



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTILÁN

“Efecto sinérgico y/o antagónico de Quitosán y extracto de Caléndula
officinalis en bacterias comúnmente asociadas a infecciones de
heridas en humanos”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

SONIA HERNÁNDEZ ZAMORA

ASESORES: M.V.Z. GERARDO CRUZ JIMÉNEZ
M.V.Z. JOSÉ ANTONIO LICEA VEGA
Dra. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatorias

A Dios y a la Virgen

Gracias por los padres que me dieron. Por darme la fuerza para levantarme cada mañana, por permitirle amar a mi corazón, gracias por dejarme vivir, y dar vida.

A mi hermanito Shelis

Por que a pesar de no haberte conocido, aprendí a amarte. Por que en sueños me sonríes, y porque has estado presente en todo momento de mi vida.

A mis padres José Luis y María Luisa

Hoy que soy madre entiendo que los hijos son una responsabilidad enorme, que el amor de padre no se cansa de entregar, y que a pesar de que los niños crezcan seguirán siendo parte de uno mismo. Ustedes son mi apoyo, mi guía. Siento mucho causarles tantas preocupaciones, pero eso me reafirma que solo ustedes siempre van a estar ahí, no importa las circunstancias ni los errores que cometa, siempre van a estar conmigo. No creí que éste título tuviera tanto peso sentimental, pero hoy me siento libre por que al fin terminé algo que comencé, esto es el resultado de su amor, paciencia, apoyo y sacrificios, tuvo que pasar mucho tiempo y muchas cosas para que sucediera pero lo que importa es que lo logré. Gracias por su amor.

A mis amados hijos

Guido

A tu corta edad has sabido ser mi amigo, porque en los momentos en los que más necesite apoyo y un fuerte apapacho tú estuviste a mi lado, endulzándome los oídos con las palabras más tiernas que me han consolado el alma, y que me han hecho saber que eres un ser lleno de ternura y de sentimientos nobles, lo que me hace estar orgullosa de ti. Aún eres muy pequeño para comprender muchas cosas, pero lo que me has dejado muy claro es que me amas, con ese amor que no exige, que es puro y que entregas por que te nace del corazón. Sé que muchas veces no he sido justa contigo, y que no soy una madre modelo pero dentro de mi inexperiencia me guió el instinto, y por la maravillosa personita que eres sé que no me equivoqué del todo. Quiero ser siempre tu amiga, que te acerques a mí cuando lo necesites sin ninguna restricción, mis oídos, mi mente y mi corazón siempre estarán abiertos para ti. Gracias por ser esa razón por la cual me despierto en la madrugada, por esa necesidad de tenerte cerca de mí. Hijo mío gracias por existir.

Brenda Ariadna

Cuando era una pequeñita niña como tú jugaba con mis muñecas, las peinaba, las vestía, e imaginaba las expresiones de sus caras. Tu presencia femenina arrasa con todos esos recuerdos ya que al ver el brillo de tus ojos y escuchar el tintineo de tu voz se reafirma en mí el deseo de seguir, tú eres mi muñeca. Princesita permíteme ser tu amiga, aconsejarte y guiarte pero siempre respetaré tus decisiones, déjame ser tu confidente, cuando me necesites estaré dispuesta a escucharte, a consolarte y ayudarte en todo y si he sacrificado muchas cosas por estar contigo, créeme que ha valido la pena por que la dicha de verte crecer es algo que llevo en mis pensamientos y en mi corazón y es una satisfacción que nadie ni nada lo va a opacar jamás. Pequeñita gracias por ser la chispa de mi vida.

Hijos, éste logro me ha costado mucho, tuve que enfrentar muchos miedos, decepciones, dudé más de una vez en poder llegar a este momento, tuve que aprender que lo que uno quiere lo tiene que alcanzar con méritos propios, y con mucho esfuerzo y sobre todo a tiempo, la diversión tiene su momento, y el mundo color rosa con nubes de bombón no existe, pero lo que sí existe es el amor, y es precisamente el amor por ustedes, por su padre y por toda la gente que me quiere lo que me motiva a estar hoy aquí. Quiero que aprendan de mis errores, que crean en ustedes, en que son excelentes estudiantes y que si así lo desean lo seguirán siendo, recuerden que cada quien es su propio obstáculo, todo está en quererlo pero hay que hacerlo no importa cuánto esfuerzo cueste, ambos tienen todo para ser exitosos en su vida, y yo quiero estar ahí en cuerpo y después solo en alma, pero siempre junto a ustedes. Los amo de aquí al infinito y más allá....

José Luis

Hoy entiendo perfectamente que uno no aprovecha las oportunidades que se le presentan en la vida porque tiene miedo al fracaso, o porque simplemente no las reconoce por estar más atento a frivolidades.

La vida nos lleva por caminos extraños aunque los sentimientos sigan siendo tan fuertes como en el primer momento, tenemos que luchar siempre, no dejar que los obstáculos nos derroten ni nos separen. Siempre serás la piedrita en mi zapato. Hoy solo puedo decirte Gracias, gracias por todo el amor y por todo el dolor, sentimientos que supuestamente no deberían estar tan unidos, pero que van de la mano. Eres el amor de mi vida.

¡Por fin lo logré!

A mis hermanos

Daniel, Ricardo, Jaqueline y Alejandro. Gracias por los momentos tan padres que compartimos en nuestra infancia, y por todos los que vendrán, los amo.

A mis sobrinitos

Thalía, Donovan Alejandro, Ximena Ayerim, Esteban, Iliana y Andrea. Sean felices y libres, disfruten cada etapa de su vida, confíen siempre en Dios y en la Virgen, y no olviden que ésta tía loca los ama con todo su corazón.

A mis abuditas

Tina y Ofe, que son mi sangre y el comienzo de todo.

Agradecimientos

A la Máxima Casa de Estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, con especial cariño a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1, por abrirme las puertas del conocimiento; en tus aulas, biblioteca y jardines encontré lo más valioso, mis conocimientos, mis amigos y al amor de mi vida, gracias por permitirme llevar grabado en el alma tantos recuerdos y por dejarme sentir en el corazón el orgullo de ser universitaria.

A mis compañeros del laboratorio de Microbiología, en especial a Erika Marco, Mónica, Rosa, Sara, Mario, Alejandro, Claudia, Irma y a Lupita, que me brindaron su generosa amistad, haciendo más amena mi estancia y que sobre todo supieron escucharme y apoyarme en todo momento y circunstancia. Ery te agradezco el café de todas las mañanas, la honestidad y la confianza que depositaste en mí.

Al profesor Gerardo Cruz Jiménez, y al profesor José Antonio Licea que compartieron parte de sus conocimientos conmigo para que lograra ésta meta, que fueron muy pacientes, y que me tendieron la mano en momentos difíciles, dándome consejos y compartiendo vivencias, lo que me hace respetarlos y estimarlos más. Gracias por jalarme las orejas cuando fue necesario.

A la Doctora Patricia Miranda que contribuyó en mi trabajo de forma tan generosa y desinteresada.

A todos los profesores que me dieron clases, ya que con su amor a la docencia me transmitieron con más facilidad todos sus conocimientos y me enseñaron a amar ésta carrera.

Al Doctor David Trujillo que en todo momento estuvo dispuesto a ayudarme en el proceso de realización de éste trabajo, además de ser un gran ser humano y un gran amigo.

A la generación 21 de Q.F.B., en especial a Cecilia y a Gustavo por todo lo que compartimos, y por lo que seguimos compartiendo ahora con nuestras familias, mil gracias por ser mis amigos.

A mis queridos Juan Carlos Cope y Gerardo Rodríguez (Ponch), que son tan especiales e importantes en mi vida.

A David Oliva y José Luis Torres que fomentaron en mí un sentimiento de lucha y esperanza.

A Liana y Mineva que han sabido ser sinceras conmigo en todo momento.

A Diana Olivera, que siempre ha estado dispuesta a escucharme, gracias por enseñarme el significado de la amistad.

Me doy gracias a mí misma, por permitirme experimentar ésta sensación de triunfo, ésta alegría que es indescriptible y por que me demostré que pude terminar algo que empecé, aunque me tardé tanto, y aunque éste trabajo lo realicé en medio del peor momento de mi vida, ahora sé que soy capaz de lograr lo que me proponga, y por que me siento orgullosa de quien soy, una mujer con alma y sentimientos buenos capaz de amar y perdonar y de levantar la cara y seguir adelante.

Y ahora, una Goya para mí

Credo del Biólogo Molecular

Creo en el **DNA** todopoderoso

creador de todos los seres vivos

Creo en el **RNA**, su único hijo,

que fue concebido por obra y gracia de la **RNA** polimerasa

Nació como transcrito primario

padeció bajo el poder de nucleasas, metilasas y poliadenilasas.

Fue procesado, modificado y transportado.

Descendió del citoplasma

a los pocos segundos fue traducido a proteína.

Ascendió por el **R**etículo Endoplásmico y el complejo de Golgi

y está anclado sobre la membrana plasmática

a la derecha de la proteína **G**.

Desde ahí ha de controlar la traducción de señales

en células normales y apoptóticas.

Creo en la **B**iólogía Molecular,

la terapia génica y la biotecnología,

en la secuenciación del genoma humano,
la corrección de mutaciones,
la donación de Dolly
y la vida eterna.
Amen.

ÍNDICE GENERAL.

	Pág.
Índice de tablas.....	iv
Índice de gráficas.....	v
Índice de figuras	vi
Tabla de abreviaturas	vii
Resumen	1
I Generalidades	2
1.1 Heridas.....	2
1.2 Clasificación de heridas	3
1.3 Infecciones de heridas y abscesos.....	3
1.4 Muestras clínicas	4
1.5 Toma de muestra	4
1.6 Transporte de muestras clínicas	5
1.7 Manejo de muestras de laboratorio	5
1.8 Bacterias aisladas de heridas contaminadas.....	6
1.9 Tratamiento	7
1.10 Resistencia bacteriana	9
1.11 Generalidades del Quitosán.....	10
1.12 Generalidades de <i>Caléndula officinalis</i>	14
1.13 Ensayo colorimétrico de Mossman con 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT)	16
II Justificación.....	17
III Hipótesis.....	18
IV Objetivos	19
V Materiales y Métodos	20
5.1 Obtención del extracto de <i>Caléndula officinalis</i>	20
5.2 Determinación de la concentración en µg/mL del Extracto de <i>Caléndula officinalis</i> para la determinación de la CMI y para la elaboración de los isobogramas.....	20
5.3 Obtención del Quitosán a pH 4, pH 5, pH 6.....	20
5.4 Obtención de las cepas bacterianas.....	20
5.5 Identificación de las cepas bacterianas	21
5.6 Método de dilución	22

	Pág.
5.7	Isobogramas.....23
5.8	Análisis estadístico.....25
5.9	Diagrama de trabajo para la obtención de la CMI.....26
5.10	Ensayo bacteria - <i>Caléndula officinalis</i> , Bacteria – Quitosán pH 4, Bacteria - <i>Caléndula officinalis</i> /Quitosán pH 4, Bacteria – Quitosán pH 5, Bacteria - <i>Caléndula officinalis</i> /Quitosán pH 5, Bacteria – Quitosán pH 6, Bacteria - <i>Caléndula officinalis</i> /Quitosán pH 6, Prueba cualitativa en tubo27
5.11	Ensayo bacteria - <i>Caléndula officinalis</i> , Bacteria – Quitosán pH 4, Bacteria - <i>Caléndula officinalis</i> /Quitosán pH 4, Bacteria – Quitosán pH 5, Bacteria - <i>Caléndula officinalis</i> /Quitosán pH 5, Bacteria – Quitosán pH 6, Bacteria - <i>Caléndula officinalis</i> /Quitosán pH 6, Prueba cuantitativa en microplaca.....28
5.12	Comprobación de efecto bactericida o bacteriostático.....29
5.13	Diagrama de trabajo para la realización de los isobogramas.....30
VI	Resultados.....32
6.1	Pruebas cualitativa, cuantitativa y efecto bactericida o bacteriostático32
6.1.1	<i>Enterobacter spp</i>33
6.1.2	<i>Escherichia coli</i>35
6.1.3	<i>Klebsiella spp</i>37
6.1.4	<i>Proteus spp</i>39
6.1.5	<i>Pseudomonas spp</i>41
6.1.6	<i>Salmonella spp</i>43
6.1.7	<i>Staphylococcus aureus</i>45
6.1.8	<i>Streptococcus pyogenes</i>47
VII	Discusión49
VIII	Conclusiones58
IX	Sugerencias59
X	Apéndice60
9.1	Materiales60
XI	Glosario.....63

	Pág.
XII Anexo I	65
XIII Anexo II	66
XIV Anexo III	78
XV Referencias	80

ÍNDICE DE TABLAS.

	Pág.
Tabla 1. Infecciones nosocomiales y frecuencia de agentes etiológico	7
Tabla 2. Incidencia porcentual de los microorganismos aislados en heridas	7
Tabla 3. Actividad antimicrobiana del Quitosán.....	13
Tabla 4. Forma de preparación y usos de <i>Caléndula officinalis</i>	16
Tabla 5. Bacterias identificadas obtenidas de muestras clínicas	21
Tabla 6. Cepas de bacterias utilizadas en la experimentación	22
Tabla 7. Ensayo de actividad bactericida/bacteriostático en diferentes bacterias aisladas de casos de heridas infectadas.....	32
Tabla 8. Concentraciones utilizadas de las soluciones a las diferentes diluciones empleadas	32
Tabla 9. Comparación de Caléndula, Quitosán y la mezcla, con <i>Enterobacter spp</i> para determinar si $p<0.05$ y conocer si existen diferencias significativas	33
Tabla 10. Comparación de Caléndula, Quitosán y la mezcla, con <i>Escherichia coli</i> para determinar si $p<0.05$ y conocer si existen diferencias significativas.	35
Tabla 11. Comparación de Caléndula, Quitosán y la mezcla, con <i>Klebsiella spp</i> para determinar si $p<0.05$ y conocer si existen diferencias significativas	37
Tabla 12. Comparación de Caléndula, Quitosán y la mezcla, con <i>Proteus spp</i> para determinar si $p<0.05$ y conocer si existen diferencias significativas	39
Tabla 13. Comparación de Caléndula, Quitosán y la mezcla, con <i>Pseudomonas spp</i> para determinar si $p<0.05$ y conocer si existen diferencias significativas	41
Tabla 14. Comparación de Caléndula, Quitosán y la mezcla, con <i>Salmonella spp</i> para determinar si $p<0.05$ y conocer si existen diferencias significativas	43
Tabla 15. Comparación de Caléndula, Quitosán y la mezcla, con <i>Staphylococcus aureus</i> para determinar si $p<0.05$ y conocer si existen diferencias significativas	45
Tabla 16. Comparación de Caléndula, Quitosán y la mezcla, con <i>Streptococcus pyogenes</i> para determinar si $p<0.05$ y conocer si existen diferencias significativas	47

Tabla 17. Promedio de las D.O. obtenidas en los ensayos con <i>Enterobacter spp</i>	66
Tabla 18. Promedio de las D.O. obtenidas en los ensayos con <i>Escherichia coli</i>	66
Tabla 19. Promedio de las D.O. obtenidas en los ensayos con <i>Klebsiella spp</i>	66
Tabla 20. Promedio de las D.O. obtenidas en los ensayos con <i>Proteus spp</i>	67
Tabla 21. Promedio de las D.O. obtenidas en los ensayos con <i>Pseudomonas spp</i>	67
Tabla 22. Promedio de las D.O. obtenidas en los ensayos con <i>Salmonella spp</i>	67
Tabla 23. Promedio de las D.O. obtenidas en los ensayos con <i>Staphylococcus aureus</i>	68
Tabla 24. Promedio de las D.O. obtenidas en los ensayos con <i>Streptococcus pyogenes</i>	68
Tabla 25. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH4 Para <i>Enterobacter spp</i>	69
Tabla 26. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH5 Para <i>Enterobacter spp</i>	69
Tabla 27. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH4 Para <i>Escherichia coli</i>	70
Tabla 28. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH5 Para <i>Escherichia coli</i>	70
Tabla 29. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH6 Para <i>Escherichia coli</i>	71
Tabla 30. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH4 Para <i>Klebsiella spp</i>	71
Tabla 31. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH5 Para <i>Klebsiella spp</i>	72
Tabla 32. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH4 Para <i>Proteus spp</i>	72
Tabla 33. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH5 Para <i>Proteus spp</i>	73

Tabla 34. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH4 Para <i>Pseudomonas spp</i>	73
Tabla 35. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH5 Para <i>Pseudomonas spp</i>	74
Tabla 36. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH4 Para <i>Salmonella spp</i>	74
Tabla 37. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH5 Para <i>Salmonella spp</i>	75
Tabla 38. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH4 Para <i>Staphylococcus aureus</i>	75
Tabla 39. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH5 Para <i>Staphylococcus aureus</i>	76
Tabla 40. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH6 Para <i>Staphylococcus aureus</i>	76
Tabla 41. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH4 Para <i>Streptococcus pyogenes</i>	77
Tabla 42. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH5 Para <i>Streptococcus pyogenes</i>	77
Tabla 43. Pruebas de identificación de las bacterias aisladas.....	78
Tabla 44. Pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias aisladas	79

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

	Pág.
Gráfica 1. Cultivo de 24 horas de <i>Enterobacter</i> en microplaca conteniendo los 7 ensayos y sus respectivas diluciones	33
Gráfica 2. Cultivo de 24 horas de <i>Escherichia coli</i> en microplaca conteniendo los 7 ensayos y sus respectivas diluciones	35
Gráfica 3. Cultivo de 24 horas de <i>Klebsiella coli</i> en microplaca conteniendo los 7 ensayos y sus respectivas diluciones	37
Gráfica 4. Cultivo de 24 horas de <i>Proteus</i> en microplaca conteniendo los 7 ensayos y sus respectivas diluciones	39
Gráfica 5. Cultivo de 24 horas de <i>Pseudomonas</i> en microplaca conteniendo los 7 ensayos y sus respectivas diluciones	41

Gráfica 6. Cultivo de 24 horas de <i>Salmonella</i> en microplaca conteniendo los 7 ensayos y sus respectivas diluciones	43
Gráfica 7. Cultivo de 24 horas de <i>Staphylococcus aureus</i> en microplaca conteniendo los 7 ensayos y sus respectivas diluciones	45
Gráfica 8. Cultivo de 24 horas de <i>Streptococcus pyogenes</i> en microplaca conteniendo los 7 ensayos y sus respectivas diluciones	47

ÍNDICE DE FIGURAS.

Fig. 1. Estructura de la Quitina y del Quitosán	10
Fig. 2. Bacterias Gram (+).....	12
Fig. 3. Bacterias Gram (-).....	13
Fig. 4. Flor de <i>Caléndula officinalis</i>	14
Fig. 5. Isobogramas	24
Fig. 6. Rótulos en microplaca.....	28
Fig. 7. Placa petri rotulada y placa petri con muestra inoculada.....	29
Fig. 8. Isobograma de <i>Caléndula</i> /Quitosán pH4 para <i>Enterobacter spp</i>	34
Fig. 9. Isobograma de <i>Caléndula</i> /Quitosán pH5 para <i>Enterobacter spp</i>	34
Fig. 10. Isobograma de <i>Caléndula</i> /Quitosán pH4 para <i>Escherichia coli</i>	36
Fig. 11. Isobograma de <i>Caléndula</i> /Quitosán pH5 para <i>Escherichia coli</i>	36
Fig. 12. Isobograma de <i>Caléndula</i> /Quitosán pH6 para <i>Escherichia coli</i>	36
Fig. 13. Isobograma de <i>Caléndula</i> /Quitosán pH4 para <i>Klebsiella spp</i>	38
Fig. 14. Isobograma de <i>Caléndula</i> /Quitosán pH5 para <i>Klebsiella spp</i>	38
Fig. 15. Isobograma de <i>Caléndula</i> /Quitosán pH4 para <i>Proteus spp</i>	40
Fig. 16. Isobograma de <i>Caléndula</i> /Quitosán pH5 para <i>Proteus spp</i>	40
Fig. 17. Isobograma de <i>Caléndula</i> /Quitosán pH4 para <i>Pseudomonas spp</i>	42
Fig. 18. Isobograma de <i>Caléndula</i> /Quitosán pH5 para <i>Pseudomonas spp</i>	42
Fig. 19. Isobograma de <i>Caléndula</i> /Quitosán pH4 para <i>Salmonella spp</i>	44
Fig. 20. Isobograma de <i>Caléndula</i> /Quitosán pH5 para <i>Salmonella spp</i>	44

Fig. 21. Isoblograma de <i>Caléndula</i> /Quitosán pH4 para <i>Staphylococcus aureus</i>	46
Fig. 22. Isoblograma de <i>Caléndula</i> /Quitosán pH5 para <i>Staphylococcus aureus</i>	46
Fig. 23. Isoblograma de <i>Caléndula</i> /Quitosán pH4 para <i>Staphylococcus aureus</i>	46
Fig. 24. Isoblograma de <i>Caléndula</i> /Quitosán pH4 para <i>Streptococcus pyogenes</i>	48
Fig. 25. Isoblograma de <i>Caléndula</i> /Quitosán pH5 para <i>Streptococcus pyogenes</i>	48
Fig. 26. Prueba cualitativa en tubo o placa de 24 pozos para <i>Enterobacter spp</i>	65
Fig. 27. Prueba cuantitativa en microplaca para <i>Enterobacter spp</i>	65
Fig. 28. Efecto bactericida/bacteriostático para <i>Pseudomonas spp</i>	65

TABLA DE ABREVIATURAS.

<u>Abreviatura</u>	<u>Significado</u>
D.O.	Densidad óptica
MTT	Bromuro de 3 - [4,5 - dimetiltiazol - 2- 11] - 2,5 - difeniltetrazolio
Qn	Quitosán
C/	<i>Caléndula</i> con
BCO	bacteriostático
BDA	bactericida
spp	Sin especie particular
mL	Mililitros
µm	Micrómetros
µL	Microlitros
µg	Microgramos
g	gramos
nm	nanómetros
bco.	blanco
°C	grados centígrados
G.D.	grado de desacetilación
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
D-MEM	Medio de Eagle Modificado por Dulbecco
HCl	Ácido clorhídrico
BHI	Agar Infusión cerebro corazón
SM	Agar Sales Manitol
EMB	Agar Eosina Azul de Metileno
SB	Agar Sulfito Bismuto
XLD	Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato
SIM	Ácido sulfhídrico-indol-motilidad
TSI	Triple azúcar-hierro
MIO	Motilidad Indol Ornitina
MR-VP	Rojo de Metilo - Vogues Proskauer
LIA	lisina Indol Arginina
No.	Número
PM	Peso molecular
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
m.o.	Microorganismo
FIC	Concentración inhibitoria fraccionada
S	Sinergismo
I	Indiferencia
A	Antagonismo

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto sinérgico y/o antagónico de la mezcla del extracto etanólico de *Caléndula officinalis* y de Quitosán a tres diferentes pH's en bacterias aisladas de 50 muestras obtenidas de heridas infectadas de humano provenientes del Hospital General Clínica 57, IMSS.

Los microorganismos que se lograron aislar de las muestras por métodos bacteriológicos fueron *Enterobacter spp*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Proteus spp*, *Pseudomonas spp*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*. Se procedió a seleccionar sólo 3 cepas del mismo género para las pruebas posteriores.

Se utilizó Quitosán (Qn) PM 63,088 g/mol, G.D. 85%, al 1 % a pH 4, pH 5 y pH 6, y extracto etanólico acuoso de *Caléndula officinalis* (C/), que se llevó a rotavapor y después a sequedad total para lograr una solución de concentración de 0.5 mg/ml y una mezcla de ambos proporción 1:1 para efectuar los ensayos con las diferentes cepas.

Para determinar cuantitativamente la inhibición bacteriana se empleó el método colorimétrico de Mosmann, el cual utiliza bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) que determina la presencia de células viables a partir de la reducción de éste por la acción de una deshidrogenasa producida por dichas células.

Posteriormente se determinó el efecto bactericida o bacteriostático de cada cepa en cada ensayo sembrándolas en agar BHI. Ambas pruebas sirvieron para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Los resultados obtenidos nos indican que el ensayo que fue más efectivo para la mayoría de las bacterias fue el que contenía el Qn pH 4.

Demostrando que posiblemente existe sinergismo en la mezcla de ambos componentes, pero no utilizamos la concentración adecuada de *Caléndula*, por lo que se sugiere que se manejen otras concentraciones de la misma, aún así obtuvimos resultados favorables al observar actividad bactericida en los ensayos realizados.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las infecciones nosocomiales constituyen un problema en la mayoría de los hospitales. En el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) se definió una serie de lineamientos para la vigilancia epidemiológica, prevención y control; por su parte la Secretaria de Salud decretó una norma oficial mexicana al respecto ^(40 - 41).

Al ser un padecimiento agregado, la infección prolonga el internamiento del paciente e incrementa los gastos institucionales. Por lo que tienen un gran impacto económico, social y laboral.

Ante la inminente frecuencia de heridas infectadas que se presentan en todos los centros de Salud de la República Mexicana y sin duda en todo el mundo, ya sea por heridas nosocomiales o provocadas por traumatismos externos a las instituciones, es necesario emplear tratamientos que sean eficaces contra dichas infecciones, ya que se está presentando con más frecuencia y fuerza la resistencia bacteriana a tratamientos ya establecidos.

Por lo tanto es importante implementar nuevos tratamientos aprovechando la riqueza natural del país, ya que se cuenta con muchas plantas que han sido utilizadas desde años y que tienen diversos efectos en padecimientos así como en infecciones.

En este trabajo nos dimos a la tarea de evaluar dos compuestos de origen natural, por un lado el extracto de *Caléndula officinalis* y por el otro Qitosán, para observar sus efectos sobre diversas cepas bacterianas y dar pauta a futuras investigaciones.

I GENERALIDADES.

1.1 HERIDAS.

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

Las infecciones de heridas pueden ser endógenas o exógenas. Las exógenas son las asociadas a traumas, mordeduras de animales, quemaduras o de cuerpos extraños en la mucosa o en la piel. Estas lesiones frecuentemente son colonizadas por bacterias ambientales ⁽¹⁾.

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

Los microorganismos que se logran identificar nos dicen la localización anatómica de la infección, y sobre todo el grado de contaminación. Las heridas traumáticas generalmente se colonizan con microorganismos aerobios como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* grupo A y D (*Enterococcus*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinobacter* spp, *Flavobacterium*, Enterobacterias; *Escherichia coli*, *Proteus* spp, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Providencia* spp (Tabla 1) ⁽²⁾.

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

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

Algunos de los factores más importantes causantes de las infecciones en heridas son: el tipo de herida, si es por traumatismo, o por cirugía, así como las condiciones en las que se llevó a cabo su tratamiento, es decir, con o sin asepsia, así como factores relacionados directamente con el paciente, tales como la edad, estado de nutrición, si padece diabetes mellitus, deficiencia renal, terapia farmacológica, si el paciente está inmuno-comprometido o inmunodeficiente como en el caso del SIDA, así como su nivel sociocultural ya que la incidencia de estas infecciones se dan con más frecuencia en lugares donde escasea el agua y las condiciones de higiene del medio no son favorables (Tabla 2).

1.2 CLASIFICACIÓN DE HERIDAS.

1.- Limpias: Estas comprenden las heridas que no afectan al aparato gastrointestinal ni al aparato circulatorio, éstas no muestran ningún signo de inflamación. Aquí se incluyen a las apendicitomías, histerectomías, colcistectomías.

2.- Limpias contaminadas: Son las que han sido realizadas con apertura de los aparatos respiratorio o gastrointestinal, en las que no se han transgredido las normas de asepsia.

3.- Contaminadas: incluyen aquellas que se encuentran en focos de inflamación aguda (sin pus). Son heridas abiertas, frescas y accidentales.

4.- Sucias: que incluyen aquellas en las que es evidente la presencia de pus, así como un notable signo de inflamación en la zona, acompañada de dolor ⁽³⁾.

1.3 INFECCIONES EN HERIDAS Y ABSCESOS.

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

La flora normal de un área, puede ser modificada por procesos patológicos o agentes microbianos y la flora ambiental permitirá establecer en forma racional los posibles agentes etiológicos. El clínico establece una terapia empírica antes de disponer de los datos del análisis microbiológico ayudado también por la observación de ciertas manifestaciones clínicas con lo que puede sugerir la presencia de algún microorganismo; La tinción de Gram le da al microbiólogo la información para asegurar el empleo de los medios, condiciones de cultivo, etc. ⁽⁴⁾.

Las infecciones de las extremidades son muy comunes, el paciente clásico padece diabetes mellitus, mala circulación arterial y neuropatía periférica. Los traumatismos generalmente se presentan en los pies, en el área afectada se transforma en una úlcera que no cura fácilmente, esto se debe al escaso suministro de sangre y generalmente se infectan. Dichas infecciones se hacen crónicas y muy difíciles de erradicar, lo cual puede complicar el estado del paciente diabético. La insuficiencia venosa predispone a infección de las extremidades inferiores, causada por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, las úlceras abiertas pueden ser colonizadas por *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa* ⁽⁴⁾.

Las vesículas y ampollas son lesiones llenas de líquido debido a ciertos microorganismos, si el laboratorio está informado de la naturaleza de la lesión el microbiológico puede prever la flora y emplear las técnicas para la recuperación de los agentes. Estas lesiones son muy características, por lo cual es fácil identificar si son de origen viral o bacteriano, en éste caso la tinción de Gram también proporciona valiosa información acerca del agente etiológico para llevar a cabo una terapia eficaz ⁽⁴⁾.

La infección de las lesiones producidas en quemaduras es un problema que se observa en todo el mundo, dicho problema está fuertemente asociado a bacteremia, se sabe que puede causar rechazos de injertos o incluso en casos muy severos causa la muerte. Los microorganismos que con más frecuencia infectan las lesiones por quemaduras son estreptococos, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, otros bacilos gram negativos, *Candida* y *Aspergillus* ⁽⁴⁾.

1.4 MUESTRAS CLÍNICAS.

Debe ser representativa del proceso infeccioso y la cantidad recogida, debe ser la suficiente para asegurar en examen completo y adecuado ⁽⁴⁾.

La toma se realizará en el momento más idóneo de acuerdo al proceso infeccioso y en el lugar anatómico más apropiado evitando en toda medida la contaminación con la flora de la piel ⁽⁴⁾.

Se debe tener especial cuidado en la toma de muestra, tanto como en el transporte de la misma ya que de ello depende el aislamiento del agente causal ⁽⁴⁾.

El informe del laboratorio de bacteriología confirma o no el agente etiológico por los resultados obtenidos en el examen microscópico y cultivo ⁽⁴⁾.

1.5 TOMA DE MUESTRA.

Deben ser obtenidas antes de iniciar la administración de agentes microbianos. En caso de que la muestra para el cultivo se ha recogido después de la iniciación de la terapia, el laboratorio debe ser informado para que se pueda tomar las medidas correspondientes ⁽⁷⁾.

La piel y todas las superficies mucosas están habitadas por una flora normal y con frecuencia también pueden adquirir una flora transitoria o incluso ser colonizadas por patógenos potenciales provenientes del ambiente por lo cual se toman las medidas pertinentes como:

- limpiar el área con antisépticos con fricción suficiente para realizar una limpieza mecánica.
- Evitar totalmente las áreas con flora normal
- Cultivar sólo para un patógeno específico.
- Utilizar cultivos cuantitativos ⁽⁴⁾.

El método más deseable para recolectar muestras cutáneas de lesiones pustulosas o vesiculares consiste en aspirar el líquido o pus de la profundidad de la herida con una aguja y jeringa estériles ⁽⁴⁾.

Si es difícil obtener la muestra con la aguja, deberá usarse un hisopo estéril y en ocasiones es necesario separar las márgenes cutáneas adyacentes ⁽⁴⁾.

Es importante resaltar que las heridas abiertas, úlceras o fístulas que se llegan a presentar en la piel se contaminan a menudo con los microorganismos cutáneos, de las mucosas y con frecuencia con los que se encuentran en el medio ambiente ⁽²⁾.

Todas las muestras se recogerán en recipientes estériles y serán transportados al laboratorio en el menor tiempo posible ⁽⁷⁾.

En algunos casos puede ser conveniente llevar los medios de cultivo y el equipo necesario hasta la cama del paciente para asegurar la rápida inoculación de la muestra ⁽⁴⁾.

El material clínico puede mantenerse en el refrigerador durante varias horas antes de su cultivo si no puede ser procesado inmediatamente. La refrigeración conservará la viabilidad de la mayoría de los patógenos y reducirá al mínimo el sobre crecimiento de los microorganismos comensales, que si están en número excesivo complicarán el aislamiento de un germen más importante ⁽⁴⁾.

1.6 TRANSPORTE DE MUESTRAS CLÍNICAS.

En el examen microbiológico de las muestras clínicas es esencial que el envase que las contiene no contribuya con su propia flora microbiana.

Debe usarse un recipiente estéril y la muestra debe inocularse tan pronto como sea posible. Se ha preparado una variedad de medios para transporte que prolonga la viabilidad de los microorganismos cuando existe una demora entre la recolección de la muestra y su cultivo ⁽⁴⁾.

1.7 MANEJO DE MUESTRA DE LABORATORIO

Muchas muestras no pueden ser inoculadas cuando llegan al laboratorio, en estos casos la refrigeración entre 4 - 6 ° C ofrece un método seguro y confiable para conservar muchas muestras clínicas hasta que puedan ser tratadas, pero otras muestras pueden requerir una siembra inmediata, mientras que otras deben ser congeladas inmediatamente ⁽⁴⁾.

1.8 BACTERIAS AISLADAS DE HERIDAS CONTAMINADAS.

- Bacterias Gram negativas. Infecciones causadas por enterobacterias más importantes *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Providencia* y *Citrobacter* ⁽⁵⁾.
- Bacterias Gram positivas. Infecciones causadas por géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* ⁽⁵⁾.
- *Klebsiella*. Causa hasta el 10 % de infecciones adquiridas en hospitales, tanto en vías urinarias como en respiratorias y heridas ⁽⁵⁾.
- *Escherichia coli*. Es el bacilo facultativo más abundante en el tracto gastrointestinal, puede ser responsable de procesos diarreicos, y puede causar a partir de un foco de infección primaria que pudiera prolongarse hasta causar una bacteremia ⁽⁵⁾.
- *Proteus*. Se le considera responsable de infecciones en heridas y pulmón ⁽⁵⁾.
- *Enterobacter*. Por sí sola no ocasiona infección primaria en ningún caso, pero se aísla si se presenta en combinación con *E. coli* y *Klebsiella* spp ⁽⁶⁾.
- *Serratia*. Patógeno que aparece en infecciones inicialmente tratadas con antimicrobianos de amplio espectro ⁽⁵⁾.
- *Providencia*. Se presenta frecuentemente en las heridas provocadas por quemaduras de segundo y de tercer grado ⁽⁵⁾.
- *Pseudomonas*. También infectan quemaduras, así como en algunos se considera causa de infecciones post operatorias ⁽⁶⁾.
- *Staphylococcus aureus*. Tienen como hábitat natural la superficie corporal, al igual que el aire y el polvo. La piel y mucosas son una barrera frente a estas bacterias pero cuando se presentan alteraciones en dicha barrera el *Staphylococcus* encuentra mejores condiciones para su desarrollo y propagación dentro del huésped ⁽⁶⁾.
- *Streptococcus*. La causa de infección por ésta especie es endógena (fisuras, u otras heridas infectadas). Se han descrito epidemias por portadores de bacterias en las heces, en la faringe o lesiones cutáneas infectadas ^(1 - 6).

Tabla 1. Infecciones nosocomiales y frecuencia de agentes etiológicos Cuernavaca ene/feb. 1997 ⁽⁴¹⁾.

Bacteria	IUV %	Onfalitis %	Heridas Quirúrgicas %	Bacteremias	Venopunción	Conjuntivitis	Peritonitis
<i>Escherichia coli</i>	36	33	36	4	4	18	33
<i>Klebsiella spp.</i>	14	52	13	11	18	28	0
<i>Enterobacter spp.</i>	6	38	14	30	18	36	17
<i>Pseudomonas spp.</i>	4	17	18	8	11	25	17
<i>Proteus spp.</i>	8	33	12	0	2	11	0
<i>Serratia marcescens</i>	4	9	10	47	14	7	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	12	4	0	7	14	17
<i>Candida spp.</i>	9	0	1	6	11	0	17
<i>Enterococo</i>	3	10	2	2	14	4	17
<i>Citrobacter spp.</i>	4	4	4	0	0	0	0
Otros	4	7	19	2	9	14	0

Tabla 2. Incidencia porcentual de los microorganismos aislados en heridas del año 1997 al 1998 en el Sanatorio del hospital de beneficencia Española. ⁽⁵⁾.

Microorganismo aislado	No. de muestras	Porcentaje
Bacterias Gram (-)	208	42 %
Bacterias Gram (+)	171	34 %
Levaduras	27	5 %
Muestras negativas	94	19 %
Total	500	100 %

1.9 TRATAMIENTO.

Como tratamiento a infecciones ocasionadas con estas bacterias se utilizan los antibacterianos y antiinflamatorios, los primeros se definen como sustancias químicas producidas por algunos microorganismos o que pueden ser sintéticas, que son capaces de detener el crecimiento de las bacterias e incluso destruirlas ⁽⁷⁾.

Dichos antibacterianos se clasifican de diferentes formas:

A) De acuerdo a su origen en:

Naturales o biológicos. Cuando son obtenidos a partir de microorganismos, ya sean bacterias u hongos.

Sintéticos. Cuando se obtienen de manera total por procesos de síntesis químicas.

Semisintéticos. El núcleo fundamental de un antimicrobiano producido por un microorganismo se modifica en el laboratorio para conseguir propiedades diferentes que amplíen su espectro de acción, y que las características farmacocinéticas mejoren así como disminuyan los efectos secundarios ⁽⁷⁾.

B) De acuerdo a su efecto antibacteriano en:

Bacteriostáticos. Cuando las concentraciones que alcanzan en suero y tejidos impiden el desarrollo y multiplicación de las bacterias sin destruirlas, y al retirar el medicamento el microorganismo puede multiplicarse de nuevo. Con este tipo de antimicrobianos, es fundamental la actuación de los mecanismos de defensa del huésped.

Bactericidas. Cuando su acción es letal, produciendo la lisis bacteriana, con efectos irreversibles. El prototipo de agentes bactericidas los constituyen los que actúan sobre la pared (betalactámicos) o sobre la membrana citoplasmática de la bacteria ⁽⁷⁾.

C) De acuerdo a su espectro de acción en:

De amplio espectro. Son aquellas moléculas activas sobre un gran número de especies bacterianas (tetraciclinas).

De espectro intermedio. Cuando tienen acción sobre un número limitado de especies bacterianas (macrólidos).

De espectro reducido. Solamente son activos sobre un número pequeño de especies bacterianas (polimixina).

D) De acuerdo a su mecanismo de acción:

- Inhibidores de la síntesis de la pared celular
- Agentes que actúan sobre las membranas celulares.
- Inhibidores de la síntesis de proteínas.
- Agentes que ejercen antagonismo competitivo ⁽⁷⁾.

El uso apropiado de antibióticos conduce a los resultados terapéuticos favorables. No obstante su uso indiscriminado ha dado por resultado la emergencia de muchos microorganismos resistentes. Además los antibióticos se relacionan con reacciones adversas graves. Por lo que la decisión de usar estos fármacos debe basarse en la evidencia de que hay una infección presente que puede ser tratada ⁽³²⁾.

Este trabajo surge de la necesidad de una alternativa debido a la presencia de resistencia microbiana.

1.10 RESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia se denomina como la ausencia o disminución de la susceptibilidad de una cepa bacteriana a un determinado antimicrobiano.

Esta resistencia se puede dar debido a factores ambientales, o a causas dependientes directamente del microorganismo ⁽⁸⁾.

Natural o intrínseca. Es una propiedad específica de las bacterias sin haber tenido contacto con el antibiótico.

Adquirida. Es la que se lleva a cabo por mutaciones y/o transferencia genética. Las bacterias productoras de antibióticos son por definición resistentes.

Mutaciones cromosómicas. Estas se dan en forma espontánea cuando la bacteria está expuesta a radiaciones ó cambios químicos. Específicamente relacionada al antibiótico dando un alto nivel de resistencia. Indirectamente relacionada a una acción bioquímica del antibiótico dando un bajo nivel de resistencia que puede aumentar progresivamente ⁽³¹⁾.

Presencia de ADN extracromosomal. La resistencia se adquiere después de un cambio en el DNA cromosómico o por la adquisición de un DNA extracromosómico. A dicha alteración del DNA se le denomina mutación y a la adquisición de DNA extracromosómico se le llama intercambio genético.

Dichos cambios llevan a la formación de enzimas y/o proteínas que inactivan eficazmente a los antibióticos ⁽⁸⁾.

Los plásmidos no son esenciales para la supervivencia de la bacteria, codifican una amplia variedad de determinantes genéticos que permiten su estancia bacteriana. Para sobrevivir en ambientes adversos o para competir con otras bacterias que viven en un mismo nicho ecológico ⁽³¹⁾.

La resistencia bacteriana es un problema progresivo con tendencia a empeorar, lo que va a provocar el fracaso terapéutico, enfermedad prolongada, mayor costo del tratamiento y consecutivamente a la toxicidad al huésped, por lo que es necesario implementar nuevas terapias para atacar a las bacterias.

Una posible terapia es la que se presenta en éste trabajo ya que los componentes de dicho tratamiento son completamente naturales y de fácil obtención, no obstante es necesario hacer más pruebas que avalen la eficacia del tratamiento, así como la determinación de la concentración que se debe utilizar para tal fin.

1.11 GENERALIDADES DE QUITOSÁN. (Qn)

El Quitosán es un derivado de la Quitina el cual es un compuesto cristalino cuya estructura esta formada de polisacáridos que ha sido bien estudiada por medio de difracción de rayos-X, espectrofotometría de absorción Infrarrojo, Espectroscopia vibracional.

Se ha encontrado distribuido ampliamente en la naturaleza, en el exoesqueleto de crustáceos, en la cutícula de algunos insectos y en la pared celular de bacterias y hongos ⁽⁹⁾.

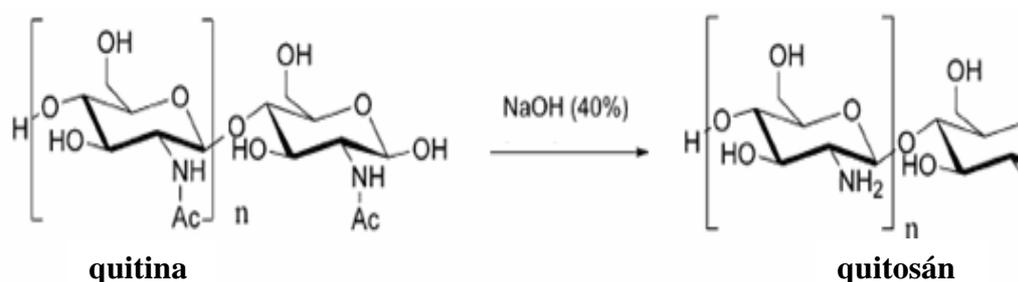


Fig. 1. Estructura de la Quitina y del Quitosán ⁽¹⁰⁾.

Entre, los materiales compuestos naturales, los exoesqueletos de camarones, cangrejos revisten gran importancia por su abundancia como desperdicio de la industria pesquera, siendo de gran interés científico debido a las interacciones químicas que presentan entre los polímeros que los componen, Quitina y Quitosán, con proteínas (Fig. 1) ⁽¹⁰⁾.

Cuando el Quitosán está sujeto a mezclas de ácido/agua, una proporción de los grupos amino primarios de la molécula de Quitosán se protonan adquiriendo una carga positiva.

La mayoría de las plantas productoras de Quitosán están localizadas cerca de las procesadoras de cangrejo y camarón, los cuales son transportados de las plantas procesadoras a las instalaciones de producción. Los desperdicios de marisquerías son molidos en hojuelas y tratados con una solución alcalina para disolver las proteínas no acomplexadas presentes en los desperdicios. Los líquidos son separados de los sólidos, y las proteínas son más tarde recuperadas y vendidas. Lo que queda de los desperdicios de los caparzones es tratado con ácido clorhídrico para extraer los minerales como calcio y magnesio. El Quitosán puede ser producido en una variedad de formas, como hojuelas, polvos, glóbulos, películas y geles ⁽¹¹⁾.

El Quitosán forma una película fina y flexible sobre la piel que evita la pérdida de agua y proporciona elasticidad. Se incluye en cosméticos antiarrugas, calmantes, hidratantes, y tensores. En cosmética capilar, la película del Quitosán protege el cabello de las agresiones externas, reduce la carga estática y confiere una fijación ligera del peinado.

También posee una actividad antimicrobiana (Tabla 3) que justifica su empleo en desodorantes y antitranspirantes ⁽¹²⁾.

Se utiliza como material alternativo de películas flexibles biodegradables presenta propiedades funcionales similares a las tradicionales derivadas de productos petroquímicos (polietileno, polivinilo). Tanto el Quitosán como otros polímeros son capaces de actuar como barreras selectivas entre el medio y la herida generando ambientes modificados en cuanto a la concentración de gases y vapores ⁽¹²⁾.

El Quitosán de alto peso molecular se encuentra dentro de nuevos materiales de uso en odontología tanto para la prevención como para el tratamiento de las enfermedades bucales, ya que es un polímero catiónico proveniente de la quitina que es utilizado como un vehículo de liberación controlada de fármacos, con propiedad osteoconductor y con acción sobre la proliferación de fibroblastos ⁽¹³⁾.

Es empleado para la preparación de microcápsulas adhesivas para la liberación controlada de fármacos en la mucosa bucal.

Sus propiedades bioadhesivas así como la inhibición de la adhesión a célula bucales y efectos antifúngicos no específicos del Quitosán permitirían considerar a estos productos como una alternativa terapéutica para la estomatitis proteica con una mejor aceptación del paciente y una disminución de los efectos colaterales de los tratamientos antifúngicos convencionales ⁽¹³⁾.

En la agricultura la investigación en la Universidad del estado de Washington ha mostrado que el recubrimiento de semillas de trigo con Quitosán ha incrementado el rendimiento de los cultivos, ya que se observa una protección al ataque de hongos ⁽¹¹⁾.

En 1986 aproximadamente 500 toneladas de Quitosán fueron empleadas en Japón con éste propósito, usando lechos u hojuelas del producto como filtro en el tratamiento de agua potable ⁽¹¹⁾.

Es insoluble en algunos solventes pero es soluble en ácidos orgánicos como el ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, etc.

El uso del Quitosán es el limitado por que es insoluble en agua, tiene alta viscosidad y tendencia a coagular con proteínas a alto pH, algunos investigadores preparan derivados modificados químicamente que incrementa la solubilidad en agua ⁽⁴⁰⁾.

Se han reportado dos posibles mecanismos de su acción antimicrobiana.

1) Este y otras poliaminas interactúan con la membrana celular para alterar la permeabilidad de la misma. A bajas concentraciones el Quitosán policatiónico probablemente interfiere con los residuos cargados negativamente de las macromoléculas en la superficie celular alterando la permeabilidad de la célula ⁽³⁴⁾, causando aglutinación.

A altas concentraciones, el gran número de cargas positivas impartirá una carga positiva neta en las superficies bacterianas para mantener a la bacteria en suspensión y elevando aún más la concentración de Quitosán, la superficie bacteriana estará cubierta totalmente previniendo la salida de los componentes intracelulares impidiendo la transferencia de masa en ambos sentidos ⁽¹⁴⁾.

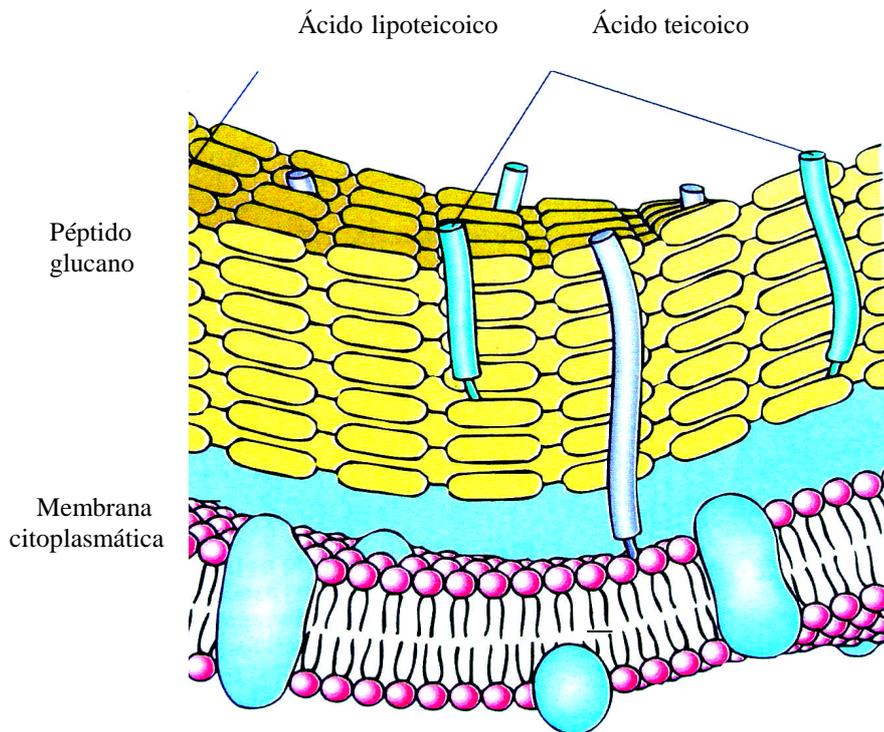


Fig. 2. Bacteria Gram + ⁽³¹⁾.

El sitio de acción de los biocidas catiónicos es la pared de la membrana celular de la bacteria, y el de los biocidas de bajo peso molecular es la membrana citoplasmática de la bacteria y el modo de acción es el siguiente:

1. Adsorción a la superficie de la célula bacteriana
2. Difusión a través de la pared celular
3. Unión a la membrana citoplasmática
4. Ruptura de la membrana citoplasmática
5. Liberación de los constituyentes tales como iones K, DNA Y RNA
6. Muerte de la célula ⁽¹¹⁾.

La densidad de carga con forma de una espiral sencilla de polielectrolitos que incrementa con el peso molecular, y hay potenciación de la adsorción de policationes en la superficie celular cargada negativamente ⁽¹⁾.

Lo que favorece a la unión del policatión a la membrana citoplasmática ⁽³⁾. Se tiene antecedentes de que es más activo contra *Staphylococcus aureus* que contra *Escherichia coli*, se presume que esto es debido por la estructura de las paredes celulares Gram + y Gram -. Las bacterias Gram + tienen una pared celular con estructura simple (Fig. 2). Fuera de la membrana citoplasmática hay solo una capa rígida, constituida de peptidoglicano.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de Quitosán ⁽³⁷⁻³⁸⁾.

Bacteria	CMI a (ppm)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	100
<i>Bacillus cereus</i>	1000
<i>Corinebacterium michiganence</i>	10
<i>Erwinia sp</i>	500
<i>Erwinia carotovora subsp</i>	200
<i>Escherichia coli</i>	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	700
<i>Micrococcus luteus</i>	20
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	500
<i>Staphylococcus aureus</i>	20
<i>Xanthomonas campestris</i>	500

En cambio las bacterias Gram - tienen pared celular muy complicada (Fig. 3), fuera de la capa de peptidoglicano se encuentra la membrana externa con una estructura similar a la membrana citoplasmática. La membrana externa es una barrera potencial contra moléculas extrañas. La liberación de los constituyentes intracelulares es probablemente una de las claves en la inactivación celular ⁽¹¹⁾.

2) El otro mecanismo tiene actividad antifúngica ⁽³⁴⁾.

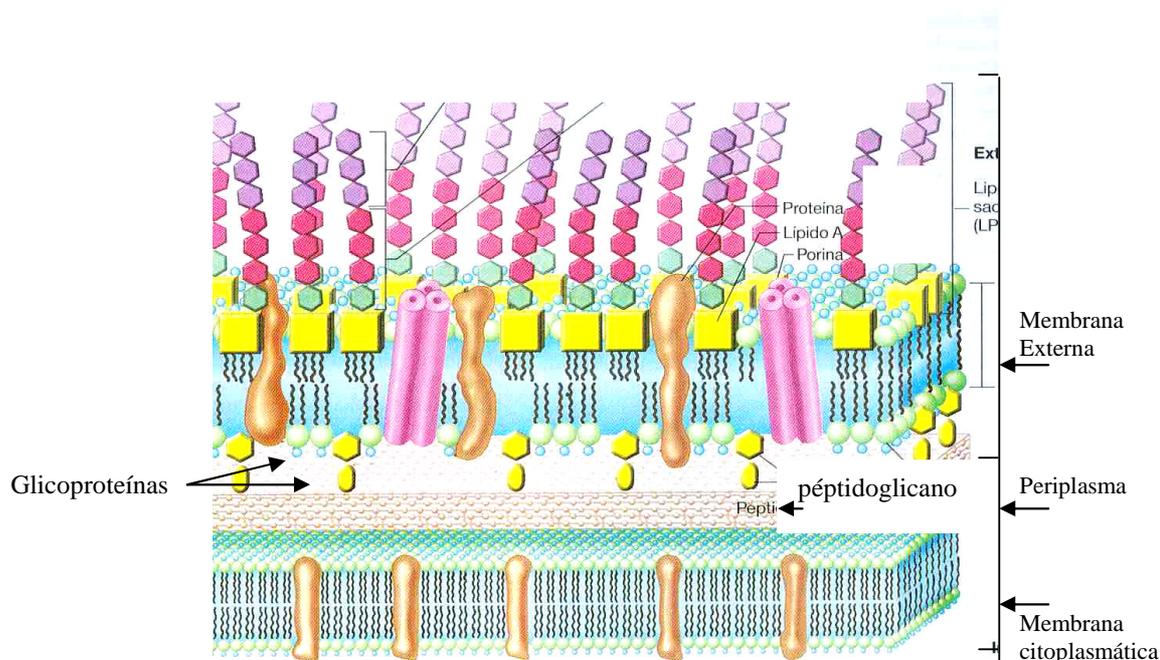


Fig. 3. Bacteria Gram - ⁽³¹⁾.

1.12 GENERALIDADES DE *Caléndula officinalis*.

La Herbolaria estudia las propiedades curativas y medicinales de la gran diversidad de hierbas y plantas. Esta es una práctica milenaria que nunca ha dejado de tener vigencia ⁽²²⁾.

Históricamente, la medicina herbal ha sido practicada durante siglos por herbolarios tradicionales, que han estado íntimamente implicados en el cultivo, preparación y prescripción de productos botánicos, y que pueden identificar con facilidad especies de plantas y sus potenciales. Ahora la mayor parte de los productos herbales se cultiva comercialmente, se transforma en ambientes no regulados, y se vende en forma libre, sin asesoría de un profesional calificado en salud ⁽³²⁾.

El Biólogo M.C. Mauricio González Ferrara refiere que en la herbolaria internacional se habla de tres países en cuanto a cultura herbolaria se refiere: México, India y China. La investigación de plantas medicinales consta de diferentes disciplinas: la etnomedicina, la farmacología, la fitoquímica, la toxicología, la investigación clínica, la biotecnología y el diseño de medicamentos. Este proceso de investigación no puede ser desarrollado por un solo grupo, en realidad es una larga cadena en la que debe intervenir mucha gente, diferentes instituciones, dependencias de gobierno y particularmente la industria ⁽²¹⁾.

El género *Caléndula* pertenece a la familia *Asteraceae officinalis* es una planta anual que se cultiva en todo el mundo y sus flores son utilizadas tanto desde el punto de vista ornamental como para la industria farmacéutica cosmética. Es una planta anual o perenne originaria del sur de Europa y en México es cultivada como planta de ornato, se encuentra presente en clima semi seco y templado desde los 20 hasta 2000 m. sobre el nivel del mar ^(23 - 25). La planta se recolecta principalmente durante el mes de agosto en el cual las flores son más abundantes (Fig. 4).

Nombre científico: *Caléndula officinalis*

Familia: Compuestas

Nombre común: *Caléndula*, maravilla, marigold, alta reyna, mercadela ^(23 - 24 - 26).



Fig. 4. Flor de *Caléndula officinalis* ⁽²¹⁾.

Caléndula officinalis es una hierba anual mas o menos pelosa, de 30 a 60 cm. De altura; hojas simples, alternas, algo gruesas, de oblongas a obovado oblongas, enteras o diminutas y remotamente denticuladas, cabezuelas solitarias en pedúnculos robustos, vistosos de 3.75 a 5 cm.

Los radios planos, extendidos de color amarillo blanquecino hasta anaranjado subido, que se cierran por la noche, a veces la planta es plorífera desde el involucro, y porta varias cabezuelas pedunculadas en un círculo ^(15 - 16).

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos obtenidos a partir de diferentes partes de las plantas como flores, yemas, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces. De acuerdo a sus características químicas son mezclas complejas de ésteres, aldehídos cetonas y terpenos. Además son compuestos olorosos, muy solubles en alcohol y poco solubles en agua. Para la extracción de estos compuestos se pueden utilizar distintos solventes como el acetato, etanol, y cloruro de etileno, originándose compuestos con alta actividad antimicrobiana ⁽¹⁷⁾.

La parte más empleada de la planta es la flor ó los pétalos, que tienen entre los componentes que se han aislado los siguientes: Ácidos fenólicos, carbohidratos, cumarinas, taninos, carotenos, saponinas, tocofenoles, mucilagos, flavonoides, vitaminas y aceites esenciales ⁽¹⁰⁾. A *Caléndula* se le han comprobado experimentalmente propiedades sobre: el sistema digestivo con acción farmacológica colerética y antiulcerosa, hipoglucemiante y en la piel y mucosas es antibacteriana y antiinflamatoria.

Se ha reportado que todas las saponinas (dosis de 400 µg) demostraron tener actividad antimutagénica y no tóxica. En un modelo experimental in Vitro con extracto orgánico de flores de *Caléndula* se encontró que posee acción inhibitoria en la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana ⁽¹⁸⁾.

En aplicación interna se emplea como estimulante de la actividad hepática, la secreción biliar y en el tratamiento de úlceras gástricas. *Caléndula* es muy eficaz para la prevención de las radio dermatitis agudas de grado 2 o superior y debe proponerse a las pacientes que siguen una radioterapia postoperatoria por cáncer de mama" ⁽³⁷⁾.

Externamente de decocción, tintura o pomada se emplea en escaras, úlceras varicosas, erupciones cutáneas y otras afecciones de la piel (Tabla 4) ⁽¹⁹⁾. Con la experiencia obtenida del resultado del estudio realizado por investigadores de la Habana, Cuba se pudo mostrar que *Caléndula* puede ser utilizada con efectividad en las curas de las heridas sépticas de los pacientes con gérmenes Gram positivo y Gram negativo, logrando un buen proceso de granulación y cicatrización en un periodo corto de tiempo con buenos resultados epidemiológicos, sin riesgo de reacciones adversas.

Promueve rápidamente la reparación del tejido fino y reduce al mínimo la formación de cicatriz, resuelve la inflamación, hinchazón y exudado debido a las lesiones, reduce la congestión venosa, ayuda al cuerpo a reponerse después de la lesiones, antiséptico, antibacteriano, antihongo, astringente, espasmos musculares .

En cosméticos integra formulaciones, entre ellas lociones, cremas, jabones, shampoo y en la industria alimenticia se emplean colorantes elaborados de éstas flores ⁽¹⁹⁾.

La composición del extracto de *Caléndula officinallis* es muy amplia, entre los componentes que experimentalmente se han identificado se encuentran como ya se mencionó componentes lipofílicos activos de las flores como las saponinas con propiedades mutagénicas, triterpenos hidroxilados con propiedades antiinflamatorias y antiedematosa; glicósidos de flavonol con posibles propiedades anticarcinogénicas, analgésica y antitumoral ⁽²⁰⁾. Contienen alcoholes triterpénicos (arnidol, faradiol, taraxasterol, alfa y beta-Amirina) y su contenido en un principio amargo (calendina) le dan acción antibiótica, antiparasitarias, antifúngica, antiviral y estrogénica ⁽²⁰⁾.

Tabla 4. Forma de preparación y usos de *Caléndula officinallis* ⁽²⁶⁾.

Forma de preparación	Usos
Infusión	Emenagoga y reguladora menstrual, colerética y antiulcerosa. Gastroenteritis y vómitos
Pomada	Quemaduras y eccemas.
Aceite	Contra verrugas víricas (vulgares) de la piel. Suavizante e hidratante de la piel.
Loción de jugo	Quemaduras, furúnculos y eccemas.
Cataplasma	Quemaduras, furúnculos y eccemas. Acción antirreumática.
Compresas	Quemaduras, furúnculos, eccemas, antirreumática y callicida.

1.13 Ensayo colorimétrico de Mossman con 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

Mosmann en 1983 desarrolla este método, siendo modificado por Francois Denizot y Rita Lang. El MTT, también conocido como Azul de Tiazol, es una sal de tetrazolio soluble en agua. En solución tiene una coloración amarilla ⁽²⁷⁾. La prueba colorimétrica de MTT ha sido previamente descrita para medir citotoxicidad y proliferación celular ⁽²⁸⁾ así como para un índice de medición de activación celular ⁽²⁹⁾ ambos cuantitativa y cualitativamente.

La prueba de MTT se basa en la capacidad de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de las células viables para transformar la sal de MTT tetrazolio (de color amarillo), en un producto de color azul (MTT formazan). La intensidad del color azul será proporcional al número de células vivas presentes ⁽³⁰⁾. La absorbancia del colorante se mide a una longitud de onda de 590 nm o a la longitud más cercana ⁽²⁷⁾.

II JUSTIFICACIÓN.

Las infecciones nosocomiales constituyen un problema en la mayoría de los hospitales. En el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) se definió una serie de lineamientos para la vigilancia epidemiológica, prevención y control; por su parte la Secretaría de Salud decretó una norma oficial mexicana al respecto ^(40 - 41).

Al ser un padecimiento agregado, la infección prolonga el internamiento del paciente e incrementa los gastos institucionales. Por lo que tienen un gran impacto económico, social y laboral.

Ante la inminente frecuencia de heridas infectadas que se presentan en todos los centros de Salud de la República Mexicana y sin duda en todo el mundo, ya sea por heridas nosocomiales o provocadas por traumatismos externos a las instituciones, es necesario emplear tratamientos que sean eficaces contra dichas infecciones, ya que se está presentando con más frecuencia y fuerza la resistencia bacteriana a tratamientos ya establecidos.

Por lo tanto es importante implementar nuevos tratamientos aprovechando la riqueza natural del país, ya que se cuenta con muchas plantas que han sido utilizadas desde años y que tienen diversos efectos en padecimientos así como en infecciones.

En este trabajo nos dimos a la tarea de evaluar dos compuestos de origen natural, por un lado el extracto de *Caléndula officinalis* y por el otro Qitosán, para observar sus efectos sobre diversas cepas bacterianas y dar pauta a futuras investigaciones.

III HIPÓTESIS.

* Si se ha demostrado experimentalmente que el extracto de *Caléndula officinalis* presenta actividad antimicrobiana en algunas cepas bacterianas, y de igual forma el Quitosán, entonces se espera que exista un sinergismo. Por lo que dicha actividad posiblemente sea bactericida sobre las cepas que se encuentran comúnmente en heridas infectadas de humano.

IV OBJETIVOS.

General:

* Comprobar el efecto sinérgico y/o antagónico de Quitosán y extracto etanólico de *Caléndula officinalis* en bacterias comúnmente asociadas a infecciones de heridas de humanos por medio de ensayos *in Vitro* y la realización de los isobogramas correspondientes.

Particulares:

- Aislar e identificar bacterias a partir de muestras clínicas de heridas infectadas por medio de métodos bacteriológicos.
- Realizar el ensayo del Quitosán pH 4, 5 y 6 con las bacterias aisladas de las muestras clínicas para determinar la CMI de cada Quitosán.
- Realizar el ensayo del extracto de *Caléndula officinalis* con las bacterias aisladas de las muestras clínicas para determinar la CMI
- Determinar si existe sinergismo y/o antagonismo por medio de la realización de los isobogramas correspondientes para *Caléndula officinalis* y Quitosán pH 4, *Caléndula officinalis* y Quitosán pH 5, y *Caléndula officinalis* y Quitosán pH 6.
- Comprobar el efecto bactericida y/o bacteriostático para las mezclas correspondientes para *Caléndula officinalis* y Quitosán pH 4, *Caléndula officinalis* y Quitosán pH 5, y *Caléndula officinalis* y Quitosán pH 6.
- Determinar la influencia del pH sobre el efecto antibacteriano del Quitosán.

V MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Obtención del extracto de *Caléndula officinalis*.

El extracto de *Caléndula Officinalis* fue proporcionado por el laboratorio de Microbiología No. 10 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1 en el área de posgrado.

5.2 Determinación de la concentración en g/ ml del extracto de *Caléndula officinalis* para la determinación de la CMI, y para la elaboración de los isobogramas

Los pétalos de las flores se secaron en una estufa a 56 °C el tiempo necesario. Se colocaron 5g de los pétalos en un matraz Erlenmeyer que contiene 500 mL de etanol al 70 %, se mantuvo en agitación durante 3 días protegido de la luz. Se retiró el material insoluble por filtración empleando papel filtro del n° 3 Wattman®, el macerado se colocó en un rotavapor a 56 °C hasta casi sequedad. Se obtuvo el material sólido y de aquí se pesaron 0.1 g, se disolvieron en 1 mL de DMSO y se aforó a 200 mL de D-MEM, para una concentración de 0.5 mg/ mL I⁽²¹⁾.

Por otro lado se pesaron 1.2 g, se disolvieron en 2 mL de DMSO y se aforó a 150 mL de D-MEM, para una concentración de 8000 µg / mL I⁽²¹⁾ la cual se diluyó nueve veces hasta lograr una concentración de 31.25 µg / mL. Las nueve concentraciones obtenidas se utilizaron para encontrar la CMI de *Caléndula* para cada bacteria.

5.3 Obtención de Quitosán a pH 4, pH 5, Y pH 6.

El Quitosán de PM 63,088 g/mol (peso molecular medio viscosimétrico), G.D. 85% a pH 4, pH 5 y pH 6 al 1 % de concentración, fue proporcionado por el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1 en el área de posgrado. Una vez obtenida la CMI de los quitosanos a diferentes pH's para cada bacteria, se procede a diluirlos n veces (dependiendo de cada bacteria) de forma que la CMI obtenida quede en el punto medio de las concentraciones resultantes para la elaboración de los isobogramas.

5.4 Obtención de cepas bacterianas

Las cepas bacterianas fueron aisladas de 50 muestras de heridas infectadas proporcionadas por el laboratorio de Bacteriología del Hospital General clínica 57, IMSS (Tabla 5).

5.5 Identificación de cepas bacterianas.

Cada cepa fue proporcionada en un medio de cultivo, ya fuera en tubo o placa, observando las características del medio y de las colonias existentes se procedió a la resiembra de cada cepa en medios de cultivo selectivos, o enriquecidos según fuera el caso. Posteriormente se realizaron las pruebas bioquímicas pertinentes para cada cepa, logrando así su identificación (Ver anexo tabla 43 y tabla 44).

Una vez logrado lo anterior se seleccionaron 3 cepas de cada género y se sembraron en agar BHI en tubo para su conservación, debidamente rotuladas (Tabla 6).

Tabla 5. Bacterias identificadas obtenidas de muestras clínicas.

Mta.	Bacteria	Mta.	Bacteria	Mta.	Bacteria
S - 1	<i>Enterobacter spp.</i>	S - 18	<i>Staphylococcus aureus.</i>	S - 35	<i>Klebsiella spp.</i>
S - 2	<i>Enterobacter spp.</i>	S - 19	<i>Staphylococcus aureus.</i>	S - 36	<i>Escherichia coli</i>
S - 3	<i>Enterobacter spp.</i>	S - 20	<i>Streptococcus pyogenes</i>	S - 37	<i>Enterobacter spp.</i>
S - 4	<i>Streptococcus pyogenes</i>	S - 21	<i>Pseudomonas spp.</i>	S - 38	<i>Enterobacter spp.</i>
S - 5	<i>Salmonella spp.</i>	S - 22	<i>Salmonella spp.</i>	S - 39	<i>Escherichia coli</i>
S - 6	<i>Salmonella spp.</i>	S - 23	<i>Pseudomonas spp..</i>	S - 40	<i>Klebsiella spp.</i>
S - 7	<i>Salmonella spp.</i>	S - 24	<i>Klebsiella spp.</i>	S - 41	<i>Salmonella spp.</i>
S - 8	<i>Staphylococcus aureus.</i>	S - 25	<i>Enterobacter spp.</i>	S - 42	<i>Klebsiella spp.</i>
S - 9	<i>Staphylococcus aureus.</i>	S - 26	<i>Proteus spp.</i>	S - 43	<i>Salmonella spp.</i>
S - 10	<i>Staphylococcus aureus.</i>	S - 27	<i>Escherichia coli</i>	S - 44	<i>Escherichia coli</i>
S - 11	<i>Streptococcus pyogenes</i>	S - 28	<i>Staphylococcus aureus.</i>	S - 45	<i>Pseudomonas spp.</i>
S - 12	<i>Staphylococcus aureus.</i>	S - 29	<i>Staphylococcus aureus.</i>	S - 46	<i>Escherichia coli</i>
S - 13	<i>Pseudomonas spp.</i>	S - 30	<i>Streptococcus pyogenes</i>	S - 47	<i>Klebsiella spp.</i>
S - 14	<i>Proteus spp.</i>	S - 31	<i>Escherichia coli</i>	S - 48	<i>Salmonella spp.</i>
S - 15	<i>Klebsiella spp.</i>	S - 32	<i>Staphylococcus aureus.</i>	S - 49	<i>Pseudomonas spp.</i>
S - 16	<i>Proteus spp.</i>	S - 33	<i>Staphylococcus aureus.</i>	S - 50	<i>Proteus spp.</i>
S - 17	<i>Pseudomonas spp.</i>	S - 34	<i>Staphylococcus aureus.</i>		

Tabla 6. Cepas de bacterias utilizadas en la experimentación.

Bacteria	No. de mta.	No. de mta.	No. de mta.
<i>Enterobacter spp.</i>	S - 1	S - 25	S - 37
<i>Escherichia coli</i>	S - 27	S - 36	S - 39
<i>Klebsiella spp.</i>	S - 15	S - 24	S - 42
<i>Proteus spp.</i>	S - 14	S - 26	S - 50
<i>Pseudomonas spp.</i>	S - 13	S - 23	S - 45
<i>Salmonella spp.</i>	S - 6	S - 22	S - 41
<i>Staphylococcus aureus</i>	S - 8	S - 28	S - 34
<i>Streptococcus pyogenes</i>	S - 1	S - 20	S - 30

5.6 Método de dilución.

La cuantificación *in Vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estas técnicas son utilizadas para medir semi-cuantitativamente la actividad *in Vitro* de un agente antimicrobiano frente a un cultivo de una cepa bacteriana y permiten determinar la CMI que es la menor concentración del antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. Esto se basa en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo ⁽³⁴⁾.

La reproducibilidad de estas pruebas es de +/- 1 dilución para evitar una gran variabilidad, estas técnicas deben ser estandarizadas y controladas cuidadosamente, son muy útiles en el estudio de nuevos agentes antimicrobianos como el que se quiere probar en este trabajo ⁽³⁴⁾.

Dilución en caldo. En este método se colocan concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano, generalmente diluciones al medio de factor 2 (1:2), en tubos con un caldo de cultivo que sostendrá el desarrollo del microorganismo. El último tubo no recibe agente antimicrobiano y sirve de control de crecimiento. Luego se separa el inóculo ajustándolo a un estándar de turbidez (0.5 de Mac Farland) y se añade a cada tubo el inóculo ajustado para después incubar. Más tarde se determina la CMI. Que se lee como la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibió el crecimiento visible del m.o. ⁽³⁴⁾.

5.7 Isobogramas.

Los isobogramas son representaciones gráficas en un eje de coordenadas de dosis isoeffectivas (para un determinado efecto) en cada uno de los antibacterianos utilizados individualmente y de su combinación.

Permite evaluar si hay sinergia o antagonismo. En cada uno de los ejes del isobograma se representa la dosis isoeffectiva de uno de los antibacterianos que se estudian. Estos puntos se unen mediante una línea (isobolo) que también se conoce como línea de adictividad o de no interacción.

Los efectos se expresan en isobolos y en índices de concentración inhibitoria fraccionada (FIC), también se conoce como Cálculo del coeficiente de sinergismo (CS), el índice FIC o CS es igual a la suma de los valores de FIC correspondiente a cada antimicrobiano.

Los resultados de la MIC en la combinación de concentraciones de las sustancias de ensayo servirán para calcular posteriormente el coeficiente de sinergismo (CS) y determinar si el efecto es sinérgico (S), indiferente (I) o antagónico (A) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{FIC del antimicrobiano A} = \frac{\text{MIC del antimicrobiano A en combinación}}{\text{MIC del antimicrobiano solo}}$$

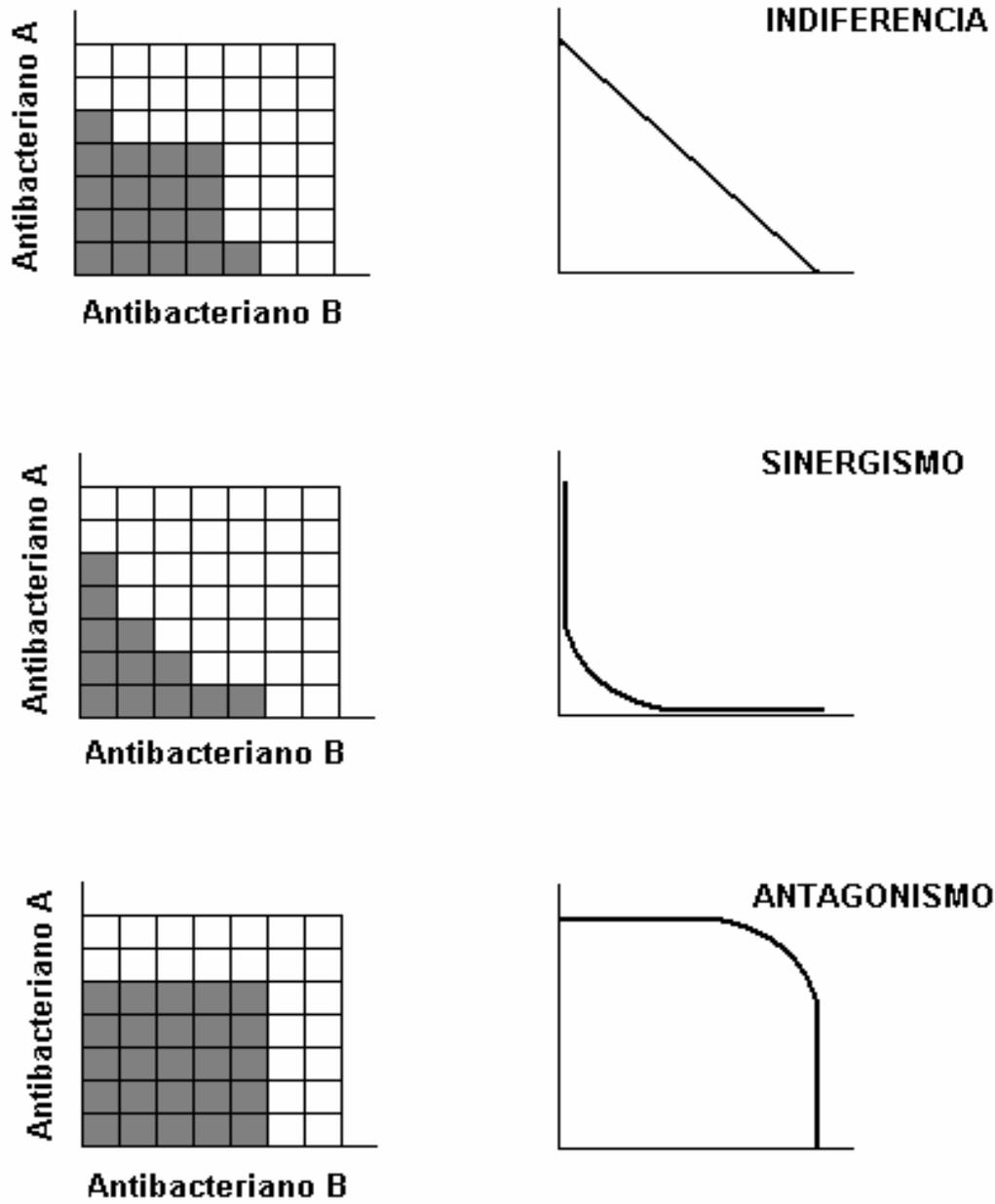
Se aplica la misma fórmula para el antimicrobiano B. Y posteriormente se realiza la sumatoria de ambos valores, donde:

Sinergismo $x \leq 0.5$

Indiferencia $0.5 < x \leq 4$

Antagonismo $x > 4$

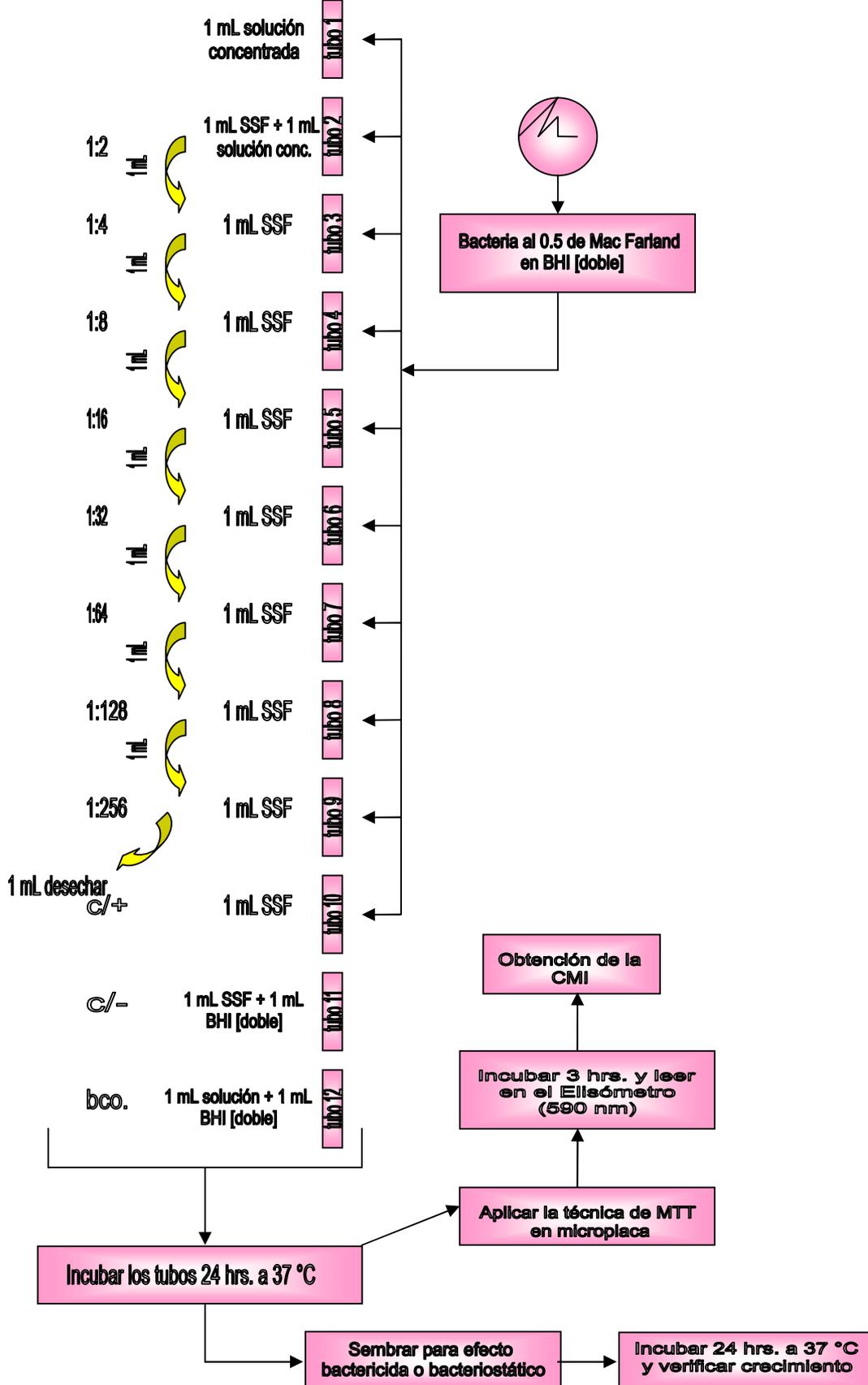
Fig. 5 . Isobogramas.



5.8 Análisis estadístico.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza para este trabajo con observaciones repetidas ya que se utilizó un mismo cultivo para probar los diferentes tratamientos (*Caléndula* sola, *Caléndula* con los diferentes Quitosanos, Quitosanos solos a los diferentes pH's, etc.). El análisis de varianza (Anova) se hizo con dos factores: El tipo de tratamiento y la dilución. Se utilizó prueba de Tuckey posterior al Anova para obtener el valor de "p" y observar las diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

5.9 Diagrama de trabajo para obtención de la CMI.



Entiéndase por **solución**, la sustancia que contiene *Caléndula officinalis*, Quitosán a los diferentes pH's (el diagrama se repite para cada ensayo).

5.10 Ensayo

1. Bacteria - *Caléndula officinalis*
2. Bacteria - Qn pH 4
3. Bacteria - Qn pH 5
4. Bacteria - Qn pH 6

Este ensayo se llevó a cabo para cada bacteria en tubo.

Prueba cualitativa. Una vez identificada cada cepa, (ver anexo tabla 43 y tabla 44) se procede al ensayo. Todo el procedimiento se realiza en condiciones de esterilidad, incluyendo el material utilizado. La bacteria se siembra por estria en una placa de agar BHI y se incuba 24 horas a 37 ° C.

Cumplido el tiempo de incubación, se estandariza la bacteria con ayuda de la escala de Mac Farland utilizando el tubo 0.5 con caldo BHI a doble concentración, esto se debe a que cuando se agregue el extracto de *Caléndula* y/o el Quitosán, la concentración del caldo será la establecida por el fabricante para el óptimo crecimiento del microorganismo .

Previamente se tienen tres juegos de doce tubos estériles con taparosca ó placas de 24 pozos estériles de 3 mL de capacidad c/pozo, debidamente rotulados como sigue:

- Tubo 1 bacteria / solución concentrada
- Tubo 2 bacteria / solución a concentración 1:2
- Tubo 3 bacteria / solución a concentración 1:4
- Tubo 4 bacteria / solución a concentración 1:8
- Tubo 5 bacteria / solución a concentración 1:16
- Tubo 6 bacteria / solución a concentración 1:32
- Tubo 7 bacteria / solución a concentración 1:64
- Tubo 8 bacteria / solución a concentración 1:128
- Tubo 9 bacteria / solución a concentración 1:256
- Tubo 10 Control positivo
- Tubo 11 Control negativo
- Tubo 12 Blanco

Se procede a realizar las diluciones con 1 mL solución salina fisiológica estéril como se muestra en el diagrama de trabajo y después se deposita 1 mL de bacteria estandarizada al 0.5 de Mac Farland en cada tubo, excepto en los tubos 11 (control -) y 12 (blanco).

Una vez realizado lo anterior, los doce tubos se dejan en incubación 24 horas a 37° C. Al cumplirse dicho tiempo se realiza la observación de los tubos, comparando la turbidez tomando como referencia el control positivo. La prueba se realiza con tres cepas del mismo género (Tabla 6), para hacer un total de 36 tubos por bacteria.

5.11 Ensayo

1. Bacteria - *Caléndula officinalis*
2. Bacteria - Qn pH 4
3. Bacteria - Qn pH 5
4. Bacteria - Qn pH 6

Este ensayo se llevó a cabo para cada bacteria en microplaca.

Prueba cuantitativa con la técnica de MTT. Esta prueba es realizada con los mismos tubos de la prueba cualitativa una vez que se han realizado las anotaciones correspondientes de los resultados obtenidos.

En condiciones de esterilidad se procede a la prueba cuantitativa. Se rotula una microplaca como sigue:

Fig. 6. Rótulos en microplaca.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	Bacteria 1
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	Bacteria 1
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	Bacteria 1
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	Bacteria 2
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	Bacteria 2
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	Bacteria 2
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	Bacteria 3
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	Bacteria 3

Solución

Donde:

- Bacteria 1 es *Enterobacter spp*
- Bacteria 2 es *Escherichia coli*
- Bacteria 3 es *Klebsiella spp*
- Bacteria 4 es *Proteus spp*
- Bacteria 5 es *Pseudomonas spp*
- Bacteria 6 es *Salmonella spp*
- Bacteria 7 es *Staphylococcus aureus*
- Bacteria 8 es *Streptococcus pyogenes*

Con ayuda de una micropipeta de volúmenes ajustables y de puntas estériles se realiza el llenado de los pozos como sigue:

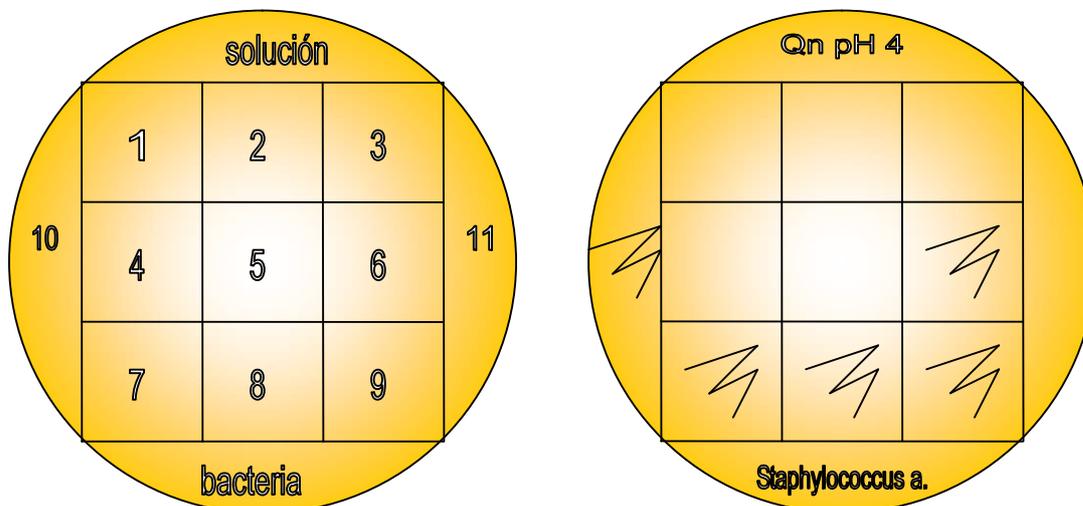
- * 90 μ L del Tubo 1 en el pozo A1
- * 90 μ L del Tubo 2 en el pozo A2
- * 90 μ L del Tubo 3 en el pozo A3
- * 90 μ L del Tubo 4 en el pozo A4
- * 90 μ L del Tubo 5 en el pozo A5
- * 90 μ L del Tubo 6 en el pozo A6
- * 90 μ L del Tubo 7 en el pozo A7
- * 90 μ L del Tubo 8 en el pozo A8
- * 90 μ L del Tubo 9 en el pozo A9
- * 90 μ L del Tubo 10 en el pozo A10 (control +)
- * 90 μ L del Tubo 11 en el pozo A11 (control -)
- * 90 μ L del Tubo 12 en el pozo A12 (Blanco)

Se realiza el mismo procedimiento con cada cepa del mismo género (Tabla 6) tomando en cuenta el orden de las bacterias que se muestra en la Fig. 6. Una vez terminado lo anterior se agrega a cada pozo 10 μ L de reactivo de MTT.

Se incuba la microplaca a 37° C por 3 horas. Al cabo de este tiempo se realiza la lectura correspondiente en un lector de ELISA a 590 nm (BIORAD). Con esta prueba se determinará la Concentración Mínima Inhibitoria de *Caléndula officinalis*, Quitosán pH 4, Quitosán pH 5 y Quitosán pH 6.

5.12 Comprobación de efecto bactericida o bacteriostático.

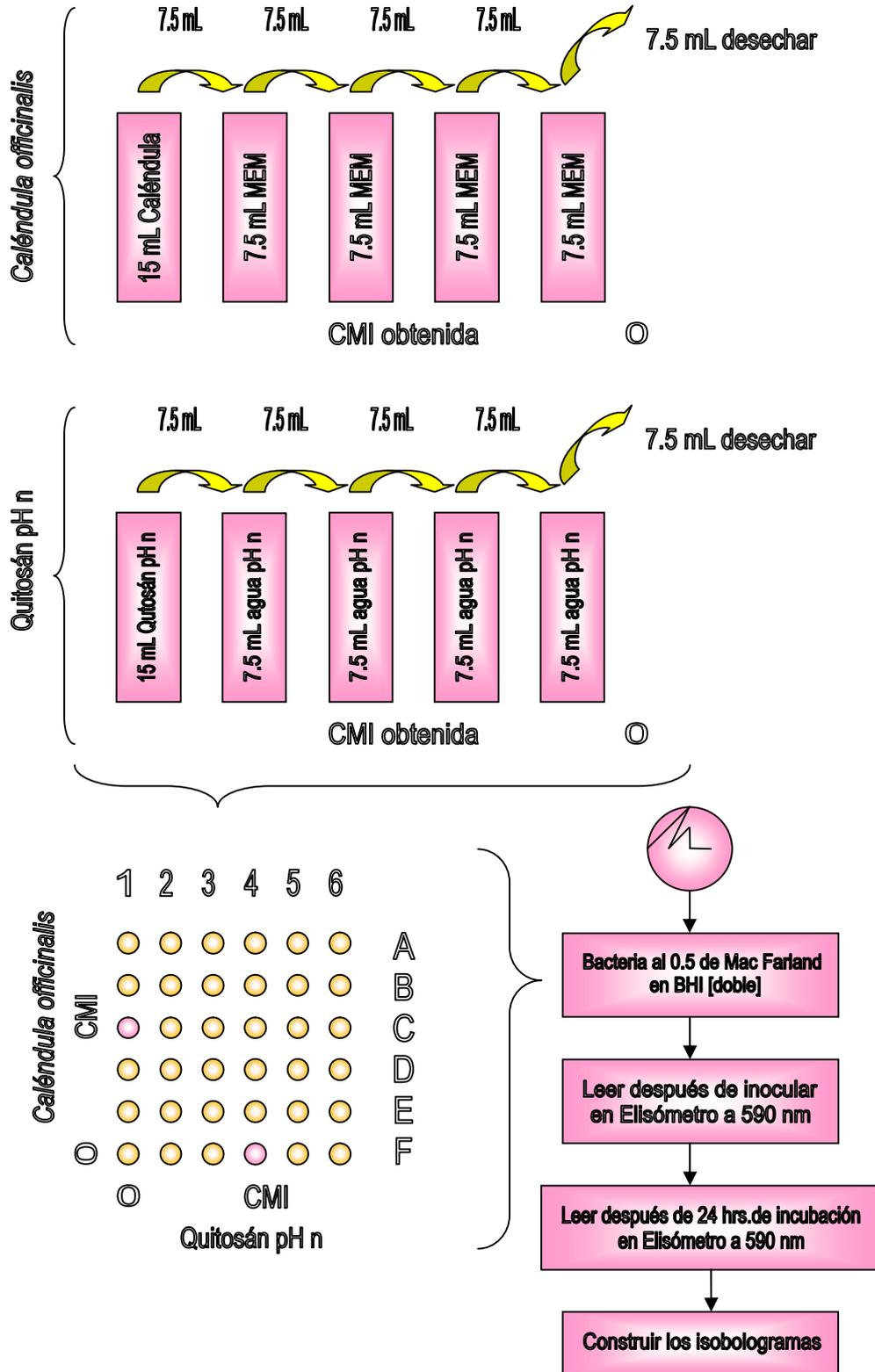
Fig. 7. Placa petri rotulada y placa petri con muestra inoculada.



Esta prueba también se realiza con los tubos de la prueba cualitativa. En condiciones de esterilidad de cada tubo se toma con ayuda de una asa bacteriológica una asada y se siembra en una placa de agar BHI, la placa se rotula (Fig. 7) y se incuba 24 horas a 37 °C. No se siembra el tubo 12 ya que es el blanco, y se espera que no se presente crecimiento en el inóculo del tubo 11 ya que es el control -.

Pasado este tiempo se realizan las lecturas y anotaciones correspondientes.

5.13 Diagrama de trabajo para la realización de los isoblogramas.



Para la construcción de los isobogramas, se procedió a realizar diluciones del extracto de *Caléndula officinalis* partiendo de la solución más concentrada (4000 µg/mL), tomando como referencia la CMI obtenida de la primera prueba cuantitativa en microplaca realizada en el presente trabajo. Se utilizaron 5 tubos de ensayo. Primero se tomaron 15 mL de la solución más concentrada con ayuda de una pipeta estéril y en condiciones de esterilidad, se vaciaron en el primer tubo. En los cuatro tubos restantes se vació 7.5 mL de MEM, del primer tubo se tomó 7.5 mL de la solución concentrada y se procedió a realizar las diluciones como se muestra en el diagrama de trabajo (5.13).

Así mismo se realizaron las diluciones de Quitosán pH 4 (con agua destilada a pH 4), Quitosán pH 5 (con agua destilada a pH 5) y Quitosán pH 6 (con agua destilada a pH 6). Tomando como referencia las CMI obtenidas de la primera prueba para cada Quitosán, y que son diferentes para cada bacteria.

Se seleccionó un área de 36 pozos en una microplaca y se rotuló como se muestra en el diagrama de trabajo (5.13), posteriormente se realizó el llenado de los pozos con ayuda de una micropipeta y puntas estériles, en la columna 1 de *Caléndula* comenzando de la solución más concentrada hasta la última dilución:

- * 100 µL de *Caléndula* concentrada en el pozo A1; 50 µL en A2, A3, A4, A5, y A6
- * 100 µL de la primera dilución en el pozo B1; 50 µL en B2, B3, B4, B5, y B6
- * 100 µL de la segunda dilución en el pozo C1; 50 µL en C2, C3, C4, C5, y C6
- * 100 µL de la tercera dilución en el pozo D1; 50 µL en D2, D3, D4, D5, y D6
- * 100 µL de la cuarta dilución en el pozo E1; 50 µL en E2, E3, E4, E5, y E6

En la fila **F** se depositó 100 µL de Quitosán pH n comenzando de la solución más concentrada hasta la última dilución:

- * 100 µL de Quitosán pH n concentrado en el pozo F6; 50 µL en E6, D6, C6, B6, y A6
- * 100 µL de la primera dilución en el pozo F5; 50 µL en E5, D5, C5, B5, y A5
- * 100 µL de la segunda dilución en el pozo F4; 50 µL en E4, D4, C4, B4, y A4
- * 100 µL de la tercera dilución en el pozo F3; 50 µL en E3, D3, C3, B3, y A3
- * 100 µL de la cuarta dilución en el pozo F2; 50 µL en E2, D2, C2, B2, y A2

El pozo F1 No lleva *Caléndula* ni Quitosán

Posteriormente se llevó a cabo la estandarización de la bacteria al 0.5 de Mac Farland en caldo BHI concentración doble partiendo de un cultivo puro con crecimiento de 24 horas.

Con ayuda de una micropipeta multicanal se procedió a la inoculación de la bacteria. 100 µL de bacteria en cada pozo (zona seleccionada), y en el pozo F1 se depositó 100 µL de agua estéril, teniendo como volumen final en cada pozo 200 µL.

Al terminar la inoculación se realizó una lectura en un Elisómetro (BIORAD) a 590 nm.

La microplaca se incubó en una cámara húmeda por 24 horas a 37° C. Pasado éste tiempo se realizó otra lectura en el Elisómetro y se hicieron las observaciones pertinentes.

VI RESULTADOS.

6.1 Pruebas cualitativa, cuantitativa y efecto bactericida o bacteriostático.

Tabla 7. Ensayo de actividad bactericida/bacteriostático en diferentes bacterias aisladas de casos de heridas infectadas.

Bacteria	Caléndula	Qn pH 4	Qn pH 5	Qn pH 6
<i>Enterobacter spp</i>	BCO	BDA	BDA	BCO
<i>Escherichia coli</i>	BCO	BDA	BDA	BDA
<i>Klebsiella spp</i>	BCO	BDA	BDA	BCO
<i>Proteus spp</i>	BCO	BDA	BDA	BDA
<i>Pseudomonas spp.</i>	BCO	BDA	BCO	BCO
<i>Salmonella spp</i>	BCO	BDA	BDA	BCO
<i>Staphylococcus a.</i>	BCO	BDA	BDA	BDA
<i>Streptococcus p.</i>	BCO	BDA	BDA	BCO

BCO = Presenta efecto bacteriostático.

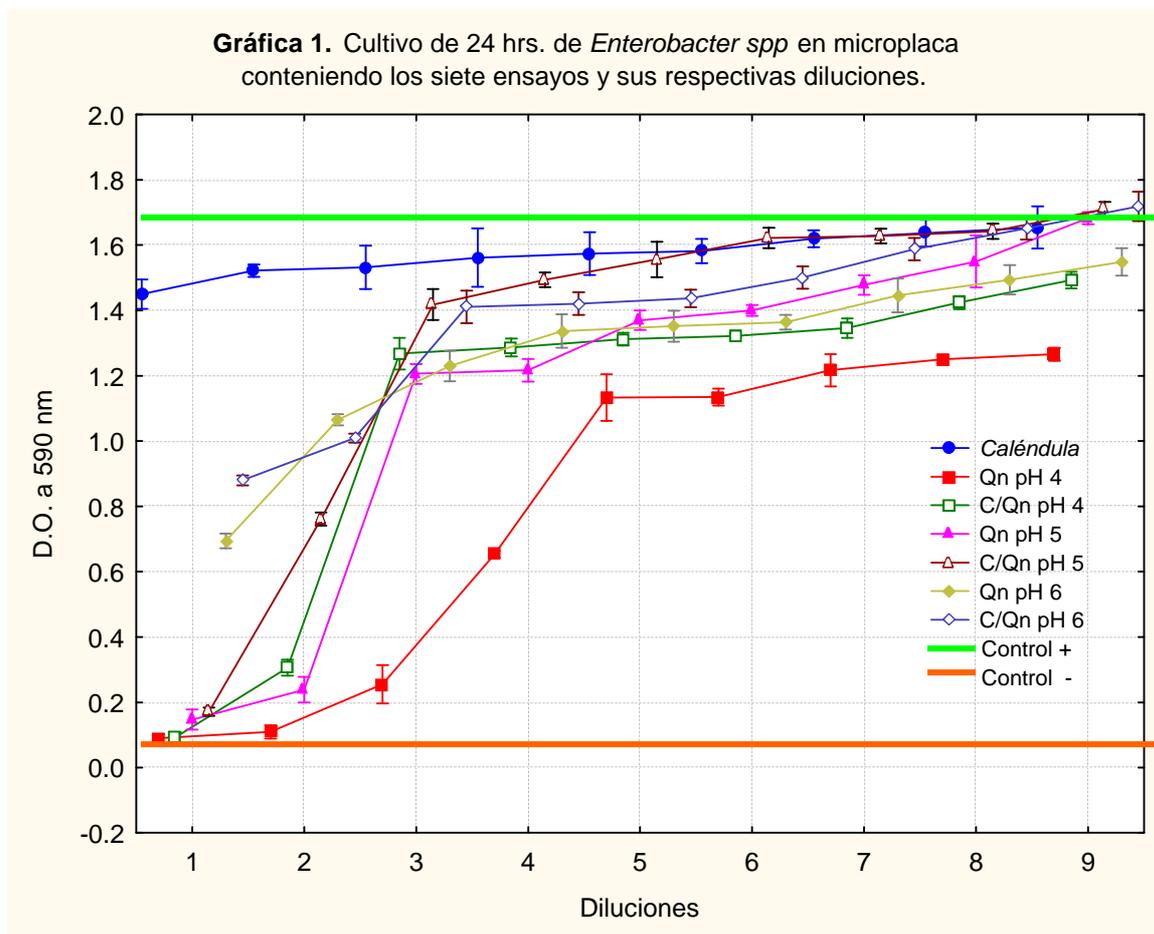
BDA = Presenta efecto bactericida a 24 horas de incubación.

En la expresión de los resultados, gráficas y tablas siguientes se hará referencia a *Caléndula officinalis* en las mezclas utilizadas como C/, y al Quitosán como Qn.

Tabla 8. Concentraciones utilizadas de las diluciones empleadas.

dil.	Caléndula [µg/mL]	Qn pH 4 [µg/mL]	Qn pH 5 [µg/mL]	Qn pH 6 [µg/mL]
1	8000	10000	10000	10000
2	4000	5000	5000	5000
3	2000	2500	2500	2500
4	1000	1250	1250	1250
5	500	625	625	625
6	250	312.5	312.5	312.5
7	125	156.2	156.2	156.2
8	62.5	78.12	78.12	78.12
9	31.25	39.06	39.06	39.06

6.1.1 *Enterobacter spp.*



Control +	1.717
Control -	0.089

Tabla 9. Comparación de *Caléndula*, Quitosán y la mezcla, con *Enterobacter spp* para determinar si $p < 0.05$ y conocer si existen diferencias significativas.

Ensayo	" p "
Qn pH 4 - C/Qn pH 4	0.000290
Caléndula - C/Qn pH 4	0.000206

En función de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias obtenidas en la experimentación (Tabla 8) tenemos que el ensayo más eficaz es el Qn pH 4 CMI a 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, después la mezcla C/Qn pH 4 CMI a 500/10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y por último el Qn pH 5 CMI a 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tomando en cuenta los ensayos que presentaron efecto bactericida (Ver anexo II tabla 17).

El efecto bactericida se observó al tener ausencia de crecimiento en las placas con agar BHI que se sembraron, a las 24 horas de incubación

Fig. 8. Isoblograma de Caléndula/Quitósán pH 4 para *Enterobacter spp.*

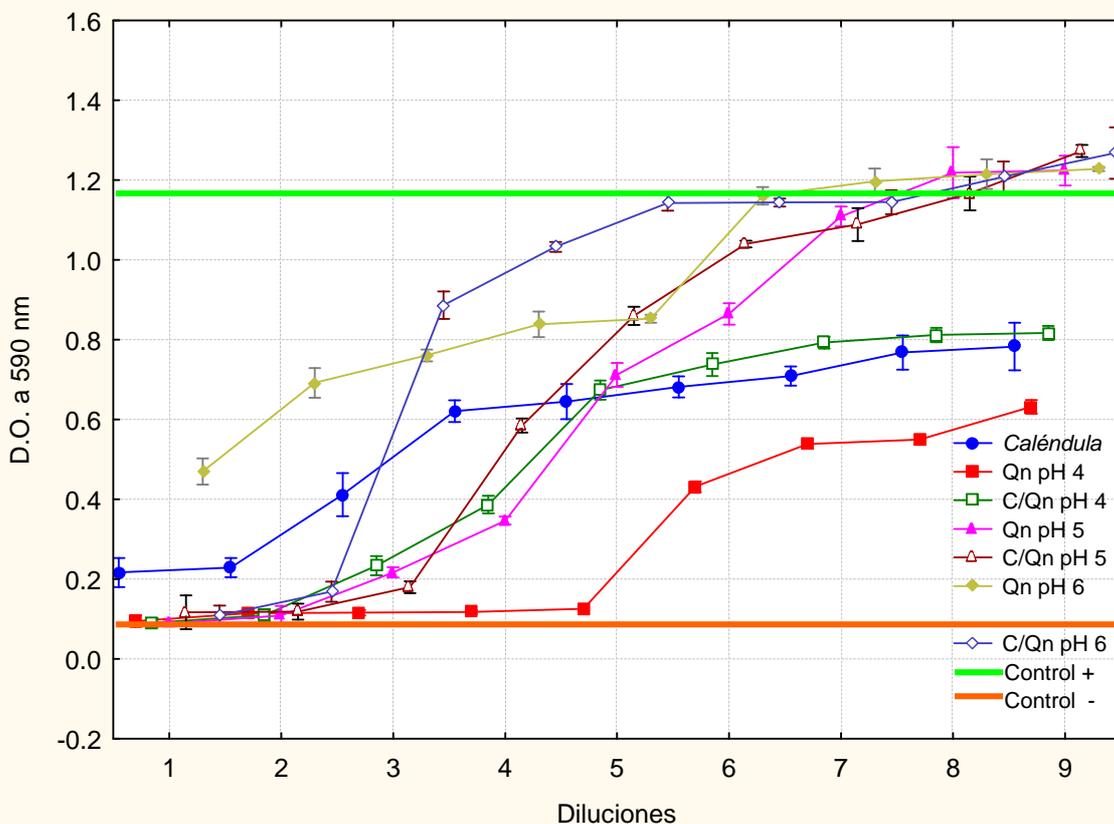
4000						
2000						
1000						
500						
250						
0						
	0	625	1250	2500	5000	10000

Fig. 9. Isoblograma de Caléndula/Quitósán pH 5 para *Enterobacter spp.*

4000						
2000						
1000						
500						
250						
0						
	0	625	1250	2500	5000	10000

6.1.2 *Escherichia coli*.

Gráfica 2. Cultivo de 24 hrs. de *Escherichia coli* en microplaca conteniendo los siete ensayos y sus respectivas diluciones.



Control +	1.184
Control -	0.089

Tabla 10. Comparación de *Caléndula*, Quitosán y la mezcla, con *Escherichia coli* para determinar si $p < 0.05$ y conocer si existen diferencias significativas.

Ensayo	" p "
Qn pH 4 - C/Qn pH 4	0.000220
Caléndula - C/Qn pH 4	0.000238
Qn pH 5 - C/Qn pH 5	0.394541
Caléndula - C/Qn pH 5	0.000094
Qn pH 6 - C/Qn pH 6	0.000352
Caléndula - C/Qn pH 6	0.000290

En función de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias obtenidas en la experimentación (Tabla 8) tenemos que el ensayo más eficaz es el Qn pH 4 CMI a 625 µg/mL, después la mezcla C/Qn pH 5 CMI a 125/2500 µg/mL, seguida de Qn pH 5 CMI a 2500 µg/mL, después la mezcla C/Qn pH 4 a 125/2500 µg/mL, y por último Qn pH 6 a 5000 µg/mL y la mezcla C/Qn pH 6 a 250/5000 µg/mL tomando en cuenta los ensayos que presentaron efecto bactericida (Ver anexo II tabla 18).

El efecto bactericida se observó al tener ausencia de crecimiento en las placas con agar BHI que se sembraron, a las 24 horas de incubación.

Fig. 10. Isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 4 para *Escherichia coli*.

4000						
2000						
1000						
500						
250						
0						
	0	156.2	312.5	625	1250	2500

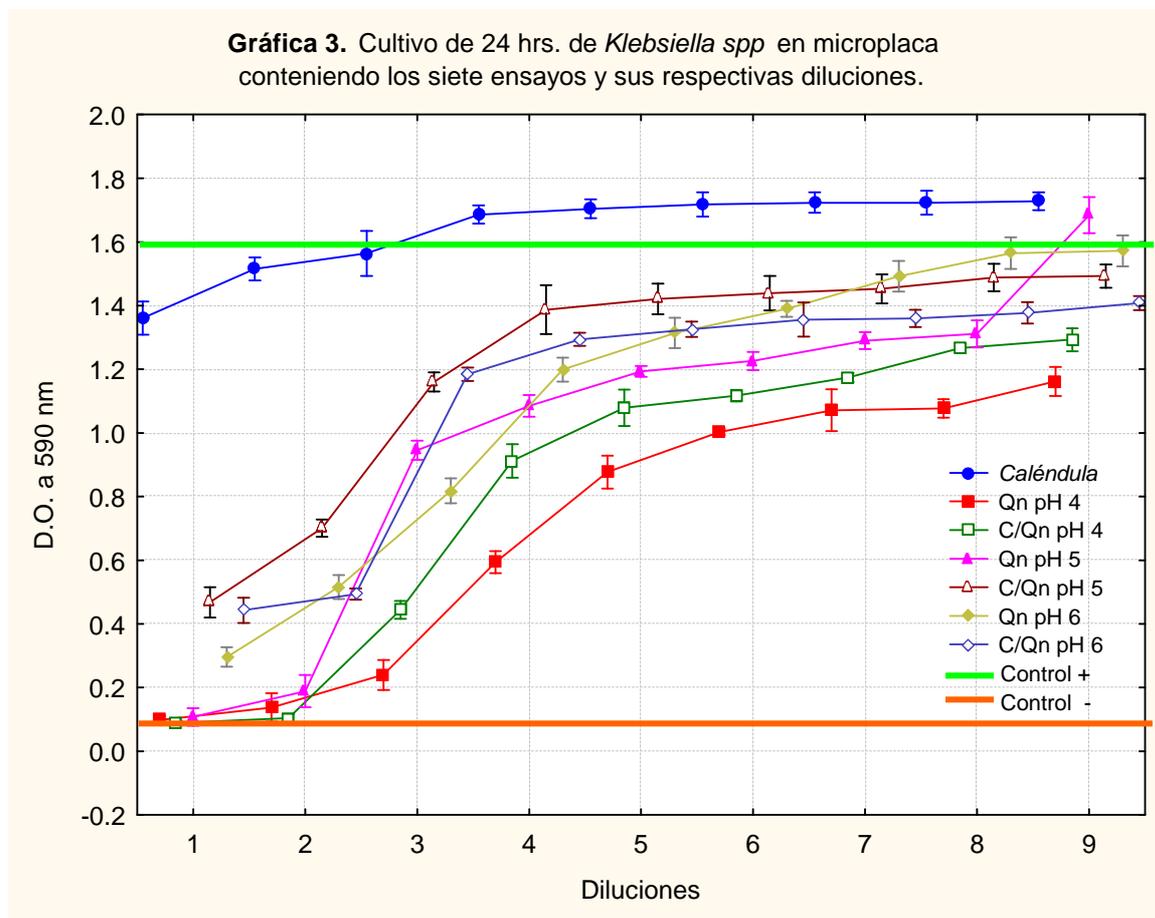
Fig. 11. Isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 5 para *Escherichia coli*.

4000						
2000						
1000						
500						
250						
0						
	0	625	1250	2500	5000	10000

Fig. 12. Isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 6 para *Escherichia coli*.

4000						
2000						
1000						
500						
250						
0						
	0	625	1250	2500	5000	10000

6.1.3 *Klebsiella spp.*



Control +	1.606
Control -	0.089

Tabla 11. Comparación de *Caléndula*, Quitosán y la mezcla, con *Klebsiella spp* para determinar si $p < 0.05$ y conocer si existen diferencias significativas.

Ensayo	" p "
Qn pH 4 - C/Qn pH 4	0.005930
Caléndula - C/Qn pH 4	0.000035

En función de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias obtenidas en la experimentación (Tabla 8) tenemos que el ensayo más eficaz es la mezcla C/Qn pH 4 CMI a 250/5000 $\mu\text{g/mL}$, el Qn pH 4 CMI a 5000 $\mu\text{g/mL}$, el Qn pH 5 CMI a 5000 $\mu\text{g/mL}$, tomando en cuenta los ensayos que presentaron efecto bactericida (Ver anexo II tabla 19)

El efecto bactericida se observó al tener ausencia de crecimiento en las placas con agar BHI que se sembraron, a las 24 horas de incubación.

Fig. 13. Isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 4 para *Klebsiella spp.*

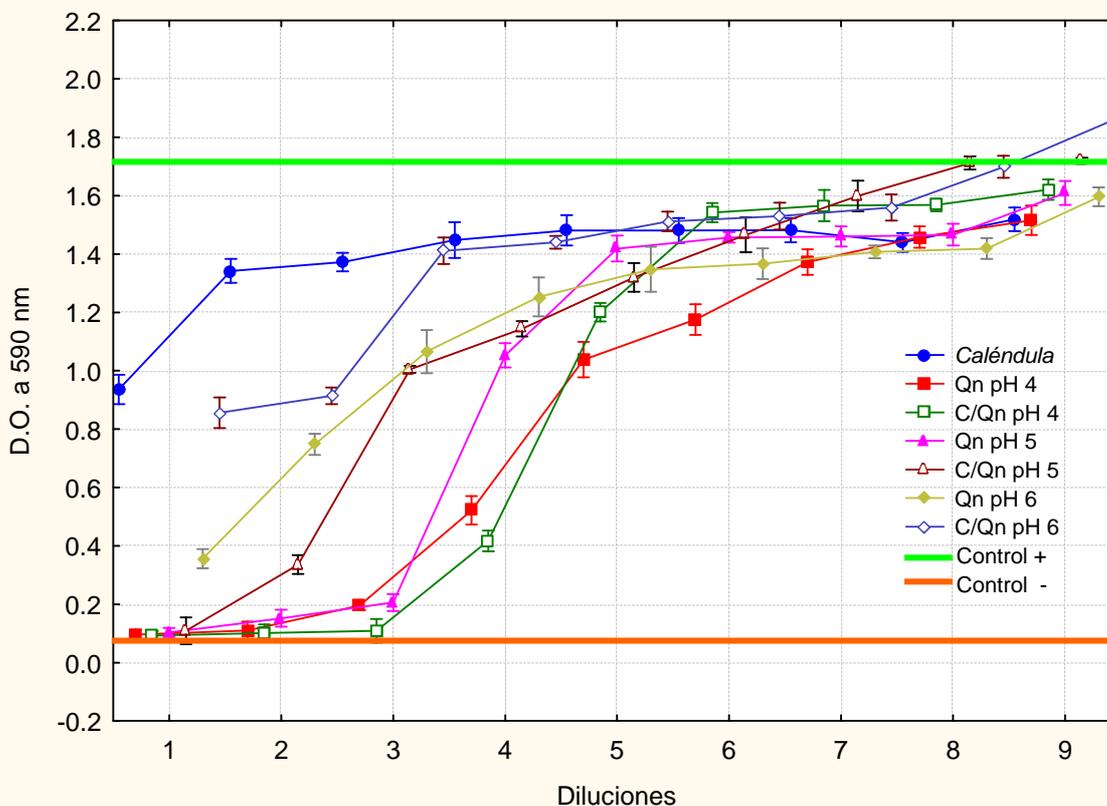
4000						
2000						
1000						
500						
250						
0						
	0	625	1250	2500	5000	10000

Fig. 14. Isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 5 para *Klebsiella spp.*

4000						
2000						
1000						
500						
250						
0						
	0	625	1250	2500	5000	10000

6.1.4 *Proteus spp.*

Gráfica 4. Cultivo de 24 hrs. de *Proteus spp* en microplaca conteniendo los siete ensayos y sus respectivas diluciones.



Control +	1.735
Control -	0.089

Tabla 12. Comparación de *Caléndula*, Quitosán y la mezcla, con *Proteus spp* para determinar si $p < 0.05$ y conocer si existen diferencias significativas.

Ensayo	" p "
Qn pH 4 - C/Qn pH 4	0.000471
Caléndula - C/Qn pH 4	0.000020
Qn pH 5 - C/Qn pH 5	0.006539
Caléndula - C/Qn pH 5	0.000192

En función de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias obtenidas en la experimentación (Tabla 8) tenemos que el ensayo más eficaz es la mezcla C/Qn pH 4 CMI a 125/2500 µg/mL, después el Qn pH 4 CMI a 2500 µg/mL, seguido de la mezcla C/Qn pH 5 CMI a 125/2500 µg/mL y por último C/Qn pH 5 CMI a 500/10000 µg/mL, tomando en cuenta los ensayos que presentaron efecto bactericida (Ver anexo II tabla 20).

El efecto bactericida se observó al tener ausencia de crecimiento en las placas con agar BHI que se sembraron, a las 24 horas de incubación.

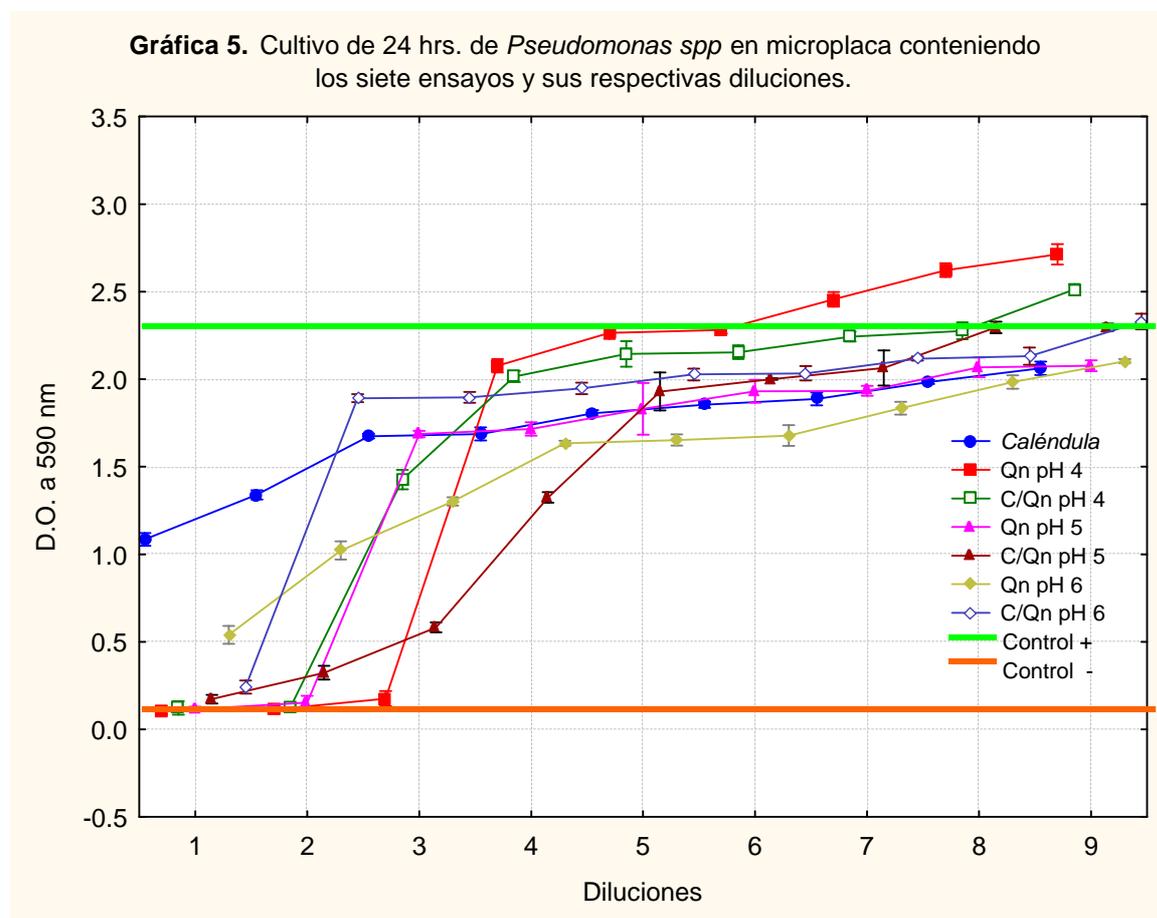
Fig. 15. Isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 4 para *Proteus spp.*

4000						
2000						
1000						
500						
250						
0						
	0	625	1250	2500	5000	10000

Fig. 16. Isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 5 para *Proteus spp.*

4000						
2000						
1000						
500						
250						
0						
	0	625	1250	2500	5000	10000

6.1.5 *Pseudomonas spp.*



Control +	2.421
Control -	0.089

Tabla 13. Comparación de *Caléndula*, Quitosán y la mezcla, con *Pseudomonas spp* para determinar si $p < 0.05$ y conocer si existen diferencias significativas.

Ensayo	" p "
Qn pH 4 - C/Qn pH 4	0.000085
Caléndula - C/Qn pH 4	0.000045
Qn pH 5 - C/Qn pH 5	0.000008
Caléndula - C/Qn pH 5	0.000060

En función de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias obtenidas en la experimentación (Tabla 8) tenemos que el ensayo más eficaz es el Qn pH 4 CMI a 2500 µg/mL, después la mezcla C/Qn pH 4 CMI a 250/5000 µg/mL junto con Qn pH 5 a 2500 µg/mL y por último la mezcla C/Qn pH 5 CMI a 500/10000 µg/mL, tomando en cuenta los ensayos que presentaron efecto bactericida (Ver anexo II tabla 21).

El efecto bactericida se observó al tener ausencia de crecimiento en las placas con agar BHI que se sembraron, a las 24 horas de incubación.

Fig. 17. Isoblograma de Caléndula/Quitósán pH 4 para *Pseudomonas spp.*

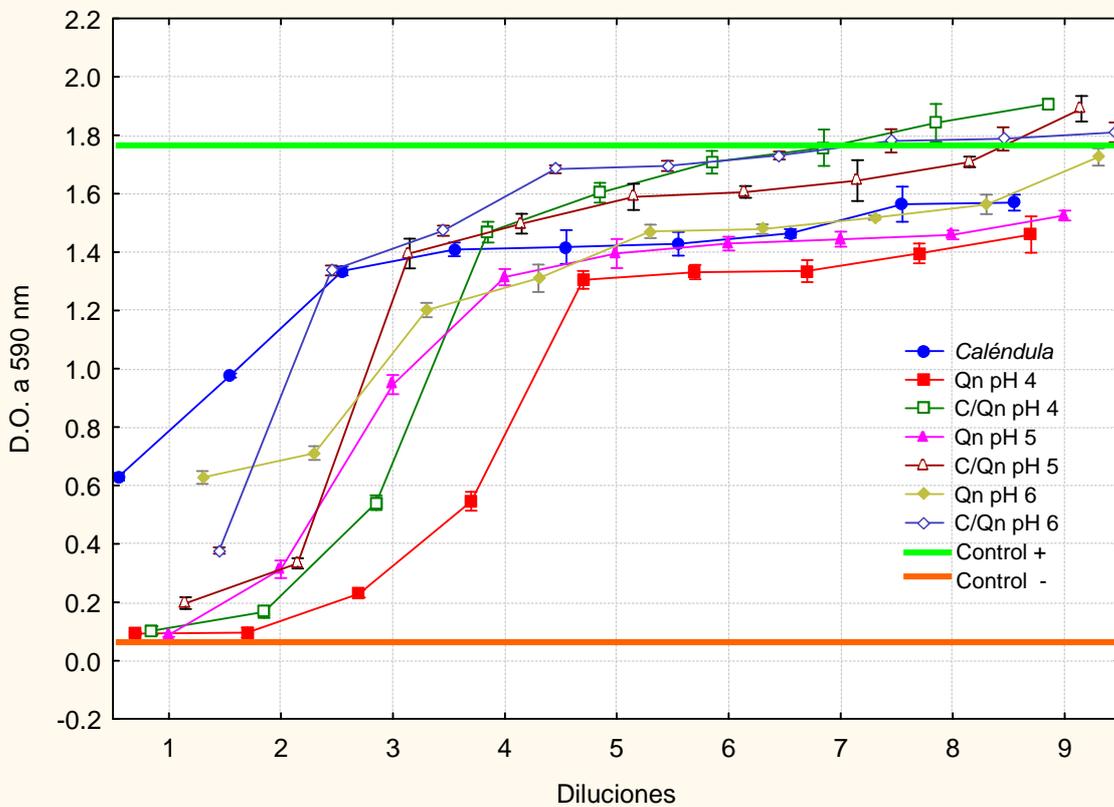
4000						
2000						
1000						
500						
250						
0						
	0	625	1250	2500	5000	10000

Fig. 18. Isoblograma de Caléndula/Quitósán pH 5 para *Pseudomonas spp.*

4000						
2000						
1000						
500						
250						
0						
	0	625	1250	2500	5000	10000

6.1.6 *Salmonella* spp.

Gráfica 6. Cultivo de 24 hrs. de *Salmonella* spp en microplaca conteniendo los siete diferentes ensayos y sus respectivas diluciones.



Control +	1.784
Control -	0.089

Tabla 14. Comparación de *Caléndula*, Quitosán y la mezcla, con *Salmonella* spp para determinar si $p < 0.05$ y conocer si existen diferencias significativas.

Ensayo	“ p “
Qn pH 4 - C/Qn pH 4	0.001534
Caléndula - C/Qn pH 4	0.000110
Qn pH 5 - C/Qn pH 5	0.000786
Caléndula - C/Qn pH 5	0.000243

En función de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias obtenidas en la experimentación (Tabla 8) tenemos que el ensayo más eficaz es el Qn pH 4 CMI a 2500 µg/mL, después la mezcla C/Qn pH 4 CMI a 250/5000 µg/mL, y por último Qn pH 5 CMI a 10000 µg/mL, y la mezcla C/Qn pH 5 CMI a 500/10000 µg/mL tomando en cuenta los ensayos que presentaron efecto bactericida (Ver anexo II tabla 22). El efecto bactericida se observó al tener ausencia de crecimiento en las placas con agar BHI que se sembraron, a las 24 horas de incubación.

El efecto bactericida se observó al tener ausencia de crecimiento en las placas con agar BHI que se sembraron, a las 24 horas de incubación.

Fig. 19. Isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 4 para *Salmonella spp.*

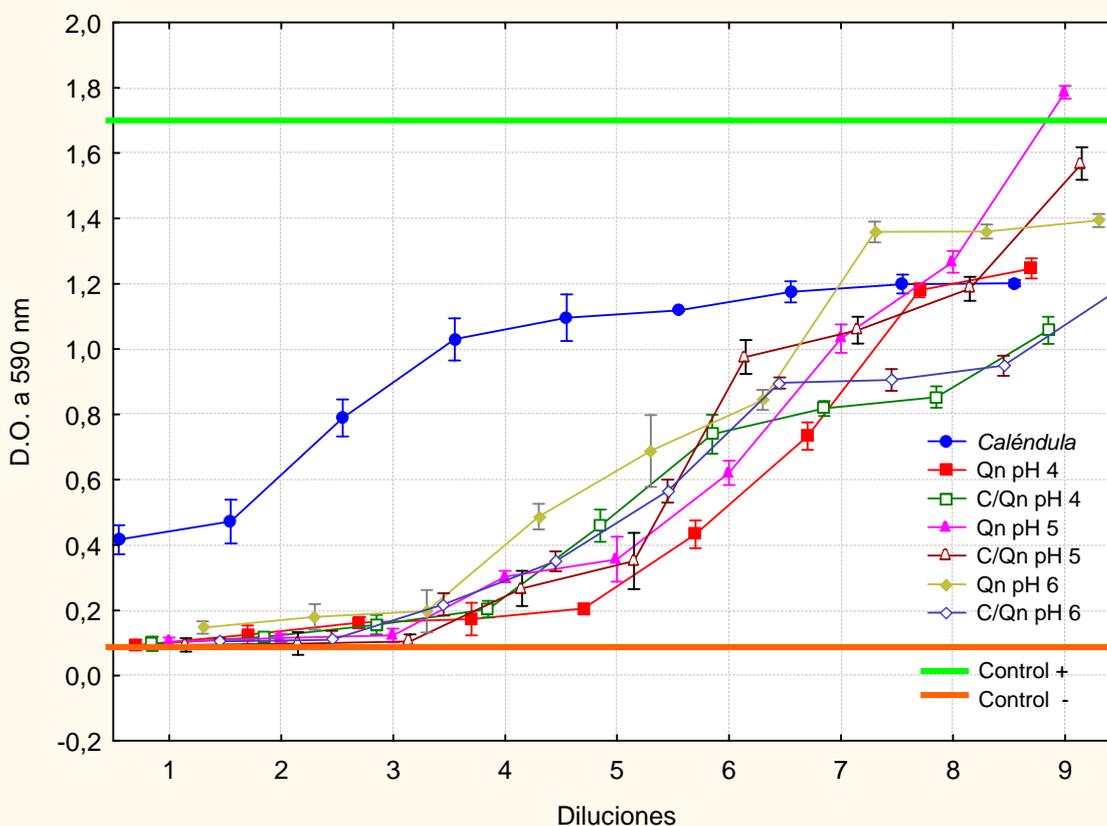
4000						
2000						
1000						
500						
250						
0						
	0	625	1250	2500	5000	10000

Fig. 20. Isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 5 para *Salmonella spp.*

4000						
2000						
1000						
500						
250						
0						
	0	625	1250	2500	5000	10000

6.17 *Staphylococcus aureus*.

Gráfica 7. Cultivo de 24 hrs. de *Staphylococcus aureus* en microplaca conteniendo los siete ensayos y sus respectivas diluciones.



Control +	1.664
Control -	0.089

Tabla 15. Comparación de *Caléndula*, Qitosán y la mezcla, con *Staphylococcus aureus* para determinar si $p < 0.05$ y conocer si existen diferencias significativas.

Ensayo	" p "
Qn pH 4 - C/Qn pH 4	0.000146
Caléndula - C/Qn pH 4	0.001919
Qn pH 5 - C/Qn pH 5	0.017019
Caléndula - C/Qn pH 5	0.000209
Qn pH 6 - C/Qn pH 6	0.000315
Caléndula - C/Qn pH 6	0.000398

En función de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias obtenidas en la experimentación (Tabla 8) tenemos que el ensayo más eficaz es el Qn pH 4 CMI a 625 µg/mL, después la mezcla C/Qn pH 4 CMI a 62.5/1250 µg/mL, la mezcla C/Qn pH 5 CMI a 62.5/1250 µg/mL, el Qn pH 5 CMI a 1250 µg/mL, seguidos por mezcla C/Qn pH 6 CMI a 125/2500 µg/mL, y por último el Qn pH 6 CMI a 2500 µg/mL tomando en cuenta los ensayos que presentaron efecto bactericida (Ver anexo II tabla 23).

El efecto bactericida se observó al tener ausencia de crecimiento en las placas con agar BHI que se sembraron, a las 24 horas de incubación.

Fig. 21. Isoblograma de Caléndula/Quitósán pH 4 para *Staphylococcus aureus*.

4000						
2000						
1000						
500						
250						
0						
	0	156.2	312.5	625	1250	2500

Fig. 22. Isoblograma de Caléndula/Quitósán pH 5 para *Staphylococcus aureus*.

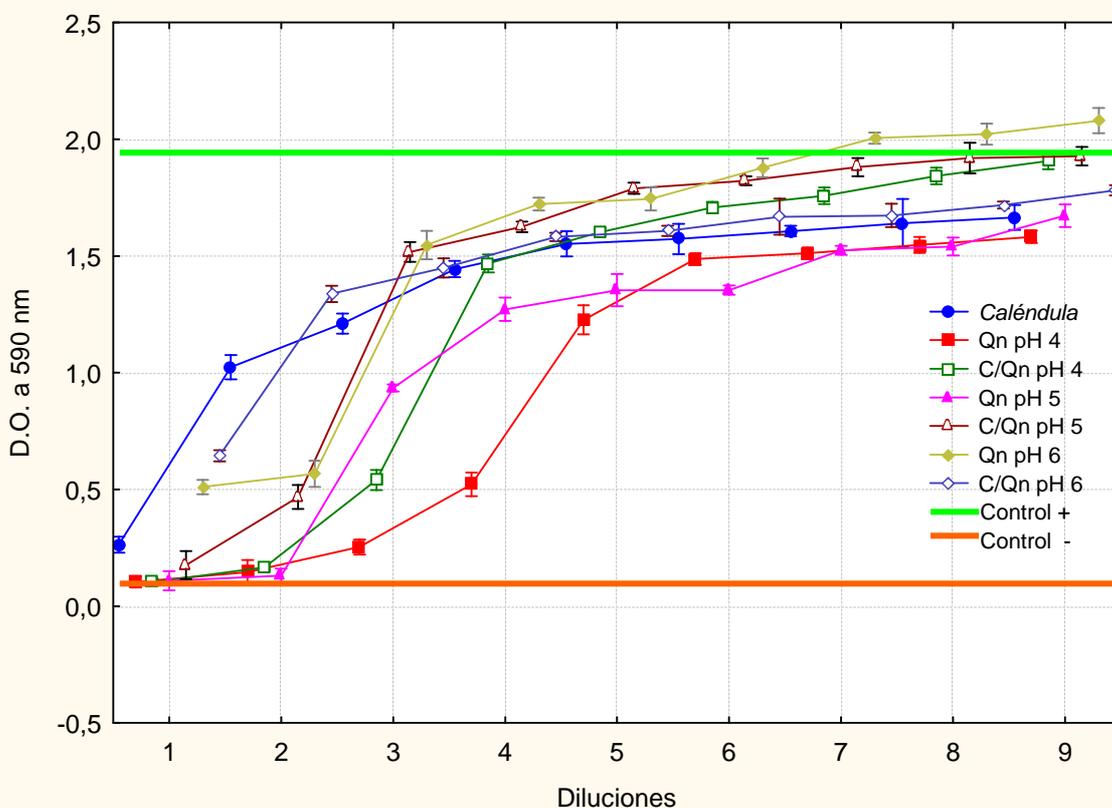
4000						
2000						
1000						
500						
250						
0						
	0	312.5	625	1250	2500	5000

Fig. 23. Isoblograma de Caléndula/Quitósán pH 6 para *Staphylococcus aureus*.

4000						
2000						
1000						
500						
250						
0						
	0	625	1250	2500	5000	10000

6.18 *Streptococcus pyogenes*.

Gráfica 8. Cultivo de 24 hrs. de *Streptococcus pyogenes* en microplaca conteniendo los siete ensayos y sus respectivas diluciones.



Control +	1.903
Control -	0.089

Tabla 16. Comparación de *Caléndula*, Quitosán y la mezcla, con *Streptococcus pyogenes* para determinar si $p < 0.05$ y conocer si existen diferencias significativas.

Ensayo	" p "
Qn pH 4 - C/Qn pH 4	0.003796
Caléndula - C/Qn pH 4	0.001228
Qn pH 5 - C/Qn pH 5	0.003578
Caléndula - C/Qn pH 5	0.000944

En función de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias obtenidas en la experimentación (Tabla 8) tenemos que el ensayo más eficaz es el Qn pH 5 CMI a 5000 µg/mL, seguido de Qn pH 4 CMI a 5000 µg/mL, después la mezcla C/Qn pH 4 CMI a 250/5000 µg/mL, y por último la mezcla C/Qn pH 5 CMI a 500/10000 µg/mL, tomando en cuenta los ensayos que presentaron efecto bactericida (Ver anexo II tabla 24).

El efecto bactericida se observó al tener ausencia de crecimiento en las placas con agar BHI que se sembraron, a las 24 horas de incubación.

Fig. 24. Isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 4 para *Streptococcus pyogenes*.

4000						
2000						
1000						
500						
250						
0						
	0	625	1250	2500	5000	10000

Fig. 25. Isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 5 para *Streptococcus pyogenes*.

4000						
2000						
1000						
500						
250						
0						
	0	625	1250	2500	5000	10000

VII DISCUSIÓN.

Este trabajo tiene la finalidad de evidenciar la actividad antibacteriana del Quitosán y *Caléndula officinalis* juntos, y conocer por medio la construcción de isoblogramas si se presenta sinergia o antagonismo. Así mismo se obtuvo la CMI tanto de *Caléndula* como del Quitosán a los tres diferentes pH para cada bacteria y el efecto bactericida o bacteriostático de la mismas.

Los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados presentados en las tablas que muestran las D.O. obtenidas para los ensayos de cada bacteria son medias. La CMI obtenida para *Caléndula* y Quitosán a los tres pH's, se presenta en las primeras diluciones (Anexo II).

En un estudio realizado entre septiembre de 1999 y enero del 2002 en la ciudad de Chihuahua se encontró que entre las causalidades de dichas infecciones destacan las cirugías ya que los pacientes quirúrgicos tienen el doble de riesgo de infecciones por gérmenes resistentes, también la instalación de prótesis e injertos, trasplantes, administración de antibióticos y corticoterapia distorsionan la microflora endógena del paciente y favorecen la colonización y finalmente la infección con gérmenes multi resistentes ⁽⁴⁰⁾. En 1996 en un estudio realizado para conocer la incidencia tasas específicas áreas de mayor riesgo y los agentes causales de Infecciones nosocomiales (Tabla 1). En el Hospital general de Durango se reportó que la infección de vías urinarias, la neumonía y la infección de herida quirúrgica constituyen más del 80 % de infecciones nosocomiales que se presentaron en los servicios de adultos y que en cirugía fueron responsables del 97 % de los eventos ⁽⁴¹⁾.

En 2005 Pezet, Moctezuma, García y Hernández, reportan que en terapéutica homeopática se ha demostrado que los activos de *Caléndula officinalis* tienen efecto bactericida en estudios preliminares con diversos microorganismos, y comprobaron inhibición a diluciones de 1/1 y 1/3 ⁽³⁹⁾.

Se tomo como CMI de *Caléndula* para todas las bacterias 1000 µg / mL

Enterobacter spp.

En la gráfica 1 se presenta el ensayo con Qn pH 4 las D.O. son muy bajas en las primeras tres concentraciones y hay efecto bactericida en éstas mismas, C/Qn pH 4 sólo en la primera y Qn pH 5 en las dos primeras diluciones (Ver anexo II en la tabla 17), dando coloración amarilla en los pozos de la microplaca; A simple vista notamos que de los ensayos realizados a *Enterobacter spp* el más efectivo fue el Qn pH 4 solo. Esto lo podemos corroborar en la tabla 9 que nos muestra el estudio estadístico de las D.O. obtenidas para *Enterobacter spp*, en el que las diferencias significativas de las combinaciones presentadas "p" es menor de 0.05 en ambas comparaciones lo que indica que los ensayos se comportan diferente. No se realizó la obtención de "p" para el Qn pH 5 aunque presentó efecto bactericida ya que el objetivo del presente trabajo es comprobar si existe sinergismo o antagonismo en la mezcla de los dos componentes de estudio, y al no encontrar efecto bactericida en la mezcla C/Qn pH 5 no hay con quien realizar la comparación.

Caléndula se mantiene por debajo del control positivo lo que nos indica que no tuvo un efecto satisfactorio en el estudio, esto debido a que la concentración empleada en este estudio no arrojó los mismos resultados que los previamente reportados. Obsérvese en la gráfica 1 que casi todas las diluciones de los siete ensayos tienen tendencia a estar dentro del intervalo establecido por el control positivo y el control negativo.

En 1999 García Alvarado ⁽³³⁾ comprobó la actividad antibacteriana del Quitosán. Probando que también tiene actividad antibacteriana en bacterias Gram negativas como *Enterobacter* a 0.5 % de concentración = 5,000 µg/mL, y nosotros reportamos actividad antibacteriana a 0.25 % de concentración = 2,500 µg/mL a pH 4 y la mezcla solo tuvo actividad en la solución concentrada. Lo que nos habla de una influencia notoria en el pH del Quitosán.

La CMI resultante del ensayo de quitosán pH 4 fue 2500 µg / mL, para quitosán pH 5 fue de 5000 µg / mL. El quitosán pH 6 no mostró actividad bactericida.

Obsérvese en el isoblograma para *Caléndula*/quitosán pH 4 que hay crecimiento bacteriano en la primer columna donde no hay Quitosán. En las columnas dos y tres no hay crecimiento, lo que nos dice que el quitosán inhibe a la bacteria reflejado en la primera fila donde no hay *Caléndula*. Se observa con claridad el ausentismo de crecimiento en las siguientes filas y columnas, lo que sugiere un sinergismo, pero por los resultados obtenidos en *Caléndula* [0]/Quitosán pH 4 [625], y *Caléndula* [0]/Quitosán pH 4 [1250] no podemos hacer ésta afirmación. Lo mismo sucede en el caso del isoblograma para *Caléndula*/Quitosán pH 5 ya que en la primera fila *Caléndula* [0]/Quitosán pH 5 en todas las concentraciones no hay crecimiento, no obstante se observa claramente que la *Caléndula* inhibe al quitosán.

Escherichia coli:

En la gráfica 2 obtuvimos que en el ensayo con Qn pH 4 las D.O. son bajas en las primeras cinco diluciones, C/Qn pH 4, Qn pH 5 y C/Qn pH 5 las D.O. son bajas en las primeras tres concentraciones y hay efecto bactericida en éstas mismas (Ver anexo II tabla 18), y en Qn pH 6 y C/Qn pH 6 las dos primeras concentraciones tienen el mismo comportamiento dando coloración amarilla en los pozos de la microplaca. De la tabla 10 tenemos que el estudio estadístico de las D.O. obtenidas para *Escherichia coli*, nos dice que de las combinaciones de ensayos en los cuales se presentó efecto bactericida las diferencias son significativas encontrando que los valores de “p” son menores de 0.05 por lo que los ensayos se comportan diferente sólo en el caso de la comparación de Qn pH 5 y C/Qn pH 5 se presenta un valor de “p” mayor a 0.05 lo que nos indica que los ensayos se comportan similares.

Caléndula se mantiene en un nivel intermedio presentando absorbancias bajas en las primeras tres diluciones pero no tiene efecto bactericida debido a que la concentración empleada no fue la adecuada para el estudio, lo que probablemente inhibe el efecto antimicrobiano del Quitosán.

Nótese en la gráfica 2 que los siete ensayos tuvieron tendencia a estar dentro del intervalo establecido por el control positivo y el control negativo.

El Qn pH 4 solo actúa mejor que cualquiera de los extractos y de las mezclas.

Entsar I. Rabea, † Mohamed E.-T. Badawy, † Christian V. Stevens, *, ‡ Guy Smaghe, † and Walter Steurbaut † en 2003 reportan que el Qn a concentraciones del 0.005 % = 50 µg/mL tiene efecto bactericida para *Escherichia coli* y completa inhibición al 0.0075 % = 75 µg/mL ⁽³⁸⁾. Xiao Fei Liu, Yun Lin Guan, Dong Zhi Yang, Zhi Li, Kang De Yao en el 2001 reportaron una CMI de 20 ppm es decir 20 µg/mL para *Escherichia coli* (si se tratara de Qn al pH, grado de desacetilación, PM y las unidades empleadas igual a las de este estudio) ⁽³⁷⁾.

En 1999 García Alvarado ⁽³³⁾ comprobó la actividad antibacteriana del Quitosán. Probando que también tiene actividad antibacteriana en bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, a 0.5 % de concentración = 5,000 µg/mL. Nosotros reportamos que la mezcla de C/Qn pH 6 se comporta igual que en el estudio de García Alvarado, mientras que las mezclas C/Qn pH 4, C/Qn pH 5 tuvieron actividad satisfactoria a 0.25 % de concentración = 2,500 µg/mL, y el Qn pH 4 0.0625 % de concentración = 625 µg/mL. Lo que nos reafirma la importancia del pH del Quitosán.

Lo que nos sugiere que en nuestro trabajo el Quitosán no está ejerciendo su actividad antimicrobiana.

La CMI resultante del ensayo de quitosán pH 4 fue 625 µg / mL, para quitosán pH 5 fue de 2500 µg / mL y para quitosán pH 6 fue de 5000 µg / mL.

En la interpretación del isoblograma con pH 4 notamos que hay crecimiento bacteriano en la primer y segunda columnas. Se observa con claridad el ausentismo de crecimiento en las últimas dos columnas, lo que sugiere un sinergismo, pero por los resultados obtenidos en *Caléndula* [0]/Quitosán pH 4 [312.5], y *Caléndula* [0]/Quitosán pH 4 [625] no podemos hacer ésta afirmación. Lo mismo sucede en el caso del isoblograma para *Caléndula*/Quitosán pH 5 ya que en la primera fila a partir de la concentración de quitosán de 625 µg/mL *Caléndula* [0]/Quitosán pH 5 en todas las concentraciones no hay crecimiento. Y en el isoblograma con quitosán pH 6 se podría sugerir un antagonismo pero debido a que también se muestra ausencia de crecimiento en las concentraciones del quitosán solo no se acepta esta opción.

Klebsiella spp:

Reportamos en la gráfica 3 que en el ensayo con Qn pH 4, las D.O. son muy bajas en las primeras dos concentraciones y hay efecto bactericida en éstas mismas, C/Qn pH 4 igual y Qn pH 5 en las primeras dos primeras concentraciones, dando coloración amarilla en los pozos de la microplaca. Las D.O. de todos los ensayos a las diferentes diluciones se muestran en anexo II tabla 19. De la tabla 11 tenemos que el estudio estadístico de las D.O. obtenidas para *Klebsiella spp*, nos dice que de las combinaciones de ensayos en los cuales se presentó efecto bactericida las diferencias son significativas encontrando que los valores de “p” son menores de 0.05 por lo que los ensayos se comportan diferente.

No se realizó la obtención de “p” para el Qn pH 5 aunque presentó efecto bactericida ya que el objetivo del presente trabajo es comprobar si existe sinergismo o antagonismo en la mezcla de los dos componentes de estudio, y al no encontrar efecto bactericida en la mezcla C/Qn pH 5 no hay con quien realizar la comparación.

Nótese en la gráfica 3 que los ensayos tuvieron tendencia a estar dentro del rango establecido por el control positivo y el control negativo excepto el ensayo con *Caléndula* que a partir de la cuarta dilución está por encima del valor del control positivo, lo que sugiere que la concentración utilizada no es la correcta, además de que sirve de nutriente para la bacteria esto debido a que dentro de las moléculas que componen el extracto se encuentren moléculas de carbono que la bacteria utiliza para su metabolismo.

El Qn pH 4 solo actúa mejor que cualquiera de los extractos y de las mezclas.

Xiao Fei Liu, Yun Lin Guan, Dong Zhi Yang, Zhi Li, Kang De Yao en el 2001 reportaron una CMI de 700 ppm es decir 700 µg/mL para *Klebsiella pneumoniae* (si se tratara de Qn al pH, grado de desacetilación, PM y las unidades empleadas igual a las de este estudio)⁽³⁷⁻³⁸⁾.

En nuestro estudio se obtuvo efecto bactericida hasta la segunda dilución con concentración de 5000 µg/ml, por lo que en éste caso se presentó una disminución de la actividad antibacteriana del quitosán, probablemente por acción de *Caléndula*.

La CMI resultante del ensayo de quitosán pH 4 fue 5000 µg / mL, para quitosán pH 5 fue de 5000 µg / mL. El quitosán pH 6 no mostró actividad bactericida.

Obsérvese en el isoblograma para *Caléndula*/quitosán pH 4 que hay crecimiento bacteriano en la primer y segunda columnas nada más lo que nos muestra sinergismo ya que no se reporta crecimiento en las demás columnas, pero por los resultados obtenidos en *Caléndula* [0]/Quitosán pH 4 [1250], hasta y *Caléndula* [0]/Quitosán pH 4 [10000] no podemos hacer ésta afirmación. Lo mismo sucede en el caso del isoblograma para *Caléndula*/Quitosán pH 5 ya que en la primera fila *Caléndula* [0]/Quitosán pH 5 hay crecimiento a partir de *Caléndula* [0]/Quitosán pH 4 [625], no obstante se observa claramente que la *Caléndula* inhibe al quitosán.

Proteus spp:

Reportamos en la gráfica 4, *Proteus spp* a diferentes diluciones, presenta el menor crecimiento con la mezcla de C/Quitosán pH 4, seguida por Qn pH 4, Qn pH 5 y por último C/Qn pH 5. En las diluciones 1, 2 y 3 presenta el menor crecimiento tanto para los quitosanos a pH 4 y 5, como a la mezcla C/Qn pH 4, mientras que para C/Qn pH 5 la D.O. más baja es en la primera dilución dando coloración amarilla en los pozos de la microplaca. Las D.O. de todos los ensayos a las diferentes diluciones se muestran en el anexo II tabla 20.

De la tabla 13 que nos muestra el estudio estadístico de las D.O. obtenidas para *Proteus* tenemos las diferencias significativas de las combinaciones de ensayos en los cuales se presentó efecto bactericida, encontrando que los valores de “p” son menores de 0.05 demostrando que los ensayos se comportan diferentes.

Nótese en la gráfica 4 que los siete ensayos tuvieron tendencia a estar dentro del rango establecido por el control positivo y el control negativo.

Entrar I. Rabea, † Mohamed E.-T. Badawy, † Christian V. Stevens, *, ‡ Guy Smagghe, † and Walter Steurbaut† en 2003 reportan que el Qn a concentraciones del 0.005 % = 50 µg/mL tiene efecto bactericida para *Proteus spp* y completa inhibición al 0.0075 % = 75 µg/mL (si se tratara de Qn al pH, grado de desacetilación, PM y las unidades empleadas igual a las de este estudio) ⁽³⁸⁾.

La CMI resultante del ensayo de quitosán pH 4 fue 2500 µg / mL, para quitosán pH 5 fue de 2500 µg / mL. El quitosán pH 6 no mostró actividad bactericida.

En el isoblograma para *Caléndula*/quitosán pH 4 hay crecimiento bacteriano en la primer columna donde no hay quitosán, se nota un posible sinergismo que no se puede afirmar debido a los resultados obtenidos en *Caléndula* [0]/Quitosán pH 4 [625], hasta y *Caléndula* [0]/Quitosán pH 4 [10000]. Lo mismo sucede en el caso del isoblograma para *Caléndula*/Quitosán pH 5 ya que en la primera fila *Caléndula* [0]/Quitosán pH 5 hay crecimiento a partir de *Caléndula* [0]/Quitosán pH 4 [625], no obstante se observa claramente que la *Caléndula* inhibe al quitosán.

Pseudomonas spp:

Como puede observarse en la gráfica 5, *Pseudomonas spp* a diferentes diluciones, presenta el menor crecimiento con Qn a pH 4 seguido por, la mezcla de C/Qn pH 4 y después por Qn pH 5 y por último la mezcla de C/Qn pH 5. En las diluciones 1, 2 y 3 se presenta el menor crecimiento tanto para los quitosanos a pH 4 y 5, como a las mezclas C/Qn pH 4, y C/Qn pH 5, dando coloración amarilla en los pozos de la microplaca. Las D.O. de todos los ensayos a las diferentes diluciones se muestran en el anexo en la tabla 21.

Retomando la tabla 12 que nos muestra el estudio estadístico de las D.O. obtenidas para *Pseudomonas spp* tenemos las diferencias significativas de las combinaciones de ensayos en los cuales se presentó efecto bactericida, encontrando que los valores de “p” son menores de 0.05 lo que indica que ambos ensayos se comportan diferente.

Observamos que en la gráfica 5 que casi todas las diluciones de los siete ensayos tienen tendencia a estar en el rango dado por el control positivo y control negativo. Sin embargo notamos que en las últimas tres diluciones el ensayo con Qn pH 4 se eleva por encima del valor del control positivo, se resalta éste hecho debido a que dicho ensayo es el que presentó mejor actividad.

Xiao Fei Liu, Yun Lin Guan, Dong Zhi Yang, Zhi Li, Kang De Yao en el 2001 reportaron una CMI de 500 ppm es decir 500 µg/mL para *Pseudomonas fluorescens* (si se tratara de Qn al pH, grado de desacetilación, PM y las unidades empleadas igual a las de este estudio) ^(37 -38). En nuestro estudio se obtuvo efecto bactericida hasta la tercera dilución con concentración de 2500 µg/mL, por lo que en éste caso se presentó una disminución de la actividad antibacteriana del quitosán, probablemente por acción de *Caléndula*.

En el 2000 Morales Sánchez ⁽³⁵⁾ reporta que *Caléndula officinalis* tiene un efecto inhibitorio sobre *Pseudomonas aeruginosa* en la prueba cualitativa a partir de la dilución al 15 % del extracto a concentración de 540 µg/mL, y también ejerce efecto bactericida sobre la misma. Por lo que sugiere la alternativa del tratamiento con

Caléndula officinalis en heridas quirúrgicas o quemaduras infectadas con *Pseudomonas aeruginosa*. Lo que nos deja claro que en éste trabajo la concentración de *Caléndula* utilizada no es la adecuada (500 µg/mL en la solución concentrada), ya que a menor concentración se produce un efecto antagonista.

La CMI resultante del ensayo de quitosán pH 4 fue 2500 µg / mL, para quitosán pH 5 fue de 5000 µg / mL. El quitosán pH 6 no mostró actividad bactericida.

Notamos en el isoblograma para *Caléndula*/quitosán pH 4 que hay crecimiento bacteriano en la primer columna donde no hay quitosán, se nota un posible sinergismo que no se puede afirmar debido a los resultados obtenidos en *Caléndula* [0]/Quitosán pH 4 [625], hasta y *Caléndula* [0]/Quitosán pH 4 [10000]. Lo mismo sucede en el caso del isoblograma para *Caléndula*/Quitosán pH 5 ya que en la primera fila *Caléndula* [0]/Quitosán pH 5 hay crecimiento a partir de *Caléndula* [0]/Quitosán pH 4 [625], no obstante se observa claramente que la *Caléndula* inhibe al quitosán.

Salmonella spp:

En la gráfica 6 tenemos que en el ensayo con Qn pH 4, las D.O. son muy bajas en las primeras tres concentraciones y hay efecto bactericida en éstas mismas, C/Qn pH 4 sólo en la primera y Qn pH 5 en la primera concentración, dando coloración amarilla en los pozos de la microplaca. Las D.O. de todos los ensayos a las diferentes diluciones se muestran en el anexo II tabla 22.

Retomando la tabla 14 que nos muestra el estudio estadístico de las D.O. obtenidas para *Salmonella spp* tenemos las diferencias significativas de las combinaciones de ensayos en los cuales se presentó efecto bactericida, encontrando que los valores de "p" son menores de 0.05 por lo que los ensayos se comportan diferente.

Nótese en la gráfica 6 que los siete ensayos tuvieron tendencia a estar dentro del rango establecido por el control positivo y el control negativo.

En 1999 García Alvarado ⁽³³⁾ comprobó la actividad antibacteriana del Quitosán. Probando que también tiene actividad antibacteriana en bacterias Gram negativas como *Salmonella spp*, a 0.5 % de concentración = 5,000 µg/mL. Nosotros reportamos que el ensayo más eficaz fue Qn pH 4 a 0.25 % de concentración = 2,500 µg/mL, lo que destaca nuevamente la importancia del pH del Quitosán.

La CMI resultante del ensayo de quitosán pH 4 fue 2500 µg / mL, para quitosán pH 5 fue de 10000 µg / mL. El quitosán pH 6 no mostró actividad bactericida.

Reportamos en el isoblograma para *Caléndula*/quitosán pH 4 que hay crecimiento bacteriano en la primer columna donde no hay quitosán, se nota un posible sinergismo que no se puede afirmar debido a los resultados obtenidos en *Caléndula* [0]/Quitosán pH 4 [625], hasta y *Caléndula* [0]/Quitosán pH 4 [10000]. Lo mismo sucede en el caso del isoblograma para *Caléndula*/Quitosán pH 5 ya que en la primera fila *Caléndula* [0]/Quitosán pH 5 hay crecimiento a partir de *Caléndula* [0]/Quitosán pH 4 [625], no obstante se observa claramente que la *Caléndula* inhibe al quitosán.

Staphylococcus aureus:

En la gráfica 7 tenemos que en el ensayo con Qn pH 4 las D.O. son bajas hasta la tercera dilución, el valor es muy considerable ya que posteriormente las lecturas se disparan, encontrando que éste es el ensayo con mejor resultado para ésta bacteria dando coloración amarilla en los pozos de la microplaca. Las D.O. de todos los ensayos a las diferentes diluciones se muestran en anexo II tabla 23.

La tabla 15 nos muestra el estudio estadístico de las D.O. obtenidas para *Staphylococcus aureus* tenemos las diferencias significativas de las combinaciones de ensayos en los cuales se presentó efecto bactericida, encontrando que los valores de "p" son menores de 0.05 lo que indica que los ensayos se comportan diferente, sólo el valor de "p" en la comparación de Qn pH 5 y C/Qn pH 5 es elevado es decir que los ensayos se comportan similares

Observamos que en la gráfica 7 que los siete ensayos tuvieron tendencia a estar dentro del rango establecido por el control positivo y el control negativo.

Entrar I. Rabea, † Mohamed E.-T. Badawy, † Christian V. Stevens, *, ‡ Guy Smagghe, † and Walter Steurbaut† en 2003 reportan que el Qn a concentraciones del 0.005 % = 50 µg/mL tiene efecto bactericida para *Staphylococcus aureus* con Quitosán al 1% = 10,000 µg/mL y 1.5% = 15,000 µg/mL ⁽³⁸⁾. Xiao Fei Liu, Yun Lin Guan, Dong Zhi Yang, Zhi Li, Kang De Yao en el 2001 reportaron una CMI de 20 ppm es decir 20 µg/mL (si se tratara de Qn al pH, grado de desacetilación, PM y las unidades empleadas igual a las de este estudio) ⁽³⁷⁾.

En 1999 García Alvarado ⁽³³⁾ comprobó la actividad antibacteriana del Quitosán con diferentes cepas bacterianas, teniendo mejores resultados con bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* utilizando una concentración del 0.5 % = 5,000 µg/mL utilizando la técnica de Kirby-Bauer. En nuestro estudio reportamos que Qn pH 4 tuvo actividad satisfactoria hasta 0.0625 % de concentración = 625 µg/mL. Lo que nos reafirma la importancia del pH del Quitosán.

La CMI resultante del ensayo de quitosán pH 4 fue 625 µg / mL, para quitosán pH 5 fue de 1250 µg / mL y para quitosán pH 6 fue de 2500 µg / mL.

En la interpretación del isoblograma con pH 4 notamos que hay crecimiento bacteriano en la primer, segunda y tercer columnas. Se observa con claridad el ausentismo de crecimiento en las últimas dos columnas, lo que sugiere un sinergismo, pero por los resultados obtenidos en *Caléndula* [0]/Quitosán pH 4 [625], al *Caléndula* [0]/Quitosán pH 4 [2500] no podemos hacer ésta afirmación. Lo mismo sucede en el caso del isoblograma para *Caléndula*/Quitosán pH 5 ya que en la primera fila a partir de la concentración de quitosán de 625 µg/mL *Caléndula* [0]/Quitosán pH 5 en todas las concentraciones no hay crecimiento, aunque se observa que *Caléndula* inhibe al quitosán en las concentraciones [625] y [1250] del mismo. Y en el isoblograma con quitosán pH 6 se podría sugerir un antagonismo pero debido a que también se muestra ausencia de crecimiento en las concentraciones del quitosán solo no se acepta esta opción.

Streptococcus pyogenes.

Como puede observarse en la gráfica 8, *Streptococcus pyogenes.* a diferentes diluciones, presenta el menor crecimiento con Qn pH 5 seguido por Qn pH 4 y luego la mezcla C/Qn pH 4, y por último la mezcla C/Qn a pH 5. En las diluciones 1 y 2 se presenta el menor crecimiento tanto para los quitosanos a pH 4 y 5, como a las mezclas C/Qn pH 4 y C/Qn pH 5, dando color amarillo en los pozos de la microplaca. Las D.O. de todos los ensayos a las diferentes diluciones se muestran en el anexo II tabla 24.

De la tabla 16 que nos muestra el estudio estadístico de las D.O. obtenidas para *Streptococcus pyogenes* tenemos las diferencias significativas de las combinaciones de ensayos en los cuales se presentó efecto bactericida, encontrando que los valores de “p” son menores de 0.05 por lo que los ensayos se comportan diferente.

Nótese en la gráfica 8 que los siete ensayos tuvieron tendencia a estar dentro del rango establecido por el control positivo y el control negativo.

El mejor extracto fue el Qn pH 4.

En 1999 García Alvarado ⁽³³⁾ comprobó la actividad antibacteriana del Quitosán con diferentes cepas bacterianas, teniendo mejores resultados con bacterias Gram positivas como *Streptococcus* utilizando una concentración del 0.5 % = 5,000 µg/mL utilizando la técnica de Kirby-Bauer, y nuestros resultados lo reafirman.

La CMI resultante del ensayo de quitosán pH 4 fue 5000 µg / mL, para quitosán pH 5 fue de 5000 µg / mL. El quitosán pH 6 no mostró actividad bactericida.

Obsérvese en el isoblograma para *Caléndula*/quitosán pH 4 que hay crecimiento bacteriano en la primer columna donde no hay Quitosán, esto podría ser indicio de sinergismo, pero por los resultados obtenidos en *Caléndula* [0]/Quitosán pH 4 [625], al *Caléndula* [0]/Quitosán pH 4 [10000] no podemos hacer ésta afirmación. Lo mismo sucede en el caso del isoblograma para *Caléndula*/Quitosán pH 5 ya que en la primera fila *Caléndula* [0]/Quitosán pH 5 en todas las concentraciones no hay crecimiento solo en la [1250].

Con la experiencia obtenida del resultado del estudio realizado por Vega, Roque y Martínez en 2005, se pudo mostrar que *Caléndula* puede ser utilizada con efectividad en las curas de las heridas sépticas, logrando un buen proceso de granulación y cicatrización en un periodo corto de tiempo con buenos resultados epidemiológicos, sin riesgo de reacciones adversas. Quedo establecido la aplicación de *Caléndula* tintura 10 % en las heridas, *Caléndula* crema 10 % en las úlceras por presión ⁽³⁶⁾. Debido a los resultados obtenidos podemos afirmar que los agentes antibacterianos fueron más activos contra *Staphylococcus aureus* que contra *Escherichia coli* y esto se debe a que existen diferencias en la estructura de las paredes celulares entre bacterias Gram + y Gram -. En el 2000 Miranda Castro reporta que los resultados de su trabajo son similares a los que presentamos ⁽¹¹⁾. Esto es debido a que las bacterias Gram + presentan una pared celular con estructura simple (fig. 2). Fuera de la membrana citoplasmática hay solo una capa rígida, constituida de péptido glicano, esta pared está compuesta de redes con muchos poros lo cual que permite que moléculas extrañas entren la célula sin dificultad, y las bacterias Gram – tienen pared celular muy

complicada, ya que fuera de la pared hay otra estructura que es llamada membrana externa con estructura similar a la membrana citoplasmática ⁽¹¹⁾.

El mecanismo de acción del Quitosán se centra en el trastorno o bloqueo de la función de la membrana, dándose una aglomeración y al aumentar el tiempo de exposición se da la liberación de los constituyentes intracelulares es probablemente una de las claves en la inactivación celular.

Es importante mencionar que la acción del Quitosán está estrechamente relacionada con la carga neta de la superficie de la bacteria ya que algunas tienen carga neta negativa debido a las estructuras que se encuentran en la superficie de éstas como ya se mencionó anteriormente. También se debe considerar que cada bacteria tiene una carga neta diferente lo que afecta a la acción antibacteriana, provocando un efecto bacteriostático si la carga de la superficie bacteriana no es netamente negativa, ya que el Quitosán sólo bloquea a la bacteria momentáneamente y al suspender la interacción la bacteria crece sin problema cuando se le proporcionan los nutrientes necesarios. En cambio si la superficie de la bacteria es totalmente negativa el efecto es bactericida ya que se logra una desestabilización de la membrana y por consecuencia la muerte celular.

Cabe mencionar que es de suma importancia el peso molecular, el grado de desacetilación y pH del Quitosán que se empleó ya que de estas variantes depende su actividad antibacteriana, ya que entre mayor sea el grado de desacetilación nos indica que la molécula es más pura, y entre mayor sea el peso molecular nos garantiza que la molécula es más grande por lo que habrá más cargas positivas dispuestas a interactuar con la bacteria, y el pH entre más ácido sea nos proporciona más cargas negativas a la molécula de Quitosán.

En el caso de *Caléndula officinalis*, hay numerosos trabajos que han demostrado la actividad antibacteriana en bacterias Gram + y Gram -, desafortunadamente en éste trabajo no se pudo ver dicha actividad ya que se trabajó a una concentración muy baja de la misma. Por lo tanto el efecto obtenido en las mezclas se espera que sea diferente cuando se maneje a las concentraciones adecuadas.

Cabe hacer notar que se desconoce la carga neta del extracto de Caléndula y es importante saberla si se quiere trabajar con Quitosán ya que si la carga del extracto fuera parcialmente positiva o netamente positiva, se estaría dando un rechazo entre cargas lo que no facilitaría la unión de el extracto con el Quitosán y ambos atacarían a las bacterias de forma individual provocando competencia entre las moléculas, y si fuera parcialmente negativa o netamente negativa se daría una unión satisfactoria entre Caléndula y Quitosán lo que debilitaría la actividad del Quitosán. Aún así en los ensayos realizados a las bacterias que son estudiadas en éste trabajo se nota claramente que sí hay una unión satisfactoria aunque sólo se dé en las primeras concentraciones de cada ensayo.

VIII CONCLUSIONES

- Se aislaron e identificaron bacterias de 50 muestras clínicas de heridas infectadas y se evaluaron frente con el Quitosán a tres diferentes pH's y el extracto de *Caléndula officinalis* y con la mezcla 1:1 de dichos compuestos.
- Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria de cada extracto y mezcla de los mismos para cada bacteria.
- En las ocho bacterias el extracto más eficaz fue el Qn pH 4.
- Los ensayos realizados para comprobar el efecto sinérgico y/o antagónico de *Caléndula officinalis* y Quitosán a pH 4, pH 5 y pH 6 no arrojaron resultados contundentes que nos digan el efecto de los componentes de la mezcla en cada bacteria, esto debido a que la técnica utilizada, es decir la elaboración de isobogramas fue diseñada para ensayos de antimicrobianos de los cuales se puede conocer fácilmente se CMI y no se espera que existan interacciones de cargas entre los componentes de las mezclas. Aunque en el presente trabajo se obtuvieron las CMI de cada componente y para cada bacteria es evidente que tanto el efecto del pH en el quitosán, como los componentes del extracto de Caléndula interaccionan de una forma inesperada lo que nos dio resultados que podrían considerarse falsos positivos para sinergismo y en otros casos falsos positivos para antagonismo.

IX SUGERENCIAS.

En la prueba cualitativa no se obtuvo un resultado muy confiable, ya que debido a la turbidez de los compuestos en cada ensayo se dificultaba la visibilidad lo que pudo habernos dado falsos positivos o falsos negativos de no haber contado con las posteriores pruebas, por lo que en futuras experimentaciones con éstos compuestos se sugiere que ésta prueba se sustituya.

Al haber dicha sustitución se sugiere una modificación en la técnica, que sería cambiar el enfrentamiento con las bacterias en tubo, por el enfrentamiento con las bacterias siguiendo una cinética de crecimiento, así cuando se tomaran las muestras para leerlas en un espectrofotómetro se correría la prueba en microplaca, y se sembrarían en placas para comprobar el efecto bactericida o bacteriostático. Esto debido a que el medio contenido en los tubos de los ensayos realizados no nos ofrece el tiempo ni la cantidad de nutrientes que necesita cada cepa para realizar su cinética de crecimiento, así pues realizándolo de la manera antes mencionada, se tendría resultados más certeros.

También se sugiere que se evidencie el daño celular por medio de Microscopía Electrónica utilizando las mezclas; Así como variar las concentraciones de *Caléndula*, ya que en anteriores trabajos se ha demostrado experimentalmente que tiene un efecto bactericida en *Pseudomonas*, y en éste trabajo no se obtuvo el efecto esperado.

Otro punto es determinar la carga del extracto de *Caléndula*, como ya se mencionó, la actividad antimicrobiana del Quitosán depende mucho de las cargas positivas que tenga, por lo que al realizar las mezclas posiblemente la carga neta se vea afectada.

Aunque no se pudieron obtener resultados satisfactorios es importante considerar a ambos componentes para investigaciones futuras ya que controlando diferentes variables como concentración, pH, tiempo de enfrentamiento, etc., así como empleando otras técnicas ya establecidas se podrán obtener resultados certeros.

X APÉNDICE.

9.1 MATERIALES.

Medios de cultivo en placa:

Agar sangre
Agar SM
Agar Mac Conkey
Agar EMB
Agar BHI
Agar Verde brillante
Agar SB

Medios de cultivo en tubo:

Medio SIM. (BIOXON)
Medio MIO. (BIOXON)
Medio Gelatina nutritiva. (DIBICO)
Medio Citratos. (DIBICO)
Medio TSI. (BIOXON)
Caldo Urea. (BIOXON)
Caldo Nitratos. (DIBICO)
Caldo MR-VP. (DIBICO)
Caldo BHI a doble concentración. (Diagnóstica MERCK)
Medio BHI para conservación. (Diagnóstica MERCK)
Medio LIA. (BIOXON)
Catalasa
Oxidasa

Reactivos:

Aceite de inmersión
Agua destilada estéril
Rojo de metilo
Alfa naftol 5%
Hidróxido de potasio 40%
Reactivo de Ehrlich o Kovac's
Alfa naftilamina
Ácido sulfanílico
Zinc metálico
Cristal Violeta
Lugol
Alcohol-acetona
Safranina
Peróxido de Hidrógeno

MTT (5mg/ml)
MTT (MP biomedicals , INC.) 250 mg
RPMI-1640 sin rojo de fenol (SIGMA) c.b.p 50 mL
Se esteriliza con membrana de 0.22 μ m (millipore).
Conservar a 4°C en vial ámbar.

D-MEM

D-MEM (GIBCO) 13.38 g
NaHCO₃ (MONTERREY) 3.7 g
Agua desionizada c.b.p. 1000 mL
Se ajusta pH a 6.8 con HCl al 1 N y se prefiltra con membrana de 0.45 μ m (millipore).
Finalmente se esteriliza con membrana de 0.22 μ m (millipore).
Conservar a 4°C.

Material:

Matraces Erlenmeyer de diferentes volúmenes. (KIMAX)
Vidrios de reloj. (PIREX)
Cajas petri. (PIREX)
Probetas. (PIREX)
Pipetas de diferentes volúmenes. (KIMAX)
Asas bacteriológicas.
Tubos con tapón de rosca. (PIREX)
Portaobjetos.
Cubreobjetos
Microplacas de 96 pozos estériles. (EVERGREEN)
Micropipeta ajustable de 100 μ l (Oxford)
Puntas para micropipeta estériles
Pipetas de 5ml estériles. (KIMAX)
Pipetas de 10 ml estériles. (KIMAX)
Palillos estériles
Mecheros Fisher

Equipo:

Autoclave (ALL American Modelo 1925X)
Parrilla con agitador (Nuova II Stir Plate)
Microscopio Óptico (OLYMPUS)
Lector de ELISA (BIORAD)
Balanza analítica (ADVENTURE PRO)
pHmetro (HANNA)
Estufa
Horno

Material biológico:

Ocho cepas bacterianas aisladas de 50 muestras clínicas, proporcionadas por el Laboratorio de bacteriología del Hospital general clínica 57. Dichas cepas son: Enterobacter, Escherichia coli, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes.

Sustancias de experimentación:

Qn: Purificada y proporcionada por la Q.F.B. Patricia Miranda Castro del Laboratorio de Biotecnología de la Unidad de Posgrado de la FESC Campo 1.

Extracto de *Caléndula officinalis*: Purificado y proporcionado por el M.V.Z Gerardo Cruz Jiménez y por el M.V.Z. José Antonio Licea Vega del Laboratorio de Microbiología de la Unidad de Posgrado de la FESC Campo 1.

XI GLOSARIO

D.O.: Propiedad física de una sustancia que dentro de ciertos límites puede ser directamente proporcional a su concentración. Es una medida de la cantidad de radiación electromagnética, habitualmente luz que la sustancia absorbe. Esta propiedad se utiliza en la espectrofotometría.

Agente: Sustancia capaz de actuar sobre el organismo.

Antagonismo: Oposición o acción contraria que tiende a neutralizar los efectos.

Antimicrobiana: Que impide el desarrollo de los microbios.

Asepsia: Método de prevenir las infecciones por destrucción o evitación de agentes Infecciosos

Bactericida: Agente que es capaz de destruir por completo a las bacterias.

Bacteriostático: Detención del metabolismo de las bacterias y agente que tiene esta acción.

Cepa: Grupo de organismos cuya ascendencia es conocida

Célula viable: Célula viva

Citotoxicidad: Efecto destructor de células

Deshidrogenasa: Enzimas que oxidan indirectamente, por transferencia de hidrógeno. Se designan según su actividad específica o considerando el sustrato en el cual actúan.

Endógenas: Originado dentro del organismo

Exógenas: Que se origina en el exterior del organismo

Exoesqueleto: Esqueleto externo.

Facultativo: Tiene la facultad de no ser obligatorio

Fitoquímica: Estudio de los procesos químicos que se verifican en las plantas.

Tinción de Gram: Referente a Tinción de Gram para identificar bacterias.

Nosocomial: Que proviene de un Hospital

Sinergismo: Efecto donde se ejerce el aumento de la actividad de los componentes de una mezcla.

Plásmido: Molécula de ADN circular de solo unos millares de pares de bases fuera de los cromosomas. Puede haber muchas copias del mismo en la célula. Son moléculas de ADN de las bacterias en las que habitualmente radica la resistencia a antibióticos.

Extracto: Producto que se obtiene de un fármaco de origen vegetal sometiéndolo a la acción de un disolvente y evaporando el líquido resultante.

XII ANEXO I

Fig. 26. Prueba cualitativa en tubo y/o placa de 24 pozos para *Enterobacter spp.*



Fig. 27. Prueba cuantitativa en microplaca para determinar la CMI para *Enterobacter spp.*

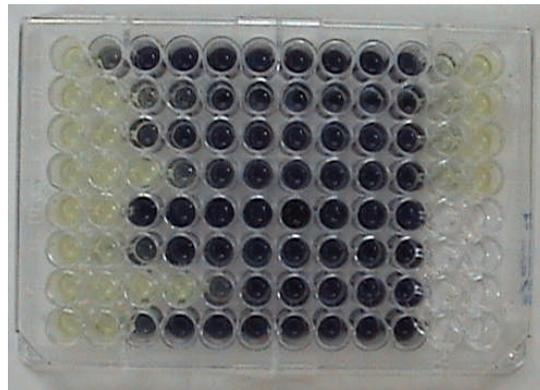
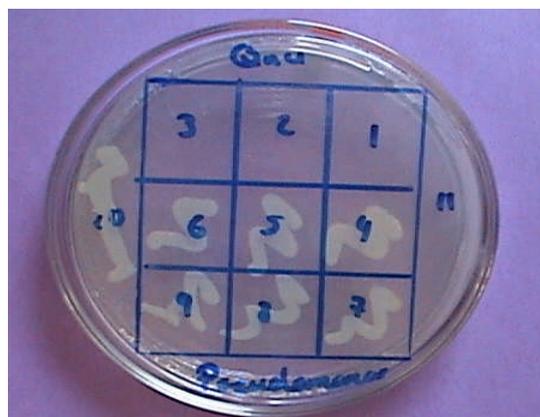


Fig. 28. Efecto bacteriostático y/o bactericida para *Pseudomonas spp.*



XIII ANEXO II

Tabla 17. Promedio de las D.O. obtenidas a 590 nm en los ensayos con *Enterobacter spp.*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	1.450	1.522	1.532	1.562	1.574	1.582	1.620	1.637	1.654
B	0.090	0.109	0.255 CMI	0.653	1.133	1.135	1.217	1.251	1.266
C	0.093 CMI	0.306	1.268	1.287	1.312	1.322	1.346	1.424	1.493
D	0.147	0.239 CMI	1.206	1.217	1.370	1.400	1.478	1.550	1.683
E	0.171	0.761	1.418	1.494	1.556	1.622	1.628	1.643	1.710
F	0.694	1.065	1.230	1.337	1.352	1.354	1.446	1.494	1.549
G	0.880	1.009	1.411	1.421	1.437	1.501	1.588	1.652	1.719

Tabla 18. Promedio de las D.O. obtenidas en los ensayos con *Escherichia coli.*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0.217	0.229 CMI	0.412	0.621	0.645	0.682	0.709	0.768	0.783
B	0.095	0.115	0.116	0.118	0.126 CMI	0.432	0.539	0.550	0.632
C	0.091	0.110	0.234 CMI	0.387	0.674	0.738	0.793	0.812	0.817
D	0.089	0.109	0.217 CMI	0.347	0.712	0.865	1.109	1.219	1.224
E	0.117	0.119	0.180 CMI	0.585	0.860	1.040	1.089	1.167	1.273
F	0.170	0.199 CMI	0.761	0.839	0.853	1.161	1.197	1.215	1.228
G	0.109	0.169 CMI	0.887	1.033	1.143	1.144	1.145	1.208	1.268

Tabla 19. Promedio de las D.O. obtenidas a 590 nm en los ensayos con *Klebsiella spp.*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	1.361	1.515	1.564	1.686	1.704	1.718	1.721	1.723	1.728
B	0.098	0.138 CMI	0.240	0.594	0.877	1.003	1.071	1.077	1.162
C	0.096	0.104 CMI	0.444	0.912	1.079	1.117	1.174	1.267	1.293
D	0.108	0.189 CMI	0.945	1.085	1.193	1.226	1.290	1.311	1.684
E	0.468	0.701	1.160	1.387	1.421	1.439	1.453	1.488	1.493
F	0.296	0.516	0.818	1.199	1.314	1.390	1.492	1.565	1.572
G	0.443	0.494	1.184	1.294	1.326	1.356	1.360	1.377	1.408

Tabla 20. Promedio de las D.O. obtenidas a 590 nm en los ensayos con *Proteus spp.*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0.936	1.342	1.372	1.448	1.480	1.481	1.482	1.440	1.519
B	0.096	0.110	0.196 CMI	0.522	1.038	1.176	1.372	1.458	1.516
C	0.093	0.101	0.109 CMI	0.417	1.201	1.542	1.566	1.568	1.621
D	0.104	0.152	0.206 CMI	1.053	1.419	1.457	1.460	1.466	1.609
E	0.109 CMI	0.336	1.005	1.144	1.320	1.466	1.599	1.712	1.720
F	0.356	0.748	1.066	1.253	1.348	1.367	1.408	1.419	1.596
G	0.856	0.914	1.411	1.440	1.512	1.530	1.560	1.699	1.863

Tabla 21. Promedio de las D.O. obtenidas a 590 nm en los ensayos con *Pseudomonas spp.*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	1.085	1.340	1.675	1.688	1.806	1.854	1.888	1.985	2.062
B	0.107	0.113	0.176 CMI	2.077	2.264	2.282	2.456	2.623	2.713
C	0.122	0.127 CMI	1.427	2.015	2.145	2.154	2.244	2.276	2.513
D	0.116	0.153 CMI	1.687	1.716	1.797	1.931	1.934	2.068	2.077
E	0.173 CMI	0.324	0.584	1.324	1.930	2.001	2.064	2.296	2.297
F	0.540	1.022	1.302	1.634	1.653	1.678	1.835	1.984	2.103
G	0.242	1.891	1.897	1.948	2.027	2.034	2.118	2.132	2.329

Tabla 22. Promedio de las D.O. obtenidas a 590 nm en los ensayos con *Salmonella spp.*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0.630	0.977	1.335	1.409	1.417	1.428	1.464	1.564	1.569
B	0.093	0.096	0.229 CMI	0.546	1.305	1.331	1.335	1.395	1.460
C	0.103	0.167 CMI	0.541	1.468	1.603	1.708	1.758	1.843	1.907
D	0.068 CMI	0.313	0.946	1.314	1.395	1.429	1.444	1.459	1.525
E	0.197 CMI	0.333	1.395	1.497	1.589	1.606	1.645	1.709	1.891
F	0.628	0.711	1.201	1.310	1.471	1.479	1.519	1.563	1.726
G	0.377	1.337	1.473	1.648	1.695	1.731	1.781	1.788	1.810

Tabla 23. Promedio de las D.O. obtenidas a 590 nm en los ensayos con *Staphylococcus aureus*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0.416	0.472	0.789	1.030	1.096	1.119	1.175	1.199	1.202
B	0.093	0.125	0.162	0.173	0.205 CMI	0.433	0.733	1.180	1.247
C	0.097	0.118	0.156	0.202 CMI	0.459	0.734	0.818	0.853	1.058
D	0.103	0.115	0.123	0.303 CMI	0.356	0.621	1.032	1.267	1.786
E	0.094	0.098	0.105	0.267 CMI	0.351	0.976	1.058	1.185	1.568
F	0.147	0.180	0.197 CMI	0.487	0.688	0.844	1.359	1.360	1.394
G	0.104	0.110	0.218 CMI	0.350	0.565	0.896	0.905	0.949	1.176

Tabla 24. Promedio de las D.O. obtenidas a 590 nm en los ensayos con *Streptococcus pyogenes*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0.263	1.024	1.211	1.444	1.554	1.573	1.607	1.641	1.665
B	0.104	0.146 CMI	0.254	0.522	1.227	1.487	1.512	1.547	1.584
C	0.103	0.167 CMI	0.541	1.468	1.603	1.708	1.758	1.843	1.907
D	0.109	0.131 CMI	0.935	1.272	1.354	1.360	1.524	1.541	1.673
E	0.176 CMI	0.468	1.518	1.625	1.790	1.822	1.881	1.920	1.928
F	0.511	0.567	1.547	1.723	1.745	1.878	2.005	2.022	2.080
G	0.645	1.338	1.449	1.582	1.608	1.668	1.674	1.718	1.781

Donde:

Carril A ensayo con *Caléndula officinalis*
 Carril B ensayo con Qn a pH 4
 Carril C ensayo con C/Qn pH 4
 Carril D ensayo con Qn pH 5
 Carril E ensayo con C/Qn pH 5
 Carril F ensayo con Qn pH 6
 Carril G ensayo con C/Qn pH 6
 Columna no. 1 solución concentrada.
 Columna no. 2 dilución 1:2
 Columna no. 3 dilución 1:4
 Columna no. 4 dilución 1:8
 Columna no. 5 dilución 1:16
 Columna no. 6 dilución 1:32
 Columna no. 7 dilución 1:64
 Columna no. 8 dilución 1:128
 Columna no. 9 dilución 1:256
 Columna no. 10 control positivo.

Tabla 25. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 4 para *Enterobacter spp.*

Lectura inicial						
4000	0.5007	0.8099	1.4559	1.1150	1.0254	1.1051
2000	0.3912	0.8915	1.4733	1.1389	1.2177	1.2543
1000	0.3207	0.8277	1.4488	1.1025	1.1341	1.1913
500	0.3196	0.8448	1.5283	1.0885	1.1936	1.1854
250	0.2907	0.8473	1.4934	1.0573	1.1545	1.0754
0	0.1874	1.0745	0.9389	0.6597	0.6072	0.5493
	0	625	1250	2500	5000	10000
Lectura final						
4000	1.0798	1.2501	1.6513	1.2174	1.3632	1.5273
2000	1.3155	1.2607	1.6234	1.2279	1.3620	1.5187
1000	1.3347	1.2420	1.5809	1.1781	1.3153	1.4964
500	1.4783	1.2539	1.6446	1.1297	1.2951	1.5002
250	1.5512	1.2532	1.6258	1.1454	1.2960	1.4697
0	0.7053	1.3731	1.0916	1.2106	1.2451	1.5434
	0	625	1250	2500	5000	10000
Diferencia						
4000	0.5791	0.8099	0.1954	0.1024	0.3378	0.4222
2000	0.9243	0.3692	0.1501	0.0890	0.1443	0.2644
1000	1.0140	0.4143	0.1321	0.0756	0.1812	0.3051
500	1.1587	0.4091	0.1163	0.0412	0.1015	0.3148
250	1.2605	0.4059	0.1324	0.0881	0.1415	0.3943
0	0.5179	0.2986	0.1527	0.5509	0.6379	0.9941
	0	625	1250	2500	5000	10000

Tabla 26. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 5 para *Enterobacter.*

Lectura inicial						
4000	0.5132	0.7122	0.9069	0.9591	1.3513	1.0062
2000	0.4182	0.7043	0.8854	1.0356	1.4988	1.2568
1000	0.3602	0.5637	0.7872	1.0225	1.5981	1.2812
500	0.3248	0.5911	0.8135	0.9336	1.4887	1.2128
250	0.2966	0.6149	0.8073	1.0120	1.5301	1.2098
0	0.2028	1.0559	1.3558	1.4456	1.5490	1.7648
	0	625	1250	2500	5000	10000
Lectura final						
4000	1.1913	1.3244	1.3675	1.3582	1.5408	1.0408
2000	1.5509	1.5821	1.5818	1.5562	1.6149	1.4773
1000	1.5806	1.5464	1.5349	1.5514	1.6016	1.5386
500	1.6155	1.5728	1.5449	1.5674	1.5152	1.3171
250	1.6380	1.4510	1.6208	1.5840	1.5966	1.7335
0	0.7891	1.2124	1.3623	1.5898	1.7089	1.7726
	0	625	1250	2500	5000	10000
Diferencia						
4000	0.6781	0.6122	0.4606	0.3991	0.1889	0.0346
2000	1.1327	0.8778	0.6964	0.5206	0.1161	0.2205
1000	1.2204	0.9827	0.7477	0.5289	0.0035	0.2574
500	1.2907	0.9817	0.7314	0.6338	0.0265	0.1043
250	1.3414	0.8361	0.8135	0.572	0.0665	0.5237
0	0.5863	0.1565	0.0065	0.1442	0.1599	0.0078
	0	625	1250	2500	5000	10000

Tabla 27. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 4 para *Escherichia coli*.

Lectura inicial						
4000	0.4451	0.3819	0.5513	0.8193	1.2060	1.1266
2000	0.3575	0.4365	0.5932	0.8595	1.2955	1.0799
1000	0.2825	0.3808	0.5630	0.7566	1.2824	1.1190
500	0.2832	0.3809	0.5612	0.7862	1.3494	1.1571
250	0.2655	0.3542	0.5377	0.7702	1.2586	1.1348
0	0.1735	0.5641	0.9693	1.0565	0.8336	0.5851
	0	156.2	312.5	625	1250	2500
Lectura final						
4000	1.3215	1.3279	1.5249	1.2956	1.3884	1.1649
2000	1.5431	1.5582	1.5310	1.3658	1.3914	1.1497
1000	1.6150	1.5758	1.5204	1.3872	1.3301	1.2358
500	1.6206	1.6565	1.5336	1.5333	1.3969	1.2467
250	1.7022	1.4817	1.5221	1.4537	1.3172	1.2234
0	0.8106	1.3451	1.2086	1.2633	1.4287	1.5136
	0	156.2	312.5	625	1250	2500
Diferencia						
4000	0.8764	0.946	0.9736	0.4763	0.1824	0.0383
2000	1.1856	1.1217	0.9378	0.5063	0.0959	0.0698
1000	1.3325	1.195	0.9574	0.6306	0.0477	0.1168
500	1.3374	1.2756	0.9724	0.7471	0.0475	0.0896
250	1.4367	1.1275	0.9844	0.6835	0.0586	0.0886
0	0.6371	0.781	0.2393	0.2068	0.5951	0.9285
	0	156.2	312.5	625	1250	2500

Tabla 28. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 5 para *Escherichia coli*.

Lectura inicial						
4000	0.4513	0.6446	0.7579	0.9404	1.5243	1.4603
2000	0.3683	0.5874	0.7482	0.8930	1.7013	1.2816
1000	0.2977	0.5373	0.7171	0.8074	1.5549	1.2828
500	0.2970	0.5356	0.7103	0.8270	1.5186	1.3493
250	0.2863	0.5340	0.6804	0.8820	1.5843	1.0909
0	0.1706	1.0446	1.3876	1.6014	1.2845	1.5700
	0	625	1250	2500	5000	10000
Lectura final						
4000	1.4756	1.5901	1.5280	1.5106	1.5694	1.6296
2000	1.8495	1.8504	1.8379	1.7778	1.9544	1.7323
1000	1.6363	1.7429	1.7028	1.6278	1.6056	1.6121
500	1.8635	1.7684	1.7637	1.5856	1.5997	1.8100
250	1.8105	1.7903	1.7381	1.7308	1.8187	1.6919
0	0.8217	1.3294	1.5337	1.6309	1.8196	1.8523
	0	625	1250	2500	5000	10000
Diferencia						
4000	1.0243	0.9455	0.7701	0.5702	0.0451	0.1693
2000	1.4812	1.263	1.0897	0.8848	0.2531	0.4507
1000	1.3386	1.2056	0.9857	0.8204	0.0507	0.3293
500	1.5665	1.2328	1.0534	0.7586	0.0811	0.4607
250	1.5242	1.2563	1.0577	0.8488	0.2344	0.601
0	0.6511	0.2848	0.1461	0.0295	0.5351	0.2823
	0	625	1250	2500	5000	10000

Tabla 29. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 6 para *Escherichia coli*.

Lectura inicial						
4000	0.4381	0.4837	0.5683	0.6652	1.2294	0.8192
2000	0.3924	0.3949	0.5109	0.6248	1.1669	0.8295
1000	0.3265	0.3270	0.4256	0.5205	1.1526	0.7187
500	0.2916	0.3321	0.4113	0.5083	1.1587	0.7572
250	0.2782	0.3460	0.3973	0.4857	0.8106	0.7627
0	0.1205	0.4262	0.5792	0.9748	1.4743	1.5621
	0	625	1250	2500	5000	10000
Lectura final						
4000	1.2748	1.6170	1.5434	1.5344	1.6692	1.6924
2000	1.7682	1.8669	1.7969	1.8391	1.9371	1.9037
1000	1.8410	1.6458	1.6662	1.7179	1.7825	1.8488
500	1.8061	1.7309	1.7381	1.7344	1.8610	1.8980
250	1.7607	1.6989	1.6883	1.7879	1.8374	1.3484
0	0.8617	1.4713	1.5814	1.7071	1.8704	1.6278
	0	625	1250	2500	5000	10000
Diferencia						
4000	0.8367	1.1333	0.9751	0.8692	0.4398	0.8732
2000	1.3758	1.4720	1.2860	1.2143	0.7702	1.0742
1000	1.5145	1.3188	1.2406	1.1974	0.6299	1.1301
500	1.5145	1.3988	1.3268	1.2261	0.7023	1.1408
250	1.4825	1.3529	1.291	1.3022	1.0268	0.5857
0	0.7412	1.0451	1.0022	0.7323	0.3961	0.0657
	0	625	1250	2500	5000	10000

Tabla 30. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 4 para *Klebsiella spp.*

Lectura inicial						
4000	0.3938	0.8729	1.1752	1.4916	1.5305	1.5399
2000	0.3746	0.8570	1.1710	1.4597	1.5631	1.5563
1000	0.2963	0.8424	1.1665	1.4292	1.5701	1.5839
500	0.2848	0.8324	1.1656	1.4282	1.5696	1.5841
250	0.2561	0.7852	1.1385	1.4237	1.5399	1.6268
0	0.1686	0.8205	1.1419	1.2580	1.2827	1.3274
	0	625	1250	2500	5000	10000
Lectura final						
4000	1.4048	1.5327	1.4848	1.5057	1.5989	1.6799
2000	1.6120	1.5581	1.4850	1.5648	1.5925	1.6685
1000	1.6427	1.6330	1.5421	1.6335	1.5796	1.6597
500	1.6597	1.6391	1.5447	1.7046	1.5710	1.6518
250	1.6924	1.6683	1.5617	1.7322	1.5885	1.6415
0	0.7477	1.6130	1.4649	1.4599	1.4467	1.4447
	0	625	1250	2500	5000	10000
Diferencia						
4000	1.0110	0.6598	0.3096	0.0141	0.0684	0.1400
2000	1.2374	0.7011	0.3140	0.1051	0.0294	0.1122
1000	1.3464	0.7906	0.3756	0.2043	0.0095	0.0758
500	1.3749	0.8067	0.3791	0.2764	0.0109	0.0677
250	1.4363	0.8831	0.4232	0.3085	0.0486	0.0147
0	0.5791	0.7925	0.3230	0.2019	0.1639	0.1173
	0	625	1250	2500	5000	10000

Tabla 31. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 5 para *Klebsiella spp.*

Lectura inicial						
4000	0.4172	0.6683	0.7937	0.9530	1.2839	1.5189
2000	0.3629	0.5694	0.7681	0.9292	1.2559	1.5187
1000	0.2929	0.5429	0.7247	0.8964	1.1547	1.5109
500	0.2794	0.5174	0.7206	0.8872	1.0851	1.4666
250	0.2597	0.5071	0.6970	0.8643	0.7390	1.4022
0	0.1652	1.0448	1.3852	1.4716	1.3328	1.3266
	0	625	1250	2500	5000	10000
Lectura final						
4000	1.5082	1.5715	1.5371	1.4748	1.5784	1.5893
2000	1.7330	1.5994	1.5781	1.6325	1.6657	1.6009
1000	1.7810	1.6479	1.6059	1.6429	1.6960	1.6500
500	1.8768	1.7208	1.7397	1.6793	1.7458	1.7506
250	1.8955	1.7889	1.8258	1.7438	1.8222	1.7856
0	0.7641	1.6331	1.5785	1.6159	1.8416	1.8457
	0	625	1250	2500	5000	10000
Diferencia						
4000	1.0910	0.9032	0.7434	0.5218	0.2945	0.0704
2000	1.3701	1.0300	0.8100	0.7033	0.4098	0.0822
1000	1.4881	1.1050	0.8812	0.7465	0.5413	0.1391
500	1.5974	1.2034	1.0191	0.7921	0.6607	0.2840
250	1.6358	1.2818	1.1288	0.8795	1.0832	0.3834
0	0.5989	0.5883	0.1933	0.1443	0.5088	0.5191
	0	625	1250	2500	5000	10000

Tabla 32. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 4 para *Proteus spp.*

Lectura inicial						
4000	0.4381	0.8799	1.1426	1.1441	1.4851	1.2405
2000	0.3757	0.8011	1.0768	1.1487	1.5209	1.2565
1000	0.3091	0.7643	1.0203	1.1792	1.5114	1.2659
500	0.2945	0.7623	1.0032	1.2779	1.5071	1.3815
250	0.2640	0.7470	0.9821	1.2363	1.4905	1.4049
0	0.1700	1.1507	1.0849	1.1575	1.0402	0.8677
	0	625	1250	2500	5000	10000
Lectura final						
4000	1.5545	1.3970	1.2692	1.3357	1.5429	1.6761
2000	1.6841	1.4470	1.2893	1.3289	1.5250	1.6198
1000	1.6979	1.4556	1.2980	1.3170	1.5250	1.6110
500	1.7163	1.5129	1.3051	1.2807	1.5257	1.5948
250	1.7361	1.5588	1.3236	1.2950	1.5691	1.5533
0	0.8684	1.1800	1.2090	1.3349	1.4622	1.5609
	0	625	1250	2500	5000	10000
Diferencia						
4000	1.1164	0.5171	0.1266	0.1916	0.0578	0.4356
2000	1.3084	0.6459	0.2125	0.1802	0.0041	0.3633
1000	1.3888	0.6913	0.2777	0.1378	0.0136	0.3451
500	1.4218	0.7506	0.3019	0.0028	0.0186	0.2133
250	1.4721	0.8118	0.3415	0.0587	0.0786	0.1484
0	0.6984	0.0293	0.1241	0.1774	0.4220	0.6932
	0	625	1250	2500	5000	10000

Tabla 33. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 5 para *Proteus spp.*

Lectura inicial						
4000	0.4690	0.6538	0.7386	0.9708	1.3803	1.6115
2000	0.3694	0.5789	0.7464	0.8723	1.2286	1.5976
1000	0.3206	0.5325	0.6381	0.7839	1.2484	1.5537
500	0.3026	0.5276	0.6302	0.7657	1.0911	1.5478
250	0.2666	0.5084	0.6449	0.8203	1.2617	1.6024
0	0.1843	1.0034	1.2194	1.2838	1.4138	1.3260
	0	625	1250	2500	5000	10000
Lectura final						
4000	1.6894	1.6580	1.6654	1.5217	1.5947	1.6446
2000	1.7693	1.8292	1.7093	1.5785	1.6215	1.7216
1000	1.7963	1.8547	1.7453	1.6149	1.6725	1.8009
500	1.7977	1.9088	1.7572	1.6251	1.7843	1.9454
250	1.8441	1.8547	1.7584	1.7048	1.8200	2.0902
0	0.9180	1.6854	1.6223	1.5682	1.5661	1.5393
	0	625	1250	2500	5000	10000
Diferencia						
4000	1.2204	1.0042	0.9268	0.5509	0.2144	0.0331
2000	1.3999	1.2503	0.9629	0.7062	0.3929	0.1240
1000	1.4757	1.3222	1.1072	0.8310	0.4241	0.2472
500	1.4951	1.3812	1.1270	0.8594	0.6932	0.3976
250	1.5775	1.3463	1.1135	0.8845	0.5583	0.4878
0	0.7337	0.6820	0.4029	0.2844	0.1523	0.2133
	0	625	1250	2500	5000	10000

Tabla 34. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 4 para *Pseudomonas spp.*

Lectura inicial						
4000	0.4243	0.7999	1.0563	1.3508	1.5756	1.7333
2000	0.3664	0.7447	1.0445	1.3025	1.5714	1.6829
1000	0.2974	0.7410	1.0439	1.2621	1.5687	1.6801
500	0.2823	0.7196	0.9942	1.2601	1.5371	1.6628
250	0.2635	0.6988	0.9634	1.2414	1.5286	1.6561
0	0.1716	1.1894	1.3493	1.3545	1.3372	1.1398
	0	625	1250	2500	5000	10000
Lectura final						
4000	1.6338	1.3199	1.2414	1.8598	1.7634	1.7809
2000	1.7006	1.3591	1.5405	1.9370	1.8211	1.8545
1000	1.7572	1.3602	1.6745	1.9463	1.8214	1.9002
500	1.8022	1.3653	1.6874	1.9514	1.8539	1.9229
250	1.8328	1.3833	1.7259	2.0159	1.8793	1.9410
0	0.8946	1.7906	1.5114	1.4443	1.5263	1.6196
	0	625	1250	2500	5000	10000
Diferencia						
4000	1.2095	0.5200	0.1851	0.5090	0.1878	0.0476
2000	1.3342	0.6144	0.4960	0.6345	0.2497	0.1716
1000	1.4598	0.6192	0.6306	0.6842	0.2527	0.2201
500	1.5199	0.6457	0.6932	0.6913	0.3168	0.2601
250	1.5693	0.6845	0.7625	0.7745	0.3507	0.2849
0	0.7230	0.6012	0.1621	0.0898	0.1891	0.4798
	0	625	1250	2500	5000	10000

Tabla 35. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 5 para *Pseudomonas spp.*

Lectura inicial						
4000	0.4169	0.7394	0.7623	0.9036	1.2035	1.5517
2000	0.3559	0.5831	0.6810	0.9309	1.1566	1.5736
1000	0.2848	0.5667	0.6625	0.8577	1.3577	1.4890
500	0.2790	0.4827	0.6429	0.7682	1.0284	1.4177
250	0.2556	0.4375	0.6694	0.8224	1.1522	1.5518
0	0.1703	0.9725	1.2914	1.2980	1.5888	1.5839
	0	625	1250	2500	5000	10000
Lectura final						
4000	1.8237	1.7063	1.6579	1.6401	1.9010	1.8486
2000	1.9708	1.8835	1.7709	1.6692	1.9214	1.9786
1000	1.9860	1.8850	1.8368	1.7775	1.9551	1.9800
500	1.9877	1.8944	1.8383	1.8043	1.9875	2.0432
250	2.0214	1.9193	1.9073	1.8510	2.0227	2.0518
0	0.9865	1.9533	1.8420	1.7859	1.7084	1.6793
	0	625	1250	2500	5000	10000
Diferencia						
4000	1.4068	0.9669	0.8956	0.7365	0.6975	0.2969
2000	1.6149	1.3004	1.0899	0.7383	0.7648	0.4050
1000	1.7012	1.3183	1.1743	0.9198	0.5974	0.4910
500	1.7087	1.4117	1.1954	1.0361	0.9591	0.6255
250	1.7658	1.4818	1.2379	1.0286	0.8705	0.5000
0	0.8162	0.9808	0.5506	0.4879	0.1196	0.0954
	0	625	1250	2500	5000	10000

Tabla 36. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 4 para *Salmonella spp.*

Lectura inicial						
4000	0.4390	0.8711	1.6596	1.0958	1.1880	1.1890
2000	0.4096	0.8551	1.5671	1.0763	1.1348	1.1775
1000	0.3346	0.8514	1.5171	1.0581	1.1117	1.0972
500	0.3271	0.8495	1.4677	1.1305	1.0767	1.0545
250	0.3172	0.8082	1.4644	1.1547	1.0447	1.0524
0	0.2107	1.1852	1.0797	0.7456	0.6840	0.6292
	0	625	1250	2500	5000	10000
Lectura final						
4000	1.1868	1.2525	1.6946	1.1627	1.3528	1.5624
2000	1.4334	1.2642	1.6167	1.0987	1.3721	1.5745
1000	1.6038	1.2686	1.6950	1.1124	1.3920	1.5790
500	1.6162	1.3148	1.7594	1.1316	1.3994	1.5927
250	1.6289	1.3217	1.7940	1.1905	1.1044	1.6188
0	0.9165	1.2913	1.2550	1.4546	1.5880	0.6671
	0	625	1250	2500	5000	10000
Diferencia						
4000	0.7478	0.3814	0.0350	0.0669	0.1648	0.3734
2000	1.0238	0.4091	0.0496	0.0224	0.2373	0.3970
1000	1.2692	0.4172	0.1779	0.0543	0.2803	0.4818
500	1.2891	0.4653	0.2917	0.0011	0.3227	0.5382
250	1.3117	0.5135	0.3296	0.0358	0.0597	0.5664
0	0.7058	0.1061	0.1753	0.7090	0.9040	0.0379
	0	625	1250	2500	5000	10000

Tabla 37. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 5 para *Salmonella spp.*

Lectura inicial						
4000	0.4927	0.6737	0.8402	1.0753	1.2606	1.3219
2000	0.3959	0.5835	0.7796	1.0314	1.2599	1.5186
1000	0.3279	0.5696	0.7021	1.0272	1.2758	1.5514
500	0.3240	0.5314	0.7487	1.0268	1.2185	1.5681
250	0.3196	0.5384	0.7694	0.9590	1.1981	1.5278
0	0.2112	1.1044	1.3923	1.5201	1.3543	1.2836
	0	625	1250	2500	5000	10000
Lectura final						
4000	1.3654	1.4249	1.2876	1.4091	1.3408	1.3711
2000	1.5351	1.5819	1.5535	1.7660	1.5466	1.6264
1000	1.6815	1.6553	1.5902	1.7812	1.5691	1.7239
500	1.7084	1.5523	1.5264	1.6279	1.6630	1.7430
250	1.7113	1.6743	1.6627	1.5412	1.7009	1.7688
0	0.9576	1.7602	1.5601	1.6393	1.9261	1.9168
	0	625	1250	2500	5000	10000
Diferencia						
4000	0.8727	0.7512	0.4474	1.4091	0.0802	0.0492
2000	1.1392	0.9984	0.7739	1.7660	0.2867	0.1078
1000	1.3536	1.0857	0.8881	1.7812	0.2933	0.1725
500	1.3844	1.0209	0.7777	1.6279	0.4445	0.1749
250	1.3917	1.1359	0.8933	1.5412	0.5028	0.2410
0	0.7464	0.6558	0.1678	1.6393	0.5718	0.6332
	0	625	1250	2500	5000	10000

Tabla 38. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 4 para *Staphylococcus aureus.*

Lectura inicial						
4000	0.4696	0.5045	0.6217	0.9176	1.2161	1.3321
2000	0.4210	0.4941	0.6199	0.8987	1.1822	1.4123
1000	0.3582	0.4321	0.5840	0.8028	1.1666	1.4280
500	0.3566	0.4321	0.5759	0.7979	1.1740	1.4217
250	0.3307	0.4410	0.5684	0.7905	1.1037	1.1381
0	0.2285	0.5768	0.6545	0.8037	0.8915	0.8103
	0	156.2	312.5	625	1250	2500
Lectura final						
4000	1.5007	1.2408	1.2986	1.3144	1.3081	1.4183
2000	1.5321	1.2694	1.4266	1.3799	1.3363	1.4608
1000	1.5708	1.3108	1.4444	1.3935	1.4461	1.4678
500	1.5577	1.4322	1.5301	1.4828	1.4626	1.4747
250	1.7061	1.5515	1.6747	1.5845	1.5820	1.4767
0	0.9153	1.4693	1.4243	1.2246	0.9723	0.9183
	0	156.2	312.5	625	1250	2500
Diferencia						
4000	1.0311	0.7363	0.6769	0.3968	0.0920	0.0862
2000	1.1111	0.7753	0.8067	0.4812	0.1541	0.0485
1000	1.2126	0.8787	0.8604	0.5907	0.2795	0.0398
500	1.2011	1.0001	0.9542	0.6849	0.2886	0.0530
250	1.3754	1.1105	1.1063	0.7940	0.4783	0.3386
0	0.6868	0.8925	0.7698	0.4209	0.0808	0.1080
	0	156.2	312.5	625	1250	2500

Tabla 39. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 5 para *Staphylococcus aureus*.

Lectura inicial						
4000	0.5292	0.5060	0.6737	0.8928	1.1372	1.2534
2000	0.4243	0.5343	0.6199	0.8154	1.0349	1.2405
1000	0.3605	0.4644	0.5919	0.7788	1.0330	1.2021
500	0.3504	0.4826	0.5630	0.7609	1.0553	1.1007
250	0.3293	0.4675	0.5786	0.7700	1.0537	1.2478
0	0.2316	0.9186	1.0972	1.2385	1.3959	1.4078
	0	312.5	625	1250	2500	5000
Lectura final						
4000	1.4368	1.4088	1.4912	1.4920	1.3865	1.3920
2000	1.5155	1.4858	1.6168	1.5578	1.6191	1.4419
1000	1.6401	1.6352	1.6508	1.6777	1.6415	1.4637
500	1.6960	1.7296	1.6813	1.7223	1.6521	1.4878
250	1.7461	1.7482	1.7905	1.7804	1.6642	1.4893
0	0.9642	1.8524	1.6070	1.5959	1.5940	1.5562
	0	312.5	625	1250	2500	5000
Diferencia						
4000	0.9076	0.9028	0.8175	0.5992	0.2493	0.1386
2000	1.0912	0.9515	0.9969	0.7424	0.5842	0.2014
1000	1.2796	1.1708	1.0589	0.8989	0.6085	0.2616
500	1.3456	1.2470	1.1183	0.9614	0.5968	0.3871
250	1.4168	1.2807	1.2119	1.0104	0.6105	0.2415
0	0.7326	0.9338	0.5098	0.3574	0.1981	0.1484
	0	312.5	625	1250	2500	5000

Tabla 40. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 6 para *Staphylococcus aureus*.

Lectura inicial						
4000	0.4970	0.4602	0.5179	0.6653	0.8359	1.2635
2000	0.4194	0.3986	0.4986	0.5971	0.8051	1.2359
1000	0.3580	0.3497	0.4417	0.5398	0.7362	1.1508
500	0.3108	0.3455	0.4220	0.5096	0.7217	1.0861
250	0.2873	0.2983	0.4027	0.5316	0.7045	1.0255
0	0.2022	0.4079	0.5834	0.8685	1.4575	1.5333
	0	625	1250	2500	5000	10000
Lectura final						
4000	1.6665	1.7344	1.3376	1.5767	1.7470	1.5341
2000	1.9131	1.9642	1.7038	1.6094	1.9126	1.9111
1000	1.9677	1.9956	1.8006	1.7459	1.8802	1.9264
500	1.9853	2.0465	1.8898	1.8367	1.9371	1.9560
250	2.0056	2.0997	1.9784	1.8695	1.9610	1.9816
0	0.9888	2.0569	1.8963	1.7899	1.6412	1.6375
	0	625	1250	2500	5000	10000
Diferencia						
4000	1.1695	1.2742	0.8197	0.9114	0.9111	0.2706
2000	1.4937	1.5656	1.2052	1.0123	1.1075	0.6752
1000	1.6097	1.6459	1.3589	1.2061	1.1440	0.7756
500	1.6745	1.7010	1.4678	1.3271	1.2154	0.8699
250	1.7183	1.8014	1.5757	1.3379	1.2565	0.9561
0	0.7866	1.6490	1.3129	0.9214	0.1837	0.1042
	0	625	1250	2500	5000	10000

Tabla 41. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 4 para *Streptococcus pyogenes*.

Lectura inicial						
4000	0.4447	0.8550	1.1371	1.3371	1.3725	1.3818
2000	0.3721	0.8361	1.1132	1.3230	1.3046	1.3599
1000	0.3012	0.7876	1.1054	1.1554	1.3718	1.3630
500	0.2967	0.7855	1.0976	1.1404	1.3661	1.3206
250	0.2672	0.7747	1.0837	1.2421	1.3532	1.3420
0	0.1829	1.1268	1.1556	1.3845	1.3982	1.2187
	0	625	1250	2500	5000	10000
Lectura final						
4000	1.2301	1.2871	1.3239	1.4381	1.4774	1.5957
2000	1.3457	1.1978	1.4442	1.4803	1.4675	1.5209
1000	1.4760	1.1394	1.4807	1.3012	1.4363	1.5587
500	1.5292	1.1565	1.4789	1.3261	1.4097	1.5813
250	1.5045	1.2096	1.4772	1.6684	1.4151	1.4868
0	0.7986	1.6405	1.6345	1.5160	1.4380	1.4135
	0	625	1250	2500	5000	10000
Diferencia						
4000	0.7854	0.4321	0.1868	0.1010	0.1049	0.2139
2000	0.9736	0.3617	0.3310	0.1573	0.1629	0.1610
1000	1.1748	0.3518	0.3753	0.1458	0.0645	0.1957
500	1.2325	0.3710	0.3813	0.1857	0.0436	0.2607
250	1.2373	0.4349	0.3935	0.4263	0.0619	0.1448
0	0.6157	0.5137	0.4789	0.1315	0.0398	0.1948
	0	625	1250	2500	5000	10000

Tabla 42. Lecturas obtenidas para el isoblograma de Caléndula/Quitosán pH 5 para *Streptococcus pyogenes*.

Lectura inicial						
4000	0.4300	0.6489	0.8000	1.0403	1.3818	1.6740
2000	0.3656	0.6009	0.7867	1.0273	1.3300	1.6277
1000	0.3147	0.5427	0.6911	0.9968	1.2614	1.6379
500	0.2921	0.5329	0.6734	0.9467	1.2366	1.5949
250	0.2514	0.4904	0.6316	0.9920	1.2357	1.5707
0	0.1850	1.0378	1.3318	1.3378	1.3721	1.3596
	0	625	1250	2500	5000	10000
Lectura final						
4000	1.2058	1.5760	1.5243	1.2688	1.3822	1.6856
2000	1.5156	1.6628	1.7962	1.5877	1.5891	1.6353
1000	1.5555	1.6110	1.6254	1.5506	1.6068	1.6971
500	1.6575	1.6184	1.7330	1.5898	1.5925	1.6624
250	1.6965	1.7285	1.6904	1.6685	1.5595	1.6215
0	0.8231	1.6015	1.4758	1.4516	1.3821	1.3735
	0	625	1250	2500	5000	10000
Diferencia						
4000	0.7758	0.9271	0.7243	0.2285	0.0004	0.0116
2000	1.1500	1.0619	1.0095	0.5604	0.2591	0.0076
1000	1.2408	1.0683	0.9343	0.5538	0.3454	0.0592
500	1.3654	1.0855	1.0596	0.6431	0.3559	0.0675
250	1.4451	1.2381	1.0588	0.6765	0.3238	0.0508
0	0.6381	0.5637	0.1440	0.1138	0.0100	0.0139
	0	625	1250	2500	5000	10000

XIV ANEXO III

Tabla 43. Pruebas de identificación de las bacterias aisladas.

MORFOLOGÍA		PRUEBAS BIOQUÍMICAS					
Bacterias	Colonial	Microscópica	GRAM	OF	Catalasa	Oxidasa	Motilidad
Enterobacter	Colonias blancas	Bacilos	-	F	+	-	+ / v
Escherichia coli	En EMB colonias oscuras con brillo metálico verde	Bacilos	-	OF	+	-	-
Klebsiella spp	randes mucosas, brillantes y pegajosas	Bastones encapsulados	-	OF	+	-	-
Proteus spp	Forma de olas	Bastones	-	OF	+	-	+
Pseudomonas spp	Grandes y mucoides	Bacilos rectos o curvados	-	O	+	+	+
Salmonella spp		Coco bacilo	-	OF	+	-	+
Staphylococcus aureus	Blancas-gris	Cocos en pares, tétradas o racimos	+		+	-	-
Streptococcus pyogenes	Pequeñas amarillentas	Cocos en pares, tétradas, cadenas o racimos	+		-	-	-

Tabla 44. Pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias aisladas.

Bacterias	Indol	Motilidad	MR/VP	Citratos	Coagulasa	Glucosa	Urea	NO ₃	S ₂ H	TSI	Lactosa
Enterobacter spp	-	+ / v	-/+	+			-			Ác/Ác	+
Escherichia coli	+	-	+/-	-		+	-	+	-	Ác/Ác	+
Klebsiella spp	+	-	-/+	+		+	+	+			+
Proteus spp	-	+	+/-			+	+	+	+	Ac/Ac	-
Pseudomonas spp	-	+	-/-			-	-	+	-	Alc/Alc	-
Salmonella spp	+	+	+/-	+		+	-	+	+		-
Staphylococcus aureus		-	-/+		+	+		+			+

XIV REFERENCIAS

1. Konneman EW. Diagnóstico Microbiológico. 3ª edición, Buenos Aires, Argentina, editorial Panamericana, 1992.
2. Hernández TG. Manual de bacteriología diagnóstica. Tesis de licenciatura Q.F.B. FESC, UNAM. 2002.
3. Kumate J, Gutiérrez. Manual de infectología. 11ª edición México, Edit. Francisco Méndez Cervantes, 1990.
4. Baileys, S. Diagnóstico Microbiológico. 7a edición. Edit. Panamericana, Argentina, 1989.
5. Azotla GJE. Estudio retrospectivo de la incidencia microbiana en heridas. Tesis de licenciatura Q.F.B. FESC, UNAM. 2000.
6. Jawetz, MD. Ernest et al. Microbiología Médica. Edit. El manual Moderno, 1990.
7. García MG. Incidencia y respuesta a la ampicilina, Gentamicina, amikacina, ácido nalidíxico, nitrofurantoina y estudio de la ciprofloxacina como antibiótico alternativo a las cepas bacterianas aisladas en las pacientes con infección en vías urinarias en el H. G. Z. No. 57 La Quebrada Cuautitlán Izcalli. Tesis de licenciatura Q.F.B. FESC, UNAM. 1993.
8. Sahm DF. Mechanisms of Antimicrobial resistance. Clinical Microbial News. 1989.
9. Martínez AG. Evaluación de la actividad que sobre el sistema inmune tiene el Quitosán y la fescdipina comparada con la actividad inmunoestimulante de la vacuna BCG (Bacillus Calmette-Guerin). Tesis de licenciatura Q.F.B. FESC, UNAM. 1998.
10. González V. A, Guerrero S. C. A., Ortiz M. U. Estructura química y compatibilidad de poliamidas con quitina y quitosán. Ciencia UANL/ Vol. V, No. 1, Enero-Marzo 2002.
11. Miranda C.S.P. Evaluación de la actividad antibacteriana de Quitosán, caracterizado física y químicamente. Tesis de Maestría, 2000.
12. Trejo V., Aragón N., y Miranda P. Estimación de la permeabilidad al vapor de agua en películas a base de Quitosán. Journal of the Chemical Society, año/vol, 45, número 001 Sociedad Química de México.
13. Azcurra A. I., Barembaum S. R., Bojanich M. A., Calamari S. E., Aguilar J., Battellino J. L., Dorronsoro S. T.. Efecto del quitosán de alto peso molecular y del alginato de sodio sobre la hidrofobicidad y adhesión de *Candida albicans* a células. Medicina y patología oral; 11: E120-5. 2006
14. Sudarshan, VR, JG, Hoover and Knorr. Antibacterial action of chitosan, Food Biotechnology. 1992.

-
15. Farmacopea Homeopática de los estados Unidos Mexicanos. 3ª edición. México 1998.
 16. Halloran K. Caléndula officinalis Flowers. Organic Gardening. U.S.A. 2000.
 17. Rosa M. Raybaudi-Massilia, Robert Solia Fortuna, Olga Martín Beloso. Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frescas cortadas. I Simposio Ibero-Americano de Vegetais Frescos Cortados, San Pedro, SP Brazil, Abril 2006.
 18. Del valle Pérez L., Torres I., Sánchez M., Socarrás B., Sagarra M., Marsán V., Cos Y. y Macías C. Efecto *in vitro* de un extracto de caléndula officinalis L. sobre linfocitos humanos. Revista Cubana Hematol Inmunol Hemoter Vol. 18-3 2002.
 19. Águila B., Méndez R., González C. y Fernández D. Extracto acuoso de *Caléndula officinalis*. Estudio preliminar de sus propiedades. Revista Cubana Planta Médica; 5 (1):30-1. 2000.
 20. Cordero SA, González MAG. Reto microbiológico de extractos de *Caléndula officinalis* con bacterias aisladas en casos de metritis y mastitis bovina. Tesis de licenciatura Q.F.B. FESC, UNAM. 2005.
 21. Cruz Jiménez G., Licea Vega A., Vera Viviano G., Gardea García S., Ciprian Carrasco A. Efecto del extracto de *Caléndula officinalis* (mercadela) y *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate) en cultivos celulares evidenciado por el método colorimétrico de Mosmann. Revista de Fitoterapia, Volumen 6, Supl. I, diciembre 2006.
 22. <http://www.verdenatural.com/herbolaria/default.asp>
 23. Juscafresca, Baudillo. Guía de la flora medicinal. Edit. AEDOS, Barcelona. España. 1995
 24. Brees, Mark H. El Manual Merck de Diagnóstico y tratamiento. 10ª edición española. Edit. Harcourt. Madrid. 1999.
 25. Lara, O. F. y C. M. Alonso. Plantas medicinales de México: composición, usos y actividad biológica. UNAM. México. 1996.
 26. Plantas que curan. Enciclopedia de las Plantas Medicinales. Planeta De Agostini. Vol. 11. Barcelona, España. 1999.
 27. Biochemicals Organic Compounds for Research and Diagnostic Reagents. Sigma Chemical Company. St. Louis. 1994.
 28. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol.Meth. 1983.
 29. Gerlier, D., Tomaste, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. J. Immunol. Meth. 1986.

-
30. B.C. Saravanan et al. A rapid MTT assay to assess the proliferative index of two Indian strains of Theileria annulata. Veterinary Parasitology. 2003.
31. Cruz J. G. Curso de Bases Microbiológicas y Farmacológicas de la Quimioterapia. Ponencia resistencia Bacteriana. 20 y 21 de Octubre de 2005.
32. Tierney, L.M. Diagnóstico Clínico y tratamiento 2003. Editorial el Manual Moderno. 2003.
33. García. A. H. Pruebas de actividad antimicrobiana de quitosán. Tesis de Licenciatura Q.F.B. FESC, UNAM. 1999.
34. Cruz Jiménez G., Licea Vega J. A., Miranda Malvaes M. Efecto antimicrobiano del extracto acuoso de Cuachalalate (Amphypterygium adstringens) en bacterias Gram +, Gram – y Helicobacter pylori por la técnica de dilución en tubo NCCLS. Revista de Fitoterapia, Volumen 6, Supl. I, diciembre 2006.
35. Cruz Jiménez G., Licea Vega J. A., Morales S. M. A., Efecto de Caléndula officinalis en Pseudomonas aeruginosa evidenciado por microscopía electrónica. Tesis de licenciatura Q.F.B. FESC, UNAM.
36. Vega, O.A.P., Roque, B.R., Martínez J. Aplicación de la Caléndula officinalis en las curas sépticas en el año 2005. Hospital Ortopédico docente fructuoso Rodríguez. Facultad de Ciencias Médicas de la Habana, Cuba. 2005.
37. XIAO FEI LIU, YUN LIN GUAN, DONG ZHI YANG, ZHI LI, KANG DE YAO. Research Institute of Polymeric Materials, Tianjin University, Tianjin 300072, People's Republic of China. Antibacterial Action of Chitosan and Carboxymethylated Chitosan. Journal of Applied Polymer Science, Vol. 79. 2001.
38. Entsar I. Rabea,† Mohamed E.-T. Badawy,† Christian V. Stevens,*‡ Guy Smaghe,† and Walter Steurbaut†. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. Department of Crop Protection and Department of Organic Chemistry, Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences, Ghent University, Coupure Links 653, B-9000 Gent, Belgium. Published by the American Chemical Society. Biomacromoléculas. Volume 4, Number 6. 2003.
39. Pezet, V.M., Moctezuma L. Ma E., García V.J., Hernández M.J.T. Efecto bactericida; Caléndula officinalis y Echinacea Angustifolia en el Streptococcus Mutans Publicada en Homeopatía de México. Vol. 74, No. 638. Septiembre – octubre. Editorial Propulsora de Homeopatía. 2005.
40. Salazar H.H., Mireles H Ma. C, Martínez B.L. Infecciones nosocomiales en un hospital de segundo nivel. Revista Médica IMSS. 2002.
41. Tinoco J.C., Salvador M.J., Pérez P. Ma C., Santillán M. G., Salcido G. L. Epidemiología de las infecciones nosocomiales en hospital de segundo nivel. Salud Pública de México Vol. 39 no. 1 Cuernavaca ene/feb. 1997.
42. Secretaría de Salud. Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-026-SSA2-1998, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales. Diario Oficial de la Federación.