que



Eucalyptus globulus es muy higroscópico por lo que presenta una consistencia pegajosa y pastosa, lo que dificulta su almacenamiento y manejo en general. Sin embargo una ventaja es que en rendimiento se obtuvo 6,716 g de muestra, cantidad considerable a partir de un litro.

Para evaluar la actividad antimicrobiana del extracto la materia seca que se obtuvo se disolvió con DMSO y se aforo a 10 ml utilizando agua estéril para tener una concentración de la solución problema de 50,000 µg/ml. Una vez preparada la solución se enfrentó con las cepas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi* y *Candida albicans*, tomando de referencia a Libertad Alzamora et al. (2001) quien investigó la actividad antimicrobiana de aceites esenciales entre ellos *Eucalyptus globulus* y Liu B. Humberto et al. (2000)⁵⁰ quien utilizó algunas de estas bacterias para evaluar la actividad antimicrobiana del extracto de eucalipto y *Caesalpinia "tara"*.

El método de microdilución en caldo se ha venido usando para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC's) de extractos de plantas, Carson et al. (1995) describen la MIC como la menor concentración que mantiene o reduce la viabilidad del inóculo luego de 24 horas de contacto.¹ Nosotros empleamos diluciones en progresión geométrica en base 2, utilizando como medio de cultivo BHI, Shiva Ramayoni (2007)¹ menciona que para la evaluación de MIC's en extractos de plantas se pueden utilizar caldo Infusión Cerebro Corazón, caldo Nutritivo, caldo Triptona Soya y en ocasiones cuando el microorganismo es muy exigente se añaden suplementos como suero. Al no existir una reglamentación y/o estandarización de la metodología para evaluación de la capacidad inhibitoria de extractos de plantas como se establece para antibióticos, nosotros decidimos emplear microdilución por ser un método sencillo de realizar, además permite optimizar material y espacio, se requiere menor cantidad de medio cultivo, de



extracto y de inóculo bacteriano ya que con respecto al método de macrodilución en tubo, suele ser más rápida por ser menos engorrosa aún cuando ambas generen datos cuantitativos. Mientras que la técnica de difusión de discos en agar utilizada por Shiva Ramayoni (2007) para evaluar la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos, tanto en bacterias como en hongos tiene la desventaja de proporcionar sólo datos cualitativos.

Posteriormente para evidenciar el resultado obtenido en la microplaca, finalizado el tiempo de incubación 37°C en aerobiosis, por espacio de 18 a 24 horas, se empleo la técnica de Mosmann la cual emplea el colorante 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5 bromuro difeniltetrazolio (MTT) a una concentración de 5mg/ml, el cual es reducido por deshidrogenasas de células viables a formazan púrpura.²¹ Se ha utilizado en una variedad de ensayos que incluyen la cuantificación de linfocinas, citotoxicidad, proliferación y activación celular. Shiva Ramayoni (2007)¹ emplea una solución de sales de violeta de p-iodonitrotetrazolio (INT) a una concentración de 0,2 mg/ml, esta solución también actúa como indicador de actividad biológica dado que sus componentes actúan como aceptores de electrones y son reducidos, desencadenando un color cuando hay actividad de los microorganismos y quedando incoloro en caso contrario. Nosotros pudimos notar que después de adicionar MTT a cada unos de los pocillos de la microplaca se aprecio que todas las bacterias presentaron una MIC a la concentración de 6,125 µg/ml (ver tabla No. 6, apartado de resultados), a excepción de *E. coli* lo que concuerda con Alonso Jorge (2004)⁶ quien menciona que la mayor actividad antimicrobiana evidenciada por diferentes extractos alcohólicos de eucalipto se mostraron frente a microorganismos Gram (+) haciendo mención en *S. aureus*, *B. cereus*, entre otros.



Con respecto a los Gram (-) las cuales presentaron un espectro menor como *E. coli*. Sin embargo Libertad Alzamora et al. (2001).

Estos resultados se confirmaron al realizar la lectura de la microplaca en el lector de ELISA, los cuales simplemente corroboraron lo mostrado por el MTT.

Después del tiempo de incubación de la microplaca (37°C/24hrs) y antes de adicionar a cada pozo el reactivo MTT nosotros realizamos la prueba bactericida y/o bacteriostática (ver apartado de metodología) en cual pudimos apreciar que el extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* presenta un efecto principalmente bacteriostático debido que al colocar a las bacterias en medio BHI con condiciones de temperatura óptimas, estas presentan crecimiento, creemos que dicho efecto pueda deberse a que el extracto disminuye la síntesis proteica en las bacterias o bien pudiera evitar la reproducción por fisión binaria. Mientras que el efecto bactericida que ejerció principalmente en *B. cereus* y *S. aureus* se debe principalmente a los compuestos como son el 1,8 cineol, monoterpenos, taninos sesquiterpenos, flavonoides entre otros, los cuales creemos causan rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos (1,8 cineol) lo que ocasiona que las bacterias pierdan su control e integridad.

Finalmente para observar el daño a nivel estructural de la bacteria, se empleo la Técnica de Microscopia Electrónica de Transmisión en la cual podemos apreciar que las bacterias tratadas con extracto presentaron una inestabilidad a nivel de pared celular, lo cual creemos se deba al sinergismo que se presentan entre sus diversos compuestos ya que por separado presentan mucho menor actividad que cuando se encuentran juntos.



Por todo esto nosotros creemos que el extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* es un buen producto natural que puede ser empleado como una alternativa complementaria a la profesional en el tratamiento de infecciones bacterianas.



8 CONCLUSIONES

- Logramos obtener *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* puras e identificadas empleando pruebas bioquímicas para poder utilizarlas con seguridad en el ensayo.
- Se logro obtener el extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* con calidad microbiológica.
- Se empleo el método colorimétrico de Mosmann (MTT) y con ello logramos de manera cualitativa la MIC de *Eucalyptus globulus* en las bacterias antes mencionadas.
- Logramos obtener las Concentraciones Mínimas inhibitorias (MIC) que presenta *Eucalyptus globulus* utilizando el método de microdilución para establecer la actividad del extracto frente a *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.
- Fue posible determinar el efecto bactericida y/o bacteriostático que ejerce el hidroalcohólico extracto *Eucalyptus globulus* en *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Utilizando una prueba cualitativa.
- Se empleo microscopia electrónica de transmisión y nos permitió evidenciar el daño generado por el extracto de *Eucalyptus globulus* en cada una de las bacterias.



9. APÉNDICES

9.1 Composición y preparación de medios de cultivo

▪ Caldo Infusión Cerebro Corazón (BIOXON)

Cloruro de sodio	5,0 g
Dextrosa	2,0 g
Fosfato disodico	2,5 g
Infusión de Cerebro de ternera	7,7 g
Infusión de corazón de res	9,8 g
Peptona de gelatina	10,0 g

Disolver 37 g en un litro de agua destilada, reposar de 10 -15 minutos hasta la disolución completa, hervir hasta el punto de ebullición, verter en tubos de ensaye, estandarizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) 15 minutos, pH= 7.4±0.2

▪ Agar Infusión Cerebro Corazón (BIOXON)

Agar Agar	15,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Dextrosa	2,0 g
Fosfato disodico	2,5 g
Infusión de Cerebro de ternera	12,5 g
Infusión de corazón de res	5,0 g
Peptona especial	10,0 g



Disolver 52,0 g del medio en un litro de agua destilada, calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante un minuto para disolver por completo, estandarizar la autoclave a 121°C (15 libras de presión) 15 minutos. Enfriar a 45 - 50°C, vaciar en cajas de Petri estériles pH= 7.4±0.2

- **Solución Salina Fisiológica**

Disolver 0,9 g de NaCl en un litro de agua destilada, agitar frecuentemente para disolver por completo, verter en tubos de ensaye y estandarizar la autoclave a 121°C (15 libras de presión) 15 minutos.



9.2 Preparación de reactivos

- **MTT ó 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-dimetiltetrazolio (SIGMA 21 28)**

Disolver MTT en RPMI-1640 rojo de fenol, hasta una concentración de 5 mg/ml. Filtrar la solución con una membrana de 0.22 μ m. Guardar a una temperatura de congelación, hasta su uso.

- **Dimetil sulfóxido (SIGMA D-5879) DMSO.**

Se usa a la concentración que viene del fabricante.

- **Ácido Fosfotúgstico**

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

- **Glutaraldehído-paraformaldehído (Karnosky)**

Prepare una solución amortiguadora de fosfatos al 0.2 M o una solución de cacodilato al 0.2 N a pH 7,0. Prepare 20ml de una solución de paraformaldehído al 10% disolviendo 2 g de paraformaldehído en polvo en 20 ml de agua destilada calentando a 60-70°C mientras se agita vigorosamente (en campana de extracción de gases). Agregue unas gotas de NaOH 0.2 N hasta que la solución se vuelva transparente. Esperar a que se enfríe.

Ya fría la solución anterior se prepara el fijador

Amortiguador de fosfatos al 0.2 M -----50 ml.
Paraformaldehído al 10% en agua -----20 ml.
Glutaraldehído al 25% en agua -----10 ml.
Agua destilada hasta volumen final de -----100 ml.



9.3 Características morfológicas y bioquímicas de las bacterias

Bacillus cereus

- Bacterias Gram positivas, familia *bacillaceae*.¹⁵
- Aerobio y anaerobio facultativo.
- Esporulado: las esporas son centrales, forma elipsoide y al formarse en el interior de la célula dan lugar al hinchamiento de esta.
- Crecen entre los 10 - 48°C, la temperatura óptima es entre 28 - 35°C.
- Generalmente son móviles con flagelos peritricos.
- Poseen antígenos somáticos y flagelares y de esporas.
- Su pH óptimo de crecimiento es de 4,9 - 9,3.
- La germinación se presenta en el momento que se agota el medio, al final de la fase exponencial ocurre la esporulación porque son menos exigentes. La germinación de las esporas es a 30°C. Las esporas son moderadamente resistentes al calor. Resisten 100°C durante 5 -10 minutos.

- Entre sus factores de patogenicidad que presenta se encuentran: la toxina emética, toxina diarreica, toxina necrótica, lecitinasa (fosfolipasa), hemolisinas y el factor de permeabilidad vascular.

- La siguiente tabla (tabla 10) resume algunas de las características bioquímicas de esta especie.

Tabla 10. Pruebas de identificación de *B. cereus*

Característica bioquímica	Resultado
Catalasa	+
Movilidad	+/- (v)
Hidrólisis de gelatina	+
Reducción de nitratos	+
Producción de ácido a partir de glucosa	+
Producción de ácido a partir de maltosa	+
Producción de ácido a partir de manitol	-
Voges Proskauer	+
Citrato	+

Tomado de (34, 52)

v = Variable

Staphylococcus aureus

- Son células esféricas Gram positivas, que se presentan aislados, en pares, tétradas o cadenas cortas y en grupos irregulares en racimos.
- Crece en condiciones aeróbicas o microaerofílicas. Crecen con mayor rapidez a 37°C, pero el pigmento se forma mejor a temperatura ambiente (20 a 25°C).
- En medios sólidos las colonias son redondas, lisas, prominentes y brillantes. *S. aureus* comúnmente forma colonias de color gris o amarillo dorado intenso.
- *S. aureus* es un patógeno primario reconocido para el hombre y es uno de los patógenos bacterianos que con mayor frecuencia causa infecciones intrahospitalarias.
- Son relativamente resistentes a la desecación (soportan 50°C durante 30 minutos) y al cloruro de sodio a 9%.

**Tabla 11.** Pruebas de identificación de *S. aureus*

Prueba bioquímica	Resultado
Catalasa	+
Movilidad	-
Coagulasa	+
Urea	+
Producción de ácido a partir de glucosa	+
Producción de ácido a partir del manitol	+
Producción de ácido a partir de maltosa	+

Tomado de (34, 52)

Escherichia coli spp.

- Forma parte de la familia *enterobacteriaceae*.
- *E. coli* esta integrada por bacilos Gram negativos no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, aerobios-anaerobios facultativos.
- Es una bacteria de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, agua, vegetales y gran variedad.

Tabla 12. Pruebas de identificación de *E.coli*

Prueba bioquímica	Resultado
Catalasa	+
Oxidasa	-
Movilidad	+
Medio OF	F
Nitratos	+
Producción de ácido a partir de glucosa (gas)	+
Producción de ácido a partir de lactosa (gas)	+
Producción de ácido a partir de arabinosa	+
MR	+
VP	-
Citrato	-
Indol	+
Lisina descarboxilasa	+

Tomado de (34,52)



Salmonella typhi

- Pertenece a la familia *enterobacteriaceae*.
- Son bacilos Gram negativos, con flagelos peritricos y que no desarrollan cápsula ni esporas.
- Es una bacteria anaerobia facultativa; móvil.
- Se transmite por contacto directo o contaminación durante la manipulación, en el procesado de alimentos o en el hogar, también por vía sexual.
- Presenta antígeno somático O (fracción polisacárida del lipopolisacárido bacilar), antígeno H (flagelar) y se caracteriza por presentar el antígeno Vi (virulencia).

Tabla 13. Pruebas de identificación de *Salmonella typhi*

Prueba bioquímica	Resultado
Catalasa	-
Movilidad	+
Arabinosa	-
Medio OF	F
Nitratos	+
Producción de ácido a partir de glucosa (gas)	-
Producción de ácido a partir de lactosa (gas)	-
Sacarosa	-
MR	+
VP	-
Citrato	-
Indol	+
Ornitina descarboxilasa	-
Lisina descarboxilasa	+

Tomado de (34, 52)



Candida albicans

- Es un hongo diploide asexual (forma de levadura), saprofito que pertenece a la familia de los Sacaromicetos.
- Se encuentra normalmente en cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina.
- Suele presentarse como una célula oval, levaduriforme de 2 a 4 micras con paredes finas.
- En apariencia microscópica es una levadura Gram positiva, pero en algunas ocasiones la forma de las blastosporas puede variar de ovoide a alargada o esférica.

- Presenta dimorfismo el cual pasa de levadura gemantes a hifas.
- Una prueba de identificación rápida para su identificación es el tubo germinal.

Tabla 14. Pruebas de identificación de *Candida albicans*

Prueba bioquímica	Resultado
Maltosa	+
Sacarosa	+
Galactosa	+
Lactosa	-
Melobiosa	+
Ureasa	-
Nitrato	-
Sacarosa	-

Tomado de (34, 52)



9.4 Hoja técnica del extracto de eucalipto

Facilitada por extracto SIGMA



EXTRACTOS SIGMA

HOJA TECNICA

EUCALIPTO
Eucalyptus globulus

CODIGO 3045HI

DESCRIPCIÓN	Extracto hidroalcoholico ingerible de Eucalipto
APARIENCIA	Líquido ligeramente turbio
COLOR	Ámbar
OLOR	Característico
MEDIO	Agua
SOLUBILIDAD	Agua - Alcohol - Glicoles
ESPECIFICACIONES	
DENSIDAD (20°C)	0.900 - 1.000
INDICE DE REFRACCIÓN	1.3621 - 1.3793
°BRIX	19.0 - 29.0
MESOFILCOS AEROBIOS	< 10 ufc / ml
HONGOS Y LEVADURAS	< 10 ufc / ml
COLIFORMES	< 10 ufc / ml
COMPONENTES PRIMARIOS	Alfa felaldreno, alfa y beta pineno, taninos, ac. Orgánicos, flavonoides, fenólicos, cotronelal, eucaliptol, terpenos, triterpenos.
PROPIEDADES	Desodorante, astringente, tonificante, antiséptico, insectífugas, antitusivo, descongestionante, ayuda en las vías respiratorias, neuralgias, hipoglucemiante, apósito para quemaduras, heridas, infecciones, útil en el pie de atleta y tiña.
USO	Ingerible
ALMACENAMIENTO	Temperatura ambiente y protegido de la luz, una vez abierto mantener en refrigeración.
PRECAUCIONES	No reportado.

www.extractosigma.com.mx

La Calidad es Extractos Sigma

AV. 20 DE NOVIEMBRE 221 COL. EJIDO EL SOCORRO CUAUTITLAN IZCALLI, MEXICO C. P. 54740 TEL.: (55) 2620 0055 TEL/FAX: (55) 2620 3490



10. REFERENCIAS

1. Shiva Ramayoni C. Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. (tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona. 2007
2. Ramoutsaki I, et al. Remedies used in Hellenic History. *Vet. Hum. Toxicol.* 2000; 142:4 238-241.
3. Calvo M. Aspectos sobre la capacidad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. *Real academia de España.* 2003; 7: 121-129.
4. Cowan M. Plants products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol.* 1999; 12(4):564-582.
5. Domingo D y López M. Plantas con acción antimicrobiana. *Sociedad Española de Quimioterapia.* 2003; 16 (4): 385-396.
6. Alonso J. (2004). Tratado de fitoquímica y nutraceuticos. Corpus. Argentina. 73-79.
7. Hernández A, et al. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades poscosecha hortofrutícolas. *Fitotecnia mexicana.* 2007; 30(2): 119-123.
8. FAO: Stivens, D. El errante eucalipto. http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp
9. Kuklinski C. (2001). Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natura. Omega. Barcelona España. 258-259.
10. Tyler V, Brady, et al. (1998). Farmacognosy. 9ª ed. Lea & febiger. Philadelphia EE.UU. 320-333.
11. Bruneton J. (1991). Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Acribia. Zaragoza España. 250-251.
12. Barnes J, Anderson A, et al. (2002). Herbal medicines. Pharmaceutical press. England. 197-199.
13. Fred Meyer. (2004). Eucalipto. Healt notes. <http://www.fredmeyer.com/Es-Heb.Eucalipto.htm>
14. Martínez R. Los beneficios del eucalipto. *Infármate.* 2006; 7(2): 1-5.
15. Evans W. Farmacognosia. (1986). Interamericana-McGraw-Hill. Madrid España. 519.



16. Prescott, L. (2003). Microbiología. 4a. ed. Ed. Mc Graw Hill Interamericana
17. Hinke, N. La llegada del eucalipto a México. 2006. <http://www.ejournal.unam.mx/ciencias/no58/CNS05808.pdf>.
18. Carretero E. (2000). Terpenos: Aceites esenciales. Panorama Actual del Medicamento. 24 (238). 1002-1006.
19. Silva Sánchez J. Resistencia a antibióticos. Latinoamericana de Microbiología. 2006; 48 (2): 105-112.
20. Velásquez Meza M. Surgimiento y diseminación de Staphylococcus aureus meticilino resistente. Salud Pública de México. Cuernavaca. 2005; 47 (5): 381-387.
21. Bautista C, et al. Evaluación del bioensayo de MTT para determinar la proliferación in vitro de linfocitos de bovino, frescos y congelados. UNAM.2000; 31 (2): 101-106.
22. Gutiérrez Castillo A, et al. Salmonelosis y campilobacteriosis las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo. UNAM. 2008; 39 (1): 81-90.
23. Sánchez J. Factores asociados a mortalidad por fungemias causadas por Candidas en niños. Hospital Infantil de México Federico Gómez. México. 2007; 64: 90-98.
24. Coleman D, et al. Importance of Candida species other than Candida albicans as opportunistic pathogens. Med Mycol. 1998; 1: 156-165.
25. Eggiman P, et al. Epidemiology of Candida species infections in critically ill non immunosuppressed. Lancet Infect Dis. 2003; 3: 685-702.
26. McDonald L, Baker C. Risk factors for candidemia in children's hospital. Clin Infect Dis. 1998; 27 (26):645-647.
27. Hernández F, et al. Frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos de un hospital regional de la ciudad de México. UNAM. 2003; 45 (6): 555-560.
28. Jaramillo A, et al. Prevalencia de hemocultivos positivos para Candida sp. Distribución de levaduras aisladas de pacientes internados en un hospital de segundo nivel de la ciudad de México. UNAM. 2009; 53 (1): 1-4.
29. Sánchez G, et al. Epidemiología de las infecciones sistémicas por Candida en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Bol Med Hosp. Infant Méx. 2004; 61: 289-295.



30. Vidal Jorge E, et al. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública en México*. 2007; 49 (5): 376-386.
31. <http://www.verdenatural.com/herbolaria/default.asp>
32. Booth H, et al. Climatic requirements of some commercially important eucalypt species. Elsevier Science Publishers Amsterdam. 1991; 3: 47-60.
33. Hasegawa, et al. Bioactive monoterpene glycosides conjugated with gallic acid from the leaves of *Eucalyptus globulus*. *Phytochemistry*. Japan. 2007; 69: 747-753.
34. Koneman. W, Elmer. (1999). *Diagnostico Microbiológico*. 5ª ed. Panamericana. Buenos Aires.
35. Gonzáles S, Hernández E, et al. (2003). *Guía de microscopia electrónica*. UNAM FES-C. México D.F.
36. Maguiña C, Ugarte C. Uso adecuado y racional de los antibióticos. *Acta Médica Perú*. 2006; 23 (1): 15-20.
37. Cordiés L, et al. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Médica Habana Cuba*. 1998; 8 (1): 13-27.
38. Goodman & Gilman. (1996). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9ª ed. McGraw-Hill Interamericana. México D.F.
39. Harrison T.H., et al. (1998). *Principios de medicina interna*. 14ª ed. McGraw-Hill Interamericana. España.
40. Young L. S., et al. (1994). *Tratamiento antimicrobiano: tratado de Medicina interna*. 19 ed. Nueva Editorial Interamericana. México D.F.
41. Briones E. La resistencia antimicrobiana y el mal uso de antibióticos en hospitales. Una historia sin fin. *Enfermedades infecciosas en pediatría*. 2006; 19(76): 112-120.
42. Silva J. Resistencia a antibióticos. *Latinoamericana de Microbiología*. 2006; 48 (2): 105-112.
43. WWW.urg.es/..Microbiologia/imagenes
44. Valenzuela Flores Adriana., et al. (2004). Vigilancia de infecciones nosocomiales: experiencia de un hospital de cardiología en México. Vol. 72 (1). *Academia Mexicana de Cirujana*. pp. 41-46.



45. Comisión del CODEX alimentarius:
http://www.fao.org/WAICENT/OIS/PRESS_NE/PRESSSPA/2001/prsp0143.htm
46. Vigilancia de enfermedades transmitida por alimentos:
<http://intranet.inppaz.org.ar/nhp/ve/ehome.asp>
47. Schulzz Ehling Monika., et al. (2004). Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay.
48. Prieto Adela et a., (2005). El empleo de medicina natural en el control de enfermedades de organismos acuáticos y potencialidades de uso en Cuba y México. Rev. Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. Vol. 8 (1). La Habana Cuba. pp: 38-49.
49. Libertad Alzamora, et al. Medicina tradicional del Perú: actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. Anales de la Facultad de Medicina. 2001; 62 (2): 156-161.
50. Liu B. Humberto, et al. (2000). Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de *Caesalpinia spinosa* "tara" y *Eucalyptus sp.* "eucalipto". Fondo editorial. Pontificia Universidad Católica del Perú.
51. Vera Viviano G, Gardea García S, Cruz Jiménez G., Licea Vega A. (2000). Tesis de licenciatura QFB: Determinación del efecto citotóxico y/o inductor de proliferación celular del extracto de *Caléndula officinalis* y *Amphytrygium adstringens* en dos líneas celulares evidenciado por el método colorimétrico de Mosmann. UNAM FES-C. México D.F.
52. Mac. Faddin J. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª ed. Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina.

