



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

Actividad Inhibitoria del Extracto de *Cymbopogon nardus* en
bacterias Gram positivas y Gram negativas.

T E S I S

QUE PARA OBTENER ÉL TITULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

IVONNE GABRIELA MUÑOZ FLORES

ASESORES: MVZ. GERARDO CRUZ JIMENEZ.
MVZ. JOSE ANTONIO LICEA VEGA.
M.C. SOFÍA GONZALES GALLARDO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2010.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Agradezco a Dios por darme la vida por estos años vividos, la experiencia adquirida, la sabiduría que me ha dado. Agradezco el amor de los míos, tener a mis padres, los sueños que me ha brindado y por permitirme escribir estas líneas.

Como un testimonio de gratitud por haber significado la inspiración que necesitaba para terminar mi carrera profesional, prometiendo superación y éxitos sin fin. Por el inmenso apoyo, confianza que en mí se depositó con los cuales he logrado terminar mis estudios profesionales que constituyen el legado más grande que pudiera recibir y por lo cual les viviré eternamente agradecido. Sólo deseo que entiendan que el logro mío, es el logro tuyo, que mi esfuerzo es inspirado en ti, y que mi único ideal eres tú. Con admiración y respeto a mis padres: Rosa María Flores de Luna y Daniel Jesús Muñoz Iniestra .

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento de manera especial al profesor MVZ Gerardo Cruz Jiménez, por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis. Debo destacar por encima de toda su disponibilidad y paciencia Muchas gracias Profesor.

A los profesores MVZ Gerardo Cruz Jiménez, MVZ José Antonio Licea Vega y a la M.C. Sofía Gonzales Gallardo, por su gran apoyo, paciencia y disposición, lo cual ayudo a que concluyera los estudios de la tesis.

De igual forma a mis sinodales porque a través de la revisión, corrección y con sus aportaciones valiosas enriquecieron este trabajo. Gracias por su tiempo: Dra. Luisa Martínez Aguilar, Q.F.B Brígida del Carmen Camacho Enríquez Aguilar, Q.F.B Dulce María Ruvalcaba Sil y M.C. Verónica Castro Bear.

Extracto Sigma por haber facilitado la obtención del Extracto de Citronela y así poder realizar la tesis.

Agradezco a mis hermanos el apoyo que siempre me han brindado con su impulso, fuerza, ejemplo y tenacidad que son parte de mi formación. Ana, Edith y Daniel.

A mi madrina Adriana Muñoz Iniestra por estar siempre conmigo en las malas y en las buenas. GRACIAS.

A la laboratorista Erika gracias por su apoyo y disposición lo cual ayudo mucho a que concluyera la tesis en la parte experimental. No voy a olvidar sus consejos durante el lapso de mi tesis. Pero sobre por su gran amistad.

Mi más sincero agradecimiento a mis compañeros del laboratorio de Microbiología: Mónica, Belem y Pablo.

A mis amigos que juntos hemos recorrido un camino largo lleno de logros y satisfacciones, sobre todo de grandes momentos de alegría, espero que no sean los últimos: Rocío, Liliana y Julia.

A Isabel, Viridiana, Yesenia, Mireya, Miriam, Edén, Anayeli y Ulises Rabadan, por su amistad sincera por su apoyo por su gran calidad humana que me han demostrado. Gracias por empujarme siempre adelante cuando llegaba a dudar, por compartir proyectos e ideas.

A mi Ángel de la Guarda, gracias por acompañarme en esta etapa de mi vida y por la paciencia que me has tenido pero sobre todo por tu apoyo y comprensión. Gracias por escucharme.

A la "UNAM" mi segundo hogar, "POR MIRAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Con amor, admiración y respeto.

INDICE GENERAL

Lista de abreviaturas	I
Índice de tablas.....	II
Índice de gráficas.....	II
Índice de figuras.....	III
Resumen.....	IV
1 Introducción	1
2 Antecedentes.....	3
2.1 Antibiótico	3
2.1.1 Origen y definición	3
2.1.2 Actividad infecciosa	3
2.1.3 Mecanismo de acción de los antibióticos	4
2.1.4 Resistencia bacteriana	6
2.2 Antecedentes de los extractos naturales.....	7
2.2.1 Posible mecanismo de acción de los extractos naturales.....	7
2.3 Microscopio Electrónico de Transmisión.....	8
2.3.1 Tinción negativa	8
2.4 Bacterias Gram (+) y Gram (-).....	9
2.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	9
2.4.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	10
2.4.3 <i>Streptococcus agalactiae</i>	10
2.4.4 <i>Streptococcus faecalis</i>	10
2.4.5 <i>Bacillus subtilis</i>	10
2.4.6 <i>Salmonella typhi</i>	11
2.4.7 <i>Escherichia coli</i>	11
2.4.8 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	12
2.4.9 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
2.5 Citronela	13
2.5.1 Descripción	13
2.5.2 Origen.....	13
2.5.3 Parte útil.....	13
2.5.4 Extracción	13
2.5.5 Historia y simbología	14

2.5.6 Usos.....	14
3 Justificación	15
3.1 Objetivos.....	15
3.2 Objetivo general.....	15
3.3 Objetivos particulares	15
3.4 Hipótesis.....	16
4 Material	17
4.1 Cepas bacterianas.....	17
4.2 Extracto a evaluar	17
4.3 Equipo de laboratorio	17
4.4 Material general de laboratorio.....	17
5 Metodología	18
5.1 Esterilización del extracto Citronela	18
5.1.1 Prueba de esterilidad.....	18
5.2 Actividad biológica en las bacterias.....	18
5.2.1 Procedimiento para la MCI, del extracto Citronela.....	19
5.2.2 Prueba Bactericida y Bacteriostática	20
5.3 Técnica de Mosmann cuantitativamente	21
5.4 Microscopio Electrónico de Transmisión	21
5.4.1 Preparación de las bacterias para el MET	21
5.4.2 Preparación de las rejillas con membrana de fomvar	22
5.4.3 Técnica de tinción negativa	22
5.5 Diagrama general de trabajo	23
6 Resultados	24
6.1 Identificación de bacterias	24
6.2 Prueba de esterilidad del extracto Citronela	24
6.3 Pruebas cualitativas	25
6.4 Técnica de Mosmann	26
6.5 Prueba Bacteriostática y Bactericida.....	29
6.6 Técnica de Mosmann cuantitativamente.....	34
6.7 Microscopia Electrónica de Transmisión.....	41
7 Discusión	44
8 Conclusiones	49
9 Bibliografía.....	50
10 Anexo	57

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS	Organización Mundial de la Salud
SSA	Secretaria de Salud
MCI	Concentración mínima inhibitoria
BHI	Infusión Cerebro Corazón (Medio de cultivo)
SSF	Solución Salina Fisiológica
AFT	Acido Fosfotúngstico
DMSO	Dimetil Sulfóxido
UCF	Unidad Formadora de Colonias
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2 y 1]-2,5-dimetiltetrazolio
MET	Microscopio Electrónico de Transmisión
Abs	Absorbancia
Rpm	Revoluciones por minuto
h	Hora
µL	Microlitros
mL	Mililitros
g	Gramo
mg	Miligramos
°C	Grado Celsius
L	Litro
SSFE	Solución Salina Fisiológica Estéril
CMB	Concentración Mínima Bactericida
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
PABA	Ácido paraaminobenzoico
ARN	Ácido ribonucleico
G (-)	Gram negativo
G (+)	Gram positivo
p.m.	Peso molecular
H ₂ S	Sulfuro de hidrógeno
IMVIC	Indol, Rojo de metilo, Voges-Proskauer y Citrato
ITU	Infecciones Del Tracto Urinario
CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos
MINSAL	Ministerio de Salud
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
SAMR	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
CDC	Centro de Control de Enfermedades
PBP	Proteína fijadora de penicilina

EGB	<i>Streptococcus agalactiae</i> del grupo B
mm	Milímetros
EE.UU	Estados Unidos de América
O/F	Oxidativo y Fermentativo
NaCl	Cloruro de sodio
KCN	Cianuro de potasio
µL	Microlitros
NNIS	National Nosocomial Infections Surveillance
ATCC	American Type Culture Collection
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
EPEC	<i>Escherichia coli enteropatógena</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Pbas	Pruebas
Bioq	Bioquímicas
c/s	con y sin
<i>Strep</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>C. nardus</i>	<i>Cymbopogon nardus</i>

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Causas del fracaso Tratamiento Antibacteriano.....	4
Tabla 2 Ficha de taxonomía	13
Tabla 3 Procedimiento para Microscopio Electrónica de Transmisión.....	21
Tabla 4 Prueba cualitativa realizada en las nueve bacterias	25
Tabla 5 Prueba cualitativa	25
Tabla 6 Concentraciones de diluciones dobles a partir de 54.19 µg/ml.....	26
Tabla 7 MCI de las Bacterias G(-) empleando la técnica de Mosmann	26
Tabla 8 MCI de las Bacterias G(+) empleando la técnica de Mosmann	27
Tabla 9 Prueba Bacteriostática y Bactericida G(-)	32
Tabla 10 Prueba Bacteriostática y Bactericida G(+)	32
Tabla 11 Prueba bacteriostática y Bactericida G(-) y G(+).....	33
Tabla 12 Prueba bacteriostática y Bactericida en las nueve bacterias.....	33
Tabla 13 G(-) y G(+), utilizando la técnica de Mosmann.....	36
Tabla 14 Ensayo por el método de Mosmann con el extracto de <i>C. nardus</i> con <i>E. coli</i>	37
Tabla 15 Ensayo por el método de Mosmann con el extracto de <i>C. nardus</i> con <i>K. pneumoniae</i>	38
Tabla 16 Ensayo por el método de Mosmann con el extracto <i>C. nardus</i> con <i>S. typhi</i>	39
Tabla 17 Ensayo por el método de Mosmann con el extracto de <i>C. nardus</i> con <i>S. aureus</i>	40
Tabla 18 Pruebas bioquímicas realizadas en las 9 bacterias	57
Tabla 19 Resultados obtenidos de la lectura en el elisometro.....	58
Tabla 20 Ficha técnica del extracto <i>Cymbopogon nardus</i>	60

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1 Bacterias G (+) (55.55%) y G (-) (44.44%)	24
Gráfica 2 Ensayo extracto Citronela con bacterias G (-) y G (+)	25
Gráfica 3 Ensayo del extracto <i>C. nardus</i> con <i>P. aeruginosa</i>	27
Gráfica 4 Ensayo del extracto <i>C. nardus</i> con <i>Bacillus subtilis</i>	27
Gráfica 5 Ensayo del extracto <i>C. nardus</i> con <i>Stap. epidermidis</i>	28
Gráfica 6 Ensayo del extracto <i>C. nardus</i> con <i>Strep. agalactiae</i>	28
Gráfica 7 Ensayo del extracto <i>C. nardus</i> con <i>Streptococcus faecalis</i>	28
Gráfica 8 Efecto bacteriostático y bactericida en bacterias G (-)	32
Gráfica 9 Efecto bacteriostático y bactericida en bacterias G (+)	33
Gráfica 10 Prueba bactericida y bacteriostático, en las 9 bacterias G (-) y G(-)	33
Gráfica 11 Ensayo del extracto <i>C.nardus</i> con <i>E. coli</i>	37

Gráfica 12 Ensayo del extracto <i>C. nardus</i> con <i>Klebsiella pneumoniae</i>	38
Gráfica 13 Ensayo del extracto <i>C. nardus</i> con <i>Salmonella typhi</i>	39
Grafica 14 Ensayo del extracto <i>C. nardus</i> con <i>Staphylococcus aureus</i>	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mecanismo de acción de los antibióticos	6
Figura 2 Microscopia Electrónica de Transmisión	9
Figura 3 <i>Cymbopogon nardus</i>	13
Figura 4 Principales componentes de <i>Cymbopogon nardus</i>	14
Figura 5 Microplaca	19
Figura 6 Prueba bactericida o bacteriostática	20
Figura 7 Sembrado a concentración de 54.19 µg/ml, el extracto <i>C. nardus</i> en agar BHI	24
Figura 8 Prueba bactericida y bacteriostática para <i>Salmonella typhi</i>	29
Figura 9 Prueba bactericida y bacteriostática para <i>Escherichia coli</i>	29
Figura 10 En Prueba bactericida y bacteriostática para <i>Klebsiella pneumoniae</i>	29
Figura 11 Prueba bactericida y bacteriostática para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
Figura 12 Prueba bactericida y bacteriostática para <i>Streptococcus agalactiae</i>	30
Figura 13 Prueba bactericida y bacteriostática para <i>Streptococcus faecalis</i>	30
Figura 14 Prueba bactericida y bacteriostática para <i>Bacillus subtilis</i>	31
Figura 15 Prueba bactericida y bacteriostática para <i>Staphylococcus epidermidis</i>	31
Figura 16 Prueba bactericida y bacteriostática para <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Figura 17 Ensayo extracto – bacteria (<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> y <i>S. typhi</i>).....	34
Figura 18. Ensayo extracto - MTT – bacteria (<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> y <i>S.typhi</i>)	35
Figura 19 Microfotografías de <i>Salmonella typhi</i> a 10 000 magnificaciones	41
Figura 20 Microfotografías de <i>Streptococcus faecalis</i> a 10 000 magnificaciones	42
Figura 21 Microfotografías de <i>Klebsiella pneumoniae</i> a 10 000 magnificaciones	43

RESUMEN

En 1840, el anatomopatólogo alemán Friedrich Henle propuso unos criterios para demostrar que los microorganismos eran responsables de la aparición de enfermedades en el ser humano conocida como «teoría de los gérmenes» de las enfermedades). En los años setenta y ochenta del mismo siglo, Robert Koch y Louis Pasteur confirmaron esta teoría mediante una serie de elegantes experimentos en los que demostraron que los microorganismos eran responsables de la aparición del carbunco, la peste, cólera y la tuberculosis. Más adelante, otros brillantes científicos confirmaron que una amplia variedad de microorganismos producían otras enfermedades humanas (Murray *et al*, 2006).

El interés en el estudio de plantas medicinales como fuente de compuestos farmacológicos activos ha aumentado por todo el mundo, para validar su uso en la Medicina Tradicional y que esto permita a la Industria Farmacéutica el desarrollo de nuevos productos más efectivos. El objetivo general de este trabajo es comprobar si existe algún efecto antimicrobiano del extracto de Citronella (*Cymbopogon nardus*) (Mora *et al*, 2002) en diferentes cepas de bacterias, por medio de pruebas de sensibilidad antimicrobiana, utilizando el reactivo MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-Difeniltetrazolio) (Ramírez, 2009), así entonces conocer si esta planta medicinal puede actuar como remedio en distintas infecciones, para esto se usaron las siguientes bacterias: *Salmonella typhi*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. El extracto se esterilizó por filtración con membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm, posteriormente se realiza una prueba de esterilidad sembrando 100µl del extracto en agar BHI, obteniendo resultados negativos de crecimiento microbiano, el extracto se evaporó hasta sequedad en el horno a temperatura de 50°C y evitando sobrepasar de 55°C. La materia seca obtenida del extracto se recolectó, pesó y conservó en frascos ámbar en condiciones de esterilidad y se obtuvo una solución de trabajo (54.19µg/ml), se hicieron diluciones dobles hasta (0.211 µg/ml), con un control negativo, control positivo y blanco. Se realizó el ensayo extracto-bacteria incubando la placa a 37°C, 24 horas, antes de agregarle el reactivo de MTT, se sembró en placas con BHI dividida en 12 partes, para lograr el análisis de efecto bactericida-bacteriostático (Morales, 2009), la placa se incubó 3 horas con MTT y se leyó a 560nm longitud de onda y finalmente las bacterias tratadas se observaron en el microscopio electrónico de transmisión para evidenciar el posible daño causado por el extracto en las mismas. El extracto de Citronela, presenta un mejor efecto inhibitorio en 3 de las 9 bacterias utilizadas (33%), *Salmonella typhi*, *Streptococcus faecalis* y *Klebsiella spp.* El efecto de Citronela es bacteriostático y las observaciones en el microscopio electrónico de transmisión (González, 2003) permitieron determinar en parte cómo daña a las bacterias antes mencionadas. En base a los resultados obtenidos, el extracto de Citronela si podría ser utilizado, si realizáramos otros estudios que completen la investigación. Con fines terapéuticos para infecciones causadas por las bacterias que resultaron ser más sensibles a éste.

1 Introducción

La Microbiología se puede definir como la ciencia que trata de los seres vivos muy pequeños, concretamente de aquellos cuyo tamaño se encuentra por debajo del poder resolutorio del ojo humano. El descubrimiento de los microorganismos fue obra de un comerciante holandés de tejidos, Antonie Van Leeuwenhoek (1632-1723) en 1675 descubrió que en una gota de agua de estanque pululaba una asombrosa variedad de pequeñas criaturas a las que denominó "animálculos". En 1683 descubre las bacterias por lo que se considera el "padre de la Microbiología".

Fue asimismo Koch quien demostró el principio de especificidad biológica del agente infeccioso: cada enfermedad infecciosa específica está causada por un tipo de bacteria diferente. Estos trabajos de Koch abren definitivamente el campo de la Microbiología Médica sobre firmes bases científicas (Iañez, 1998).

Cada especie patógena tiene un espectro característico de interacciones con sus hospederos humanos. Algunos organismos, tales como *Staphylococcus* o *Streptococcus*, pueden causar infecciones de piel, neumonía, meningitis y a veces sepsis importantes, una respuesta inflamatoria sistémica en que se produce choque, vasodilación masiva y la muerte (Belland . *et al* 2004).

Finalmente, algunas especies, tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia*, y *Mycobacterium avium*, son patógenos oportunistas y causan enfermedad principalmente en la población que sufre de inmunosupresión o fibrosis quística (Heise, 1982).

A partir de 1928, cuando Fleming descubrió la penicilina, comenzó la llamada época de los antibióticos desde esa fecha en las décadas siguientes, se produjo un incremento de forma exponencial en la creación de nuevas clases de estos agentes, especialmente en países desarrollados (Hart, 1998).

La utilización terapéutica de la penicilina y otros antibióticos a partir de los años cuarenta ha puesto en manifiesto que las bacterias eran capaces de desarrollar mecanismos de resistencia y así en los años 60 ya se conocían las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a penicilina.

Los mecanismos de resistencia adquirida y transmisible son los más importantes y consisten fundamentalmente en la producción de enzimas bacterianas que inactivan los antibióticos o en la aparición de modificaciones que impiden la llegada del fármaco al punto diana o en la alteración del mismo. Una cepa bacteriana puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos por diversas especies bacterianas (Daza, 1998).

Las infecciones por bacterias multiresistentes causan una amplia morbilidad y mortalidad. Asimismo causan un mayor costo por mayor estancia hospitalaria y complicaciones. Se calcula que el costo anual en los Estados Unidos por la resistencia antibiótica es entre 100 millones y 30 billones de dólares.

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente con implicaciones sociales y económicas enormes dadas por el incremento de morbilidad y mortalidad, aumento de los costos de los tratamientos y de las largas estancias hospitalarias generadas.

Ya en el año 1947 se empezaron a detectar resistencias a la estreptomicina entre los tuberculosos, el 80% recayeron a los tres meses debido a la formación de bacilos resistentes a la estreptomicina. Un informe de la OMS en 1997 reconocía que «las cepas de microbios farmacorresistentes tienen un impacto mortal sobre la lucha contra la tuberculosis, el paludismo, el cólera, la diarrea y la neumonía; todas ellas enfermedades importantes que han matado juntas a más de 10 millones de personas el año pasado. Algunas bacterias ya resisten por lo menos a 10 medicamentos diferentes (Embid, 2008).

El hombre desde la antigüedad ha usado sustancias naturales extraídas de las plantas, como los aceites esenciales, para combatir enfermedades y preservar alimentos. Hoy en día, estas sustancias han perdido su uso debido a la aparición de sustancias químicas, no obstante, tienen la ventaja de que no representan un peligro para la vida y salud del hombre (Judd *et al*, 2002).

El uso de las plantas con fines terapéuticos en la medicina tradicional es un importante legado que han dejado generaciones anteriores y una parte de la cultura de los pueblos. Existen innumerables sustancias químicas vegetales que pueden considerarse fármacos y son empleados en uno o más países, de las cuales el 74 % fue descubierto a partir de su empleo en medicina tradicional. Por otro lado varios estudios han demostrado que los terpenoides son los principales contribuyentes de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, siguiendo en orden de actividad los terpenoides que contienen grupos alcoholes, luego los que poseen aldehídos y por último los que tienen grupos cetónicos. Por ejemplo, podemos mencionar que el aceite esencial de Zacate limón posee cantidades considerables de **-citral*, (+) - citral, citronelol, citronelal, linalool y geraniol los cuales han mostrado poseer actividad antimicrobiana ante *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. Otro ejemplo lo presenta el aceite esencial del *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) el cual está compuesto, entre otras cosas, por: -terpineol, linalool y terpinen-4-ol y demuestran tener efectiva actividad antimicrobiana (Maguna *et al*, 2006).

2 Antecedentes

2.1 Antibióticos

La actividad de un agente antiinfeccioso está definida por su espectro antibacteriano es decir el conjunto de microorganismos patógenos que se ven afectados por las concentraciones del antibiótico (Paredes y Roca, 2004).

2.1.1. Origen y definición

Antibiótico: Sustancia química producida por un microorganismo, que desarrolla una actividad antimicrobiana. Los antibióticos son medicamentos que combaten (o previenen) infecciones causadas por bacterias (Hooton y Levy, 2001).

Antimicrobiano: Es un término que incluye los compuestos obtenidos de forma natural o biosintética, así como los conseguidos totalmente en el laboratorio. Un agente antimicrobiano debe cumplir tres condiciones como mínimo: poseer actividad antimicrobiana, desarrollarla a bajas concentraciones y ser tolerado por el huésped (Mateos, 2009).

2.1.2 Actividad antiinfecciosa

Los agentes antimicrobianos se comportan de diversas maneras: como bactericidas y como bacteriostáticos

Bactericidas: Producen la muerte de los microorganismos responsables del proceso infeccioso.

Bacteriostáticos: Inhiben el crecimiento bacteriano, aunque el microorganismo permanece viable, de forma que, cuando se suspende el tratamiento, puede volver a recuperarse y multiplicarse.

El hecho de que un agente sea bactericida o bacteriostático depende de su mecanismo de acción y por tanto de su estructura, pero también contribuyen paralelamente otros factores:

- Concentración alcanzada en el sitio de la infección.
- Tipo de germen.
- Tamaño del inóculo.
- Tiempo de acción.
- Fase de crecimiento de la bacteria (Paredes y Roca, 2004).

Con estos métodos se define:

- *La concentración mínima inhibitoria (CMI)*. Es la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de 10^5 bacterias en 1 ml de medio de cultivo, después de 18-24 horas de incubación.

- *La concentración mínima bactericida (CMB)*. Es la menor concentración capaz de eliminar o matar 10^5 bacterias en 1 ml de medio de cultivo, tras 18-24 horas de incubación.
- *El punto de corte de sensibilidad*. Es la concentración de antibiótico por debajo de la cual se considera sensible una determinada especie bacteriana (Flórez *et al*, 2005).

Tabla1. Causas más habituales del fracaso del tratamiento antimicrobiano (Paredes y Roca, 2004).

Medicamento	<p>Medicamento inadecuado</p> <p>Mala absorción</p> <p>Penetración insuficiente del medicamento dentro de un sitio determinado de infección (ojos, cerebro, próstata)</p> <p>Excreción o inactivación acelerada del medicamento</p> <p>Dosis inadecuada</p> <p>Vía de administración inadecuada</p>
Patógeno	<p>Superinfección para otros patógenos</p> <p>Desarrollo de resistencia al medicamento</p> <p>Infección mixta inicialmente, sólo uno de los patógenos es detectado y tratado</p>
Huésped	<p>Defensas inadecuadas del huésped (leucopenia)</p> <p>Pus no drenado</p> <p>Retención de cuerpo extraño infectado</p>
Prueba de susceptibilidad	Informe erróneo de patógenos susceptibles

2.1.3 Mecanismos de acción de los antibióticos

Los mecanismos por los cuales los antibióticos alteran la biología de los microorganismos son los que a continuación detallamos.

1.- Inhibición de la síntesis de la pared celular: Tiene lugar en diversas fases: β -lactámicos, fosfomicina, cicloserina, vancomicina, bacitracina (Paredes y Roca, 2004). La inhibición de la síntesis de la pared bacteriana tiene habitualmente un efecto bactericida. En la primera etapa se forma el UDP-N-acetil-muramyl-pentapéptido en el citoplasma bacteriano. En la segunda etapa, se polimerizan el UDP-N-acetil-muramyl-pentapéptido y la N-acetilglucosamina que son transportados a través de la membrana citoplasmática y se unen al punto de crecimiento de la pared bacteriana.

Esta fase es inhibida por antibióticos como la vancomicina y la bacitracina. Por último, las cadenas de peptidoglicano, una vez fuera de la célula, quedan entrelazadas transversalmente y dan lugar a la formación de un polímero tridimensional, esta etapa, también conocida como reacción de transpeptidación es inhibida por las penicilinas y las cefalosporinas (Cordies, *et al.* 1998).

2.- Desorganización de la membrana citoplasmática: Polimixinas, anfotericina B y nistatina. La membrana celular constituye una barrera de permeabilidad y lleva a cabo funciones de transporte activo. Si la integridad funcional de la membrana se altera, los iones y macromoléculas se escapan y la célula se lesiona y muere. Las polimixinas son activas frente a bacterias Gram negativas y actúan como detergentes catiónicos sobre membranas ricas en fosfatidil-etanolamina (Paredes y Roca, 2004).

3.- Inhibición de la síntesis de proteínas: Por actuar sobre los ribosomas; en la subunidad 30 S: tetraciclinas; sobre la subunidad 50 S: cloranfenicol, eritromicina y lincosaminas; en ambas subunidades: aminoglucósidos. La síntesis de los ribosomas se realiza en tres etapas: iniciación, elongación, que comprende reconocimiento, transferencia y translocación, y terminación. Los aminoglucósidos se fijan irreversiblemente a la subunidad 30 S de los ribosomas e inhiben la síntesis bacteriana, interfiriendo la fijación del ARNt y distorsionando el codón de ARNm, con lo que hay una lectura equívoca del mensaje genético y una síntesis de proteínas no funcionales. Las tetraciclinas se fijan a los ribosomas de los mamíferos. El cloranfenicol, la clindamicina y la eritromicina se fijan a la subunidad 30 S. El primero inhibe una peptidil-transferasa, la segunda, la iniciación, y los macrólidos, la translocación (Yamilka y Sánchez, 2009).

4.- Antimetabolitos que bloquean la síntesis de ácido fólico Las sulfamidas inhiben la incorporación del PABA para la formación del ácido fólico, de aquí su efecto antibacteriano selectivo. Las diaminopirimidinas inhiben la dihidrofólicoreductasa e impiden el paso de ácido fólico (Ingrahomy, 1998)

Figura 3. Sitios de acción de los antibióticos

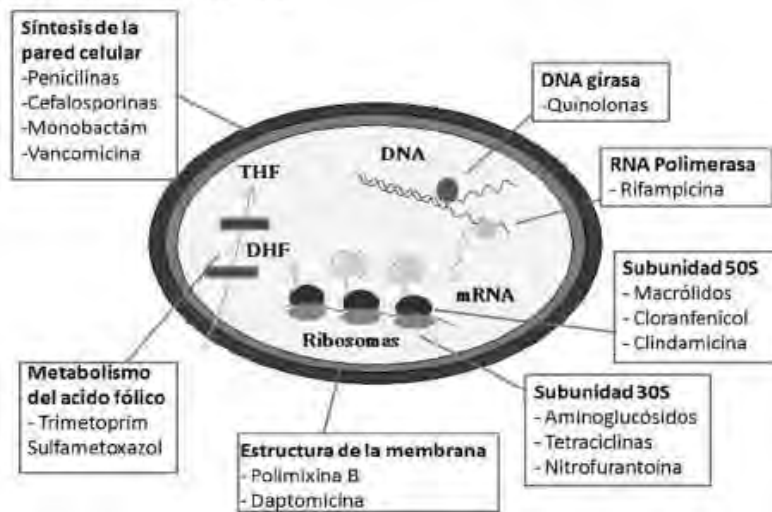


Figura 1. Mecanismo de acción de los antibióticos en bacterias (Tafur *et al*, 2008).

2.1.4 Resistencia bacteriana

Hay bacterias que no son afectadas por ningún antibiótico, bien porque carecen del sitio de acción debido a que la bacteria presenta resistencia natural.

Otras especies son sensibles al antibiótico, pero ello no impide que en determinadas ocasiones se aíslen variantes que no lo son y que crecen normalmente en presencia del antibiótico. En este caso se habla de resistencia adquirida.

Mecanismos generales de resistencia a antibióticos

Los mecanismos por los que se producen resistencias se pueden agrupar en los siguientes:

- Alteraciones de las membranas bacterianas: se ve fundamentalmente en Gram negativos, donde la membrana externa de la envoltura celular rica en lípidos es impermeable a las sustancias hidrofílicas. De este modo dichas sustancias quedan confinadas a la penetración a través de proteínas transmembrana con función de porinas. Existen algunas moléculas de antibiótico, como penicilina y vancomicina, que por su tamaño son incapaces de pasar a través de las porinas de bacilos Gram negativos. La disminución de la expresión de dichas porinas puede disminuir el flujo de llegada del antibiótico al espacio periplásmico. Se considera que en este caso los niveles de resistencia alcanzados no suelen ser suficientes como para conferir resistencia absoluta a un antibiótico.

- Expulsión del antibiótico por un mecanismo activo de bombeo. La tetraciclina se expulsa de forma activa del interior de bacterias resistentes. Es por la posición de un sistema de expulsión activa del antimicrobiano, una especie de bomba expulsora que utilizan las bacterias para la excreción de productos residuales o tóxicos, con la que puede eliminar además muchos de estos agentes antibacterianos
- Modificación del sitio de acción del antibiótico. La metilación del ARN 23S en una posición determinada da lugar a resistencia a los macrólidos, que no pueden fijarse en el ribosoma y producir así su efecto inhibitorio. existen diversas estrategias para alcanzar este objetivo, como por ejemplo las alteraciones en las PBP de *Streptococcus pneumoniae* que confiere resistencia a penicilina e incluso a ceftriaxona; la adquisición de genes que modifiquen para sustitutos de los blancos originales (Paredes y Roca, 2004).

2.2 Antecedentes de los extractos naturales

El uso de las plantas con fines terapéuticos en la medicina tradicional es un importante legado que han dejado generaciones anteriores y una parte de la cultura de los pueblos. Existen innumerables sustancias químicas vegetales que pueden considerarse fármacos y son empleados en uno o más países, de las cuales el 74 % fue descubierto a partir de su empleo en medicina tradicional.

Esto nos brinda la oportunidad de encontrar nuevos agentes activos desde el punto de vista farmacológico, a partir de una fuente de materia prima más económica y natural: las Plantas medicinales.

Actualmente es enorme la difusión y popularidad de las terapias vegetales en el mundo. Se aconsejan ya no como alternativas en los servicios de salud, sino como primera intención para diversas afecciones, antes de pasar a otros medicamentos más agresivos. Varios estudios reportan sobre las diferentes actividades biológicas que presentan los aceites esenciales, tales como insecticidas, antioxidantes y el efecto antibacteriano. Sin embargo se ha encontrado que la actividad antimicrobiana presentada por los aceites esenciales es debida, en gran medida a la presencia de compuestos denominados “terpenoides, fenilpropanoides, azufrados, flavonoides, ácidos” (Maguna *et al.* 2006).

2.2.1 Posible mecanismo de acción de los extractos naturales

Los terpenos se encuentran en la mayoría de los organismos, pero constituyen el grupo más abundante de los aceites vegetales, de hecho son los responsables de los aromas y sabores específicos de las plantas, mientras mayor sea la cantidad de oxígeno en la molécula, mayor será

su aroma. Estos compuestos, se forman a partir del isopreno (unidad de 5 átomos de carbono); pueden contener desde una hasta seis mil unidades. Las unidades pueden arreglarse linealmente (como en el escualeno) o cíclicamente (como en la limonina). Dentro de los terpenos se clasifica a los *carotenoides* que son tetraterpenos muy importantes en los mamíferos, especialmente el β -caroteno que es precursor de la vitamina A (11-cis-retinal). También las vitaminas liposolubles D (colecalciferol) y K son consideradas como terpenos (Vázquez, 2003).

Varios estudios han demostrado que los terpenoides son los principales contribuyentes de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, siguiendo en orden de actividad los terpenoides que contienen grupos alcoholes, luego los que poseen aldehídos y por último los que tienen grupos cetónicos. Por ejemplo, podemos mencionar que el aceite esencial de *Zacate de limón* posee cantidades considerables de citral, citronelol, citronelal, linalool y geraniol los cuales han mostrado poseer actividad antimicrobiana ante *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. Otro ejemplo lo presenta el aceite esencial del *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) el cual está compuesto, entre otras cosas, por: terpineol, linalool y terpinen-4-ol y demuestran tener efectiva actividad antimicrobiana (Maguna *et al.* 2006).

2.3 Microscopio electrónico de transmisión

El microscopio electrónico de transmisión es un equipo complejo que funciona al alto vacío en donde la imagen está dada por los electrones transmitidos a través de la muestra, por ello se requiere que sea de un grosor menor a 100nm para obtener una buena resolución. Sin embargo debido a la interacción de los electrones de alta energía, la muestra requiere estar protegida con metales pesados para que soporten dicha interacción; las muestras que requieran ser observadas deben cumplir las siguientes características: ningún material vivo o que contenga agua, porque el sistema funciona al alto vacío; además se debe proteger contra el haz de electrones.

Para la preparación de las muestras para MET es necesario tener una serie de cuidados ya que esta requiere de gran precisión para que los resultados sean correctos, empezando con el tipo de fijador, el amortiguador, el posfijador y los solventes para la deshidratación; el tipo de membranas, de resinas para la inclusión, dependiendo de las características propias de cada muestra, se ajustara lo pertinente para estudiar la muestra en MET.

2.3.1 Tinción negativa

Al manejar muestras de tejidos para obtener en el microscopio electrónico un buen contraste, esto se puede conseguir tratando a estos con colorantes electrónicos; por ejemplo, el ácido

fosfotúngstico revelo ser un buen colorante electrónico de tipo general que resultaba mejor en las estructuras proteínicas.

El elemento activo del ácido fosfotúngstico es el tungsteno (PM 183.92) con las características especiales de que este compuesto se asocia en cada molécula de 24 átomos de carbono. Por su gran peso molecular las tinciones electrónicas denotan gran resistencia al bombardeo del haz de electrones en el microscopio electrónico.

La técnica de tinción negativa constituye la principal metodología para un rápido diagnóstico, por ejemplo de un virus, debido a que estos son identificados principalmente por su morfología. Las rejillas cubiertas con membranas Formvar o Parlodión ofrecen un soporte estable para las muestras teñidas negativamente (González *et al*, 2003).



Figura 2. Microscopio Electrónico de transmisión. (Ojeda, 1997)

2.4 Bacterias GRAM (+) y GRAM (-)

Gram (+)

2.4.1 *Staphylococcus aureus*: En Estados Unidos se estima en 300.000 el número de personas que contraen anualmente una infección por el SARM, durante su estadía en un centro de salud. De acuerdo con los datos del Centro de Control de Enfermedades, el número de muertos asciende a unos 12.000 cada año. El *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, continúa siendo un problema en muchos centros de salud. Esta bacteria es causante principalmente de infecciones en la piel, pero desde 1960 ha sido un común patógeno nosocomial, puede causar infecciones serias como; infección de heridas quirúrgicas, bacteriemias, endocarditis, neumonía, infección de partes blandas, infección de vías urinarias, en pacientes hospitalizados (Solís, 2008).

Cada año se incrementan los reportes que mencionan las infecciones estafilocócicas como causa principal de muerte, y en países como Inglaterra, la incidencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina se ha incrementado del 8% en 1993 al 44% en 1998. Se ha evidenciado también que la

mortalidad ha sido mayor en hombres y en personas de la tercera edad que en el resto de la población (Crowcroft y Catchpole, 2002).

2.4.2 *Staphylococcus epidermidis*: Las bacterias poseen una capa externa de polisacáridos que se adhieren firmemente al plástico, lo que también contribuye a impedir la penetración de los antibióticos. Causan infección en las heridas. Se ha aislado en válvulas cardíacas prostéticas, prótesis ortopédicas y catéteres intravenosos (Lancet, 2006).

2.4.3 *Streptococcus agalactiae*: Actualmente es la principal causa de sepsis neonatal. En adultos, las infecciones por el EGB se presentan, generalmente como formas que complican otras patologías en particular, la diabetes, las hepatopatías, el cáncer, las alteraciones neurológicas y la insuficiencia cardíaca o renal. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son las infecciones de piel y tejidos blandos, la bacteriemia sin foco séptico evidente, la endocarditis, las infecciones del tracto urinario, la meningitis y las infecciones osteoarticulares (Fraile y Cueto, 1998).

La prevalencia de colonización materna por EGB en el momento del trabajo de parto; es muy variable alrededor del mundo. Se estima que en EE.UU e Inglaterra esta cifra es cercana al 20%, en Dinamarca es alrededor del 10%, y en España del 15%. Entre las cifras publicadas de países en desarrollo figuran la India con un 5%, Colombia con un 2%, Perú con un 8% y en Argentina del 15 al 18 %. La mortalidad causada por la infección neonatal temprana por EGB en recién nacidos; esta cifra varía en nuestro país entre el 5 y el 20% (Minig y Izbizky, 2004).

2.4.4 *Streptococcus faecalis*: es el patógeno humano más frecuente representando el 60% al 90% de los aislamientos clínicos. Es la segunda especie aislada en frecuencia, representando el 5% al 16% de los aislamientos clínicos.

El National Nosocomial Infections Surveillance System (NNIS) ha informado que el género enterococo es la tercera causa más frecuente de infecciones nosocomiales, siendo responsable del 10% de todas las infecciones nosocomiales (Acosta, 2005).

2.4.5 *Bacillus subtilis*: Comúnmente encontrada en el suelo tiene la habilidad para formar una resistente endospora protectora, permitiendo al organismo tolerar condiciones ambientalmente extremas. No es considerado patógeno humano; sin embargo puede contaminar los alimentos, pero raramente causa intoxicación alimenticia, sin ser patogénica, es capaz de generar las respuestas de resistencia sistémica asociadas normalmente a la presencia de un patógeno (Padrón *et al*; 2003).

GRAM (-)

2.4.6 *Salmonella typhi*: La incidencia nacional en Alemania se situó en 0,1 infecciones por 100.000 habitantes. Alrededor del 86% de los casos provenían de países como India, Paquistán, Turquía o Marruecos. Asimismo, se ha observado un claro retroceso de la incidencia de infecciones paratíficas en los últimos decenios (Lode y Stahlmann *et al*, 2006).

La fiebre tifoidea prevalece principalmente en países en vías de desarrollo, donde normalmente significa un reto a las autoridades en salud pública. Hay aproximadamente 17 millones de casos anuales con casi 600,000 muertes, principalmente en Asia y África. Las más altas incidencias se encuentran en Indonesia y en algunos puntos del sureste asiático, como Papua Nueva Guinea, en donde puede alcanzar niveles de 103 por cada 100,000 habitantes.

En México, la incidencia es cien veces menor a la de Indonesia, o sea de 10 por cada 100,000 habitantes. De hecho, de 1989 a 1993, la incidencia disminuyó a la mitad, coincidiendo con las campañas del sector salud para la prevención del cólera. El grupo etario más afectado es el de adultos jóvenes, de 19 a 44 años de edad. Ciertamente, las diferencias en incidencia y en grupos de edad afectados son problemas de interés para la epidemiología, cuya resolución involucra la mejor comprensión de los modos de transmisión y sobrevivencia de la bacteria en el ambiente, el conocimiento más profundo de la respuesta inmunológica del hospedante y de las posibles variaciones genéticas entre los aislados clínicos de *S. typhi* (Calva, 2001).

2.4.7 *Escherichia coli*: es el microorganismo que con mayor frecuencia ocasiona infecciones del tracto urinario (ITU). Se le considera responsable del 90% de todas las infecciones urinarias y del 78 a 80% de la etiología de estas infecciones en niños (Villarroe *et al*, 2002).

El país que tiene mayor número de casos es Canadá. Por lo que respecta a España, la incidencia es muy inferior a la existente en otros países, siendo muy escasos los brotes descritos en nuestro país (Margall *et al*, 1997; Blanco *et al*, 1993).

De acuerdo con las últimas estadísticas presentadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades de transmisión alimentaria son de 300 a 350 veces más frecuentes. Entre los principales patógenos involucrados en estas enfermedades se encuentran *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.*, que junto con *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* y *Toxoplasma gondii*, son causantes de 3,3 a 12,3 millones de casos en Estados Unidos y de alrededor de 3900 muertes. A esto se suman los altos costos para el sector salud, que ascienden los treinta mil millones de dólares al año (Tremino *et al*, 2003).

2.4.8 Klebsiella pneumoniae: Ocasionalmente produce infecciones en las vías urinarias o enteritis en los niños. La resistencia a ampicilina y carbenicilina se ha mantenido a lo largo de la década en cifras superiores al 90% (entre el 90 y el 98%, con coeficientes de correlación cercanos a 1 y $p < 0,001$). Estos resultados demuestran la ineficacia de estos antibióticos para el tratamiento de infecciones por *K. pneumoniae*, y consideramos que deberían ser eliminados del antibiograma para este patógeno (Pérez *et al.* 2001).

Se estima que el género *Klebsiella* es el responsable del 8% de las infecciones nosocomiales bacterianas en los Estados Unidos y en Europa, lo cual lo sitúa entre los ocho patógenos infecciosos más importantes en hospitales. *Klebsiella pneumoniae* causa, principalmente, infecciones del tracto urinario y neumonías siendo el segundo agente causal, después de *E. coli*, de septicemias nosocomiales por bacterias Gram negativas (Izquierdo, 2003).

2.4.9 Pseudomonas aeruginosa: De acuerdo a distintas fuentes bibliográficas es responsable del 17% de las neumonías asociadas a el uso de ventiladores, 11% de infecciones del tracto urinario, y 3.8% de bacteriemias primarias en las unidades de cuidados intensivos de adultos. Sin embargo en las unidades de pacientes quemados *la P. aeruginosa*, es causa del 21.5% de las neumonías; 20% de las infecciones urinarias y 9% de las bacteriemias primarias.

Estas infecciones pueden afectar a muchas partes del cuerpo, pero típicamente afectan las vías respiratorias, causando 50 % de las pulmonías bacterianas nosocomiales (Salazar *et al.*, 2002).

De acuerdo a cifras del CDC, la incidencia de infecciones por *P. aeruginosa* en hospitales de Estados Unidos de Norteamérica alcanza a 0,4% de los egresos totales y provoca 10,1% de todas las infecciones nosocomiales. Es por ello reportada como el agente etiológico de 16% de las neumonías, 12% de las infecciones del tracto urinario y 8% de las infecciones postquirúrgicas. Según datos del MINSAL, en Chile, *P. aeruginosa* es el microorganismo más frecuentemente aislado en neumonías nosocomiales asociadas a ventilación mecánica en UCIs pediátricas, 30,6%, y el tercero en unidades de cuidados intensivos de adultos, donde representa 18,5% de los casos. Es también un importante agente causal de infecciones del tracto urinario en servicios quirúrgicos, de medicina interna y en UCIs (Zambrano *et al.*, 2004).

2.5 Citronela



Figura 3. *Cymbopogon nardus*

Tabla 2. Ficha de taxonomía

Citronela	
<u>Clasificación científica</u>	
<u>Reino:</u>	<u>Plantae</u>
<u>División:</u>	<u>Magnoliophyta</u>
<u>Clase:</u>	<u>Liliopsida</u>
<u>Subclase:</u>	<u>Commelinidae</u>
<u>Orden:</u>	<u>Poales</u>
<u>Familia:</u>	<u>Poaceae</u>
<u>Subfamilia:</u>	<u>Panicoideae</u>
<u>Tribu:</u>	<u>Andropogoneae</u>
<u>Género:</u>	<u><i>Cymbopogon</i></u>
<u>Especie:</u>	<u><i>nardus</i></u>
<u>Nombre binomial</u>	
<i>Cymbopogon nardus</i> (L.) Rendle	

2.5.1 Descripción: Hierba de 30-90cm de altura, glabra; tallo erguido y delgado. Hojas planas, alargadas, formando una vaina a nivel de los nudos. Fruto tipo cariósipide, glabro, oblongo y plano.

2.5.2 Origen: es una planta natural de Ceilán (país insular ubicado al sureste de India en Asia) y la costa Malabar (región al sur de la India), naturalizada en otros lugares como América y África. Tiene características y propiedades semejantes a *Cymbopogon citratus* y de la que también se obtiene aceite esencial de Citronela (Romero y Goldsmidt, 2004).

2.5.3 Parte útil: Las hojas contienen aceite principalmente y a este se deben sus aplicaciones. Es un aceite esencial, líquido amarillo o amarillo parduzco que en contacto con el aire toma una coloración verdosa. El olor recuerda al del limón y la melisa (*Melisa officinalis* L.).

Los principales componentes son el citronelal, geraniol, l-limoneno, canfeno, dipenteno, citronelol, borneol, nerol, metileugenol, etc.

2.5.4 Extracción: Su aceite esencia se obtiene a través de la destilación al vapor de agua sin presión.

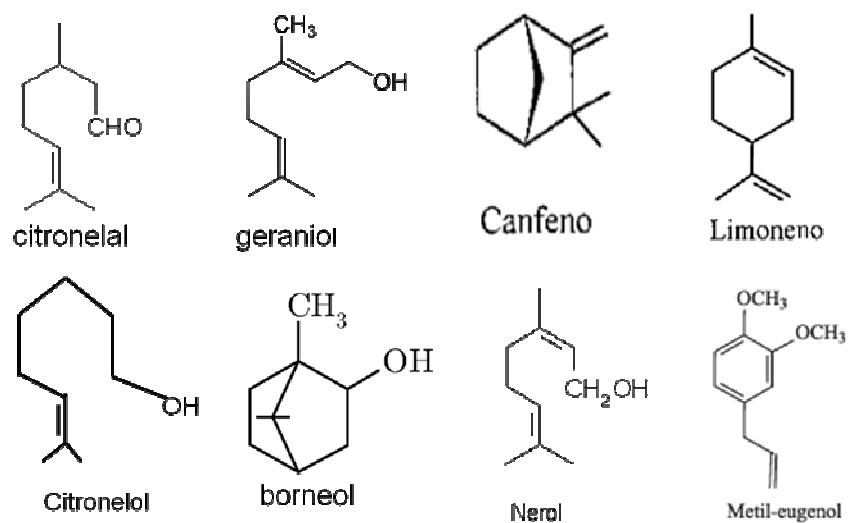


Figura 4. Principales componentes de *Cymbopogon nardus*

2.5.5 Historia y simbología: Originaria de Sri Lanka, se puso de moda en el siglo XIX. Los primeros envíos de aceite a Europa recibieron el nombre de “Oleum Siree”. Sri Lanka fue el centro principal de producción hasta 1890, cuando Java empezó a elaborar aceite tal vez de mejor calidad. Contenía más cantidad de geraniol (alcohol) y poseía un olor más intenso pero al parecer el Aceite de Sri Lanka se adulteraba para reducir su precio. Durante cierto tiempo fue ingrediente habitual de cera para velas porque repele a los mosquitos. Se utilizaba con profusión en perfumería, jabones, lociones para la piel, barnices, detergentes y cosméticos desodorantes. Presta un aroma interesante a algunos platos chinos.

2.5.6 Usos: Ha sido utilizada en la medicina india para tratar infecciones y fiebre. Investigaciones recientes demostraron que también actúa como sedante del sistema nervioso. Sus vapores ayudan a combatir la fatiga, aclaran y animan la mente, dolores de cabeza, migrañas y neuralgia así como también contribuye al alivio de estados de depresión. Tiene propiedades antibacteriales, antisépticas y desodorantes. También es utilizada como insecticida parasiticida y antipolilla. Efectiva para regularizar la excesiva transpiración como así también la piel y cabello grasos. Es posible que actúe como tónico general del organismo, equilibrando el corazón y estimulando el sistema nervioso. Ayuda a aliviar dolores gastrointestinales incluyendo cólicos estomacales. Se encuentra en foma de pomada e infusión.¹

¹ <http://www.femeninas.com.ar/citronela.asp>

3 Justificación

El uso indiscriminado de los antibióticos en la práctica médica ha provocado, el desarrollo de cepas bacterianas resistentes. Por tal motivo en los últimos años se ha incrementado el interés por el uso de sustancias naturales en la industria de alimentos, cosmética y farmacéutica. Entre ellas, los aceites esenciales (componentes volátiles) y, principalmente, las oleorresinas (componentes no volátiles) de plantas (Ludemann *et al* ,2007); en el cual los gastos no son tan elevados en la investigación y los efectos adversos mínimos. En tal sentido, lograr que la población disponga de fitofármacos (medicamentos que contienen como principio activo exclusivamente plantas) rigurosamente estudiados, es un propósito de muchos investigadores por ello en este trabajo se decidió probar la actividad antimicrobiana in vitro del extracto de *Cymbopogon nardus* frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos que son causantes de diversas patologías en el hombre.

3.1 Objetivos

3.2 Objetivo general

- ✚ Comprobar si existe algún efecto antimicrobiano del extracto de Citronella (*Cymbopogon nardus*) en las diferentes bacterias que comúnmente se asocian a infecciones de heridas humanas: *Salmonella typhi*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia Coli*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando el método de Mossman y Microscopía Electrónica de Transmisión.

3.3 Objetivos particulares

- ✚ Identificar por tinciones y pruebas bioquímicas la presencia de las bacterias: *Salmonella typhi*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia Coli*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- ✚ Tratar el extracto acuoso de Citronella, esterilizándolo a través de filtros con membranas de 0.4 µm y 0.22 µm. Y concentrarlo hasta sequedad total para obtener la concentración inicial de trabajo.
- ✚ Realizar ensayos extracto-bacterias antes mencionados por medio de la técnica de microdilución en placa (método colorimétrico de Mosmann).

- ✚ Determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida.
- ✚ Conocer por medio del Microscopia Electrónica de Transmisión, el efecto del extracto en las bacterias.

3. 4 Hipótesis

Si el extracto de Citronela presenta actividad antimicrobiana “in vitro” contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas entonces podemos proporcionar una alternativa medicinal confiable para la elaboración de fitofármacos en heridas e infecciones humanas.

4 Material

Para el estudio experimental in vitro las bacterias fueron facilitadas por el ceparió del laboratorio numero 10 de Microbiología Experimental (Posgrado), FES-Cuautitlán Campo1.

4.1 Cepas bacterianas utilizadas

Salmonella typhi

Streptococcus agalactiae

Streptococcus faecalis

Escherichia coli

Bacillus subtilis

Klebsiella pneumoniae

Staphylococcus epidermidis

Staphylococcus aureus

Pseudomonas aeruginosa

4.2 Extracto a evaluar

Extracto etanolito de citronela fue donado por EXTRACTOS SIGMA

4.3 Equipo de laboratorio

Autoclave (All American Model 1952X)

Bomba de vacio (HOLFMANN PINTHER Modelo 0210)

Campana de flujo laminar (VELO)

Centrifuga Dynac

Estufa bacteriológica (RIOSSA)

Horno Pasteur (RIOSSA Modelo HS-41)

Microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM 100S)

Microscopio óptico (Olympus Model CHS)

Parrilla eléctrica (NUOVA II)

Refrigerador (IEM)

Vortex (SCIENTIFIC INDUSTRIES)

4.4 Material general de laboratorio

Asas de platino

Cajas Petri (Pyrex)

Cinta adhesiva.

Cristalizador (Pyrex)

Embudo de vidrio

Espátula y gradillas

Filtro de bola

Frasco ámbar con tapón de rosca estéril de 10 ml

Guantes estériles

Hisopos estériles

Marcado indeleble

Matraces Erlenmeyer de 250 ml y 1 lt (Pyrex)

Mechero bunsen

Membrana de celulosa 0.22, 0.45 μ l. (Millipore)

Micropipeta de 100 μ l (SAMPLER SYSTEM)

Papel aluminio

Papel filtro (Whatman)

Parafil.

Pipetas graduadas estériles de 10 ml (Kimax)

Pipetas volumétricas estériles de 2 ml (Kimax)

Puntas estériles para micropipeta de 100 μ l

Tubo de ensaye con tapón de rosca estériles de 10 ml (Kimax)

5 Metodología

5.1 Esterilización del extracto Citronela:

1. Con el filtro de bala (funciona con una bomba de vacío) y una membrana de 0.4 μm no estéril, se filtró el extracto con la finalidad de limpiar impurezas y facilitar la obtención del extracto Citronela, estéril (*Cymbopogon Nardus*).
2. El extracto obtenido se recibió en un frasco.
3. Se filtró el extracto con membrana de .22 μm estéril.
4. Se recibió el extracto en un frasco estéril sucesivamente se tapó y se etiquetó.
5. En la campana de flujo laminar se vació en cajas Petri para someterlo a deshidratación.
6. En la estufa se colocaron las cajas Petri estériles con el extracto a 37°C - 45°C, hasta sequedad para obtener los cristales puros y estériles.
7. Se pesaron los cristales, para obtener el rendimiento y por ende tener la concentración.
8. Se Disolvieron los cristales con Dimetilsulfoxido (DMSO) y se llevaron a un aforo de 10 ml con solución salina fisiológica, estéril.

5.1.1 Prueba de esterilidad:

Se realiza para comprobar que el extracto no estaba contaminado.

- En una caja de agar de BHI en forma masiva se sembró el extracto, incubo en la estufa a 37°C en un lapso de 24 horas.

5.2 Actividad biológica en las bacterias

1. Para el proceso de estandarización de cada una de las bacterias al 0.5 Nefelómetro de Mc Farland se realizo lo siguiente:
 - En nueve tubos de ensayo, colocar 2 ml de caldo BHI.
 - En cada tubo, agregar una asada de las 9 bacterias.
 - Agitar los tubos en el vortex.
 - Compararlos tubos con el tubo 0.5 del Nefelómetro de farland.
2. Con un hisopó se sembraron en 9 cajas Petri con agar BHI de forma masiva, las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Estaphylococcus aureus*, *Estaphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Estreptococos agalactiae*,

Streptococcus faecalis y *Pseudomonas aeruginosa*; previamente estandarizadas al 0.5 Nefelometro de Mc Farland con caldo BHI.

3. Agregar 1 gota del extracto a cada caja, con una micropipeta.
4. Incubar durante 24 horas en una estufa a 37°C. Esto se hace con la finalidad para comprobar si realmente el extracto posee alguna actividad biológica en las bacterias antes mencionadas.

5.2.1 Procedimiento para la concentración mínima inhibitoria, del extracto Citronela:

Por último se probó la actividad biológica del extracto en una microplaca, el procedimiento fue el siguiente

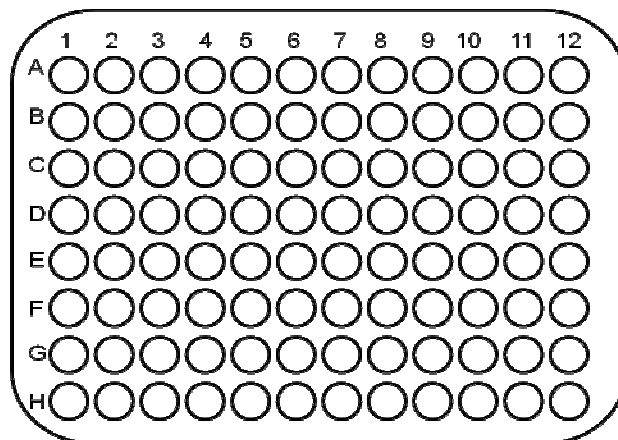


Figura 5. Microplaca

1. Al pozo 1 agregar 100µl de extracto concentrado
2. Al pozo 2 agregar 100 µl de extracto concentrado, mas 100 µl de solución salina fisiológica estéril.
3. A partir del pozo 2 realizar diluciones dobles (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 1/128 y 1/256), en los pozos 3 al 9.
4. En los pozos 3 al 9 agregarle 100µl de solución salina fisiológica.
5. Esto es con la finalidad de realizar diluciones para probar el extracto *Cymbopogon nardus* y su actividad biológica a diferentes concentraciones.
6. Agregar del pozo 1 al 9 100 µl de Caldo BHI (doble concentración) con la respectiva bacteria estandarizada al 0.5 de Nefelómetro de Mc Farland.
7. A el pozo 10 agregarle 200 ul de BHI con bacteria estandarizada al 0.5 Nefelómetro de Mc Farland. El cual va a ser el control positivo.

8. A el pozo 11 agregarle 100 μ l de BHI más 100 μ l de solución salina fisiológica. Control negativo.
9. A el pozo 12 agregarle 100 μ l de BHI más 100 μ l de extracto. Corresponde al blanco.
10. Este procedimiento se hace con cada una de las bacterias y por duplicado, es decir por ejemplo en el pozo a y b le corresponde la bacteria *E. Coli*, para el pozo c y d la bacteria *Salmonella typhi* y así sucesivamente con las 9 bacterias con las que se trabajaron.

5.2.2 Prueba bactericida y bacteriostática

1. Se colocaron las microplacas en la estufa a temperatura 37°C por 24 horas.
2. Se realizó la lectura visual después de las 24 horas.
3. Posteriormente se agrego a los pozos el reactivo MTT e incubarlo en la estufa bacteriológica de 30 a 60 minutos, realizar lectura visual cuando los controles positivos den reacción con las bacterias.
4. Se dividió una caja Petri con BHI en 12 partes, tomar una asada de los pozos y sembrarlos en las divisiones de la caja Petri y así con las 9 bacterias.
5. Se incubo las cajas en la estufa por 24 horas y observar si hubo o no inhibición de las bacterias por parte del extracto. (Se realiza antes de agregarle el reactivo MTT)

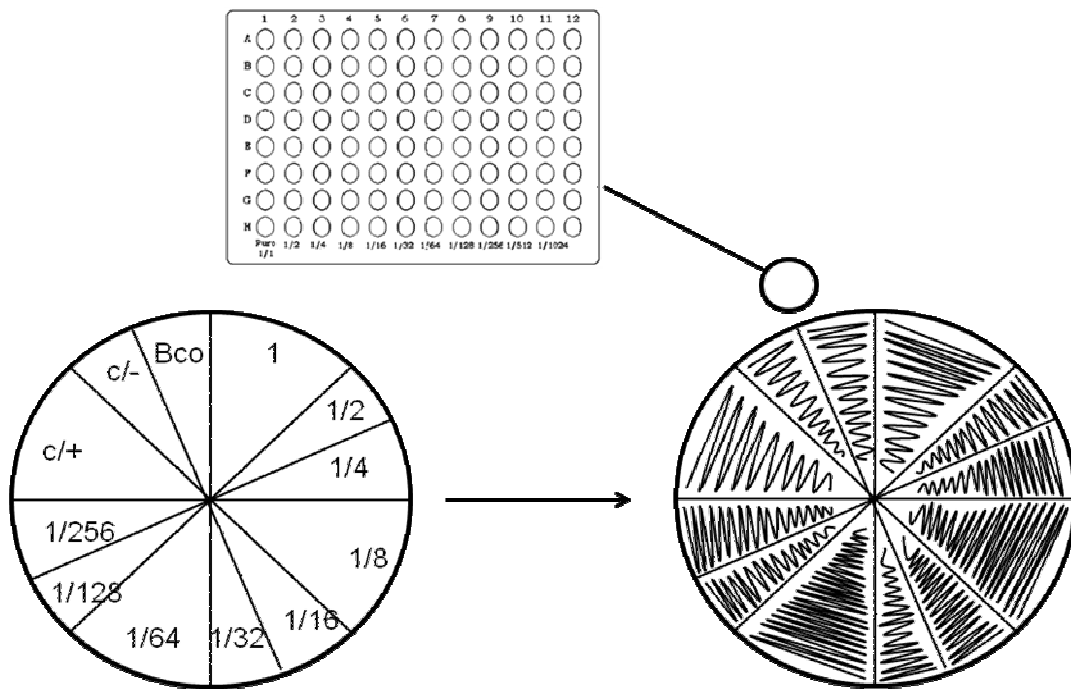


Figura 6. Prueba bactericida o bacteriostática

5.3 Técnica de Mosmann cuantitativamente

- Se seleccionaron 4 bacterias (en base a los resultados obtenidos, en la prueba cualitativa) como son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* por último *Staphylococcus aureus*.
- Sembraron en una microplaca realizando el procedimiento antes mencionado. Se Dejaron incubar por 24 horas, agregarle el reactivo de MTT y leer la absorbancia del las bacterias en el ELISOMETRO.

5.4 Microscopio Electrónico de Transmisión

5.4.1 Preparación de las bacterias para el MET

- Estandarizar, las bacterias *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus faecalis* y *Salmonella typhi*, deben tener un crecimiento de 24 horas en tubos con caldo BHI estéril a 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland.
- En los tubos estériles se colocaron cada uno de las bacterias antes mencionadas.

Tabla 3. Procedimiento para MET. En los tubos: problema, control positivo y control negativo.

Tubo problema	3ml de BHI a doble concentración con bacteria estandarizada + 3ml del extracto Citronela.
Tubo control positivo	3ml de BHI a doble concentración con bacteria estandarizada + 3ml SSF
Tubo control negativo	6ml del extracto Citronela.

- Se incubaron los tubos por 24 horas en la estufa a 37°C.
- Se centrifugaron los 9 tubos a 2500rpm durante 15 minutos, retirando el sobrenadante y se resuspendio la pastilla en 3ml de SSF estéril. Repetir esta paso 2 veces más, hasta que el sobrenadante esta transparente.
- Se Centrifugo a 2500 rpm durante 15 minutos y se desecho el sobrenadante posteriormente se agrego a cada tubo 3ml del reactivo Karnosky y dejar reposar durante una hora.
- Se centrifugo a 2500 rpm durante 30 minutos y se elimino el sobrenadante por último se resuspendió la pastilla en 3ml de SSF.
- Se etiquetaron las tubos: la muestra problema, el control +, y control -.
- Los tres tubos se incubaron a 37°C durante 24 horas.
- La muestra debe tener 10^6 - 10^7 UFC/ml, igualado al estándar 0.5 de Mac Farland.

Para el caso de *Salmonella typhi*, se redujo a la mitad el tiempo de centrifugación y las rpm en todos los pasos antes mencionados, porque se puede perder sus características morfológicas como los flagelos.

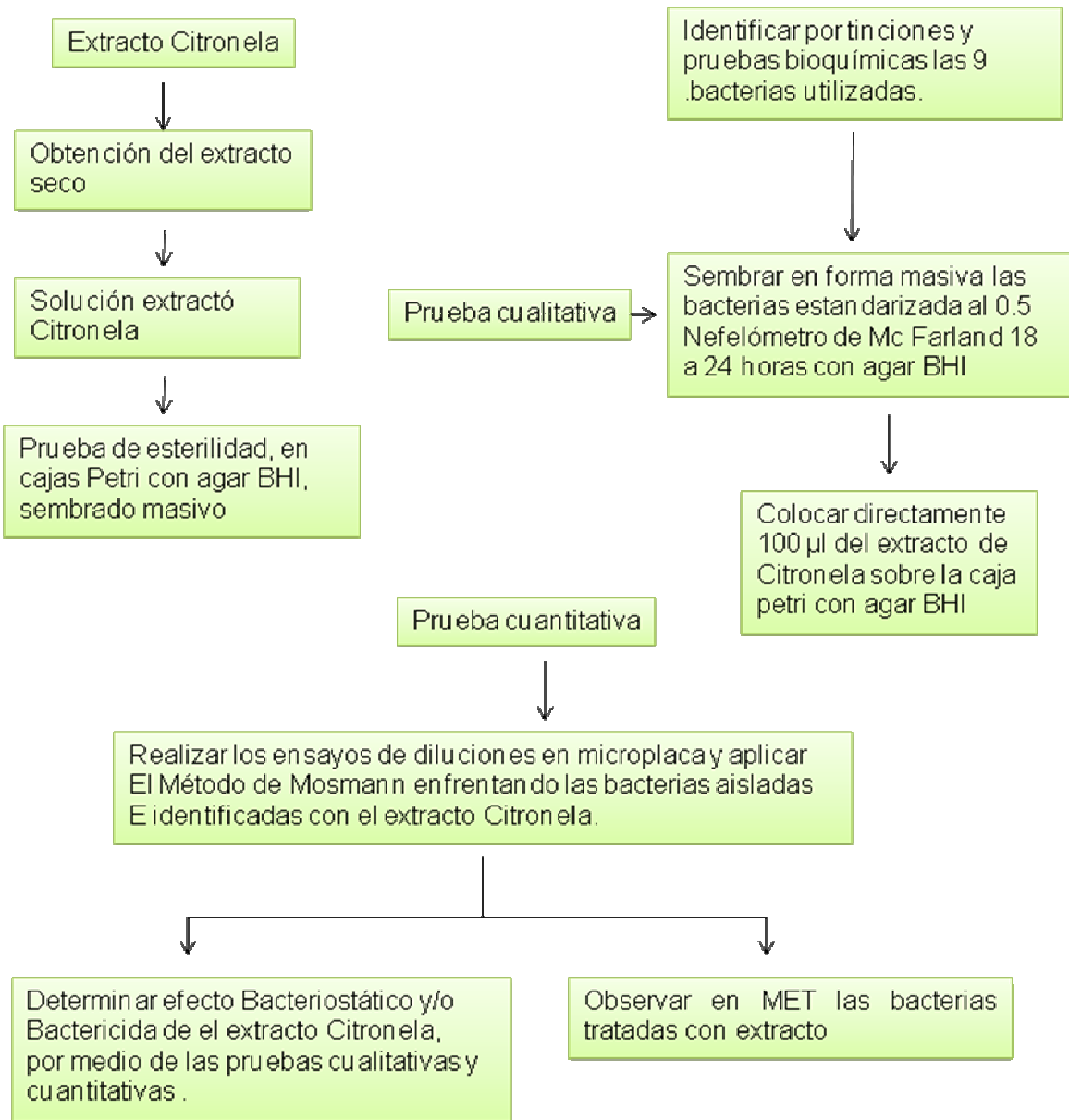
5.4.2 Preparación de las rejillas con membranas fomvar.

1. Lavar las rejillas con acetona.
2. Se preparo una solución fomvar al 1% con cloroformo, si se hace con Parlodión, se prepara 1% de Parlodión en acetato de amilo
3. Se coloco la solución en un vaso de precipitado de un litro agua destilada.
4. Se impregno un portaobjetos con fomvar y se dejo reposar hasta que se seque la película
5. Se cortaron las 4 orillas del porta y sobre baño María/ con agua destilada sumergir poco a poco hasta separar la película plástica.
6. Se colocaron las rejillas sobre la membrana y se recogieron con papel filtro.

5.4.3 Técnica de Tinción Negativa

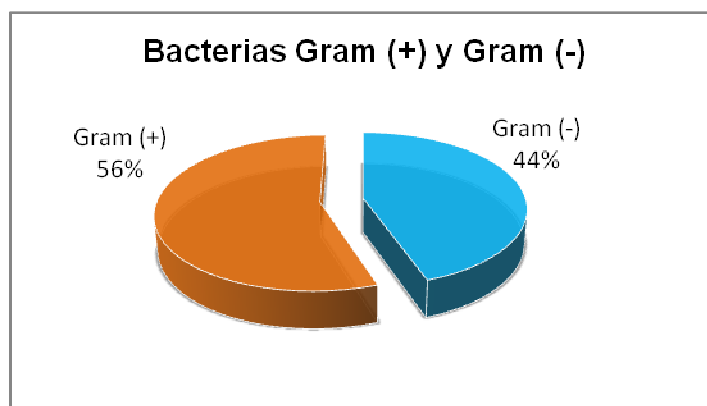
1. Se coloco una gota de suspensión bacteriana preparada para MET sobre papel parafilm y se coloco 2 rejillas con membrana para que se absorba la muestra, el cual puede ser de 5 a 20 minutos.
2. Se quito el excedente de la suspensión con ayuda de un papel filtro.
3. Se tomaron las rejillas y se lavaron con SSF, el exceso de agua eliminarlo absorbiéndolo con papel filtro.
4. Teñir durante 1 minuto con ácido fosfotungstico (solución al 1% con pH=7.2) durante 5 a 30 minutos.
5. Nuevamente se lavaron las rejillas con SSF se absorbio el exceso de colorante y se secaron a temperatura ambiente o en estufa 37°C.
6. La muestra está lista para observar en el Microscopio Electrónico de Transmisión. JEOL JEM 100S, y fotografiar las muestras en las magnificaciones de 10 000.

5.5 Diagrama general de trabajo



6 Resultados

6.1 Identificación de bacterias



Gráfica 1. De las nueve bacterias que se utilizaron para determinar la mínima concentración inhibitoria con el extracto *Cymbopogon nardus* son: Gram positivas, *Bacillus subtilis*, *Estaphylococcus aureus*, *Estaphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus faecalis* (55.55%) y Gram negativas, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhi* (44.44%).

6.2 Prueba de esterilidad del extracto Citronela

No se presentó crecimiento bacteriano, en el agar BHI, después de realizar el sembrado masivo del extracto *Cymbopogon nardus* (54.19 $\mu\text{g/ml}$) en incubado a 37°C por 24 a 48 horas.



Figura 7. Sembrado masivo concentración de 54.19 $\mu\text{g/ml}$ del extracto *Cymbopogon nardus*, en agar BHI.

6.3 Prueba cualitativa

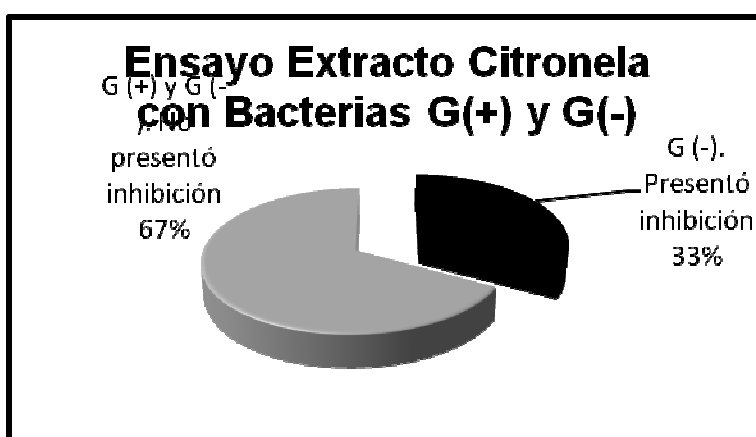
De las 9 (100%) bacterias utilizadas sólo se presentó, inhibición en 3 bacterias (33.33%), *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y por último *Pseudomonas aeruginosa*; al confrontar el extracto (54.19µg/mL) con dichas bacterias. En las demás bacterias que son *Escherichia coli*, *Estaphylococcus aureus*, *Estaphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus faecalis*, no se presento inhibición.

Tabla 4. Prueba cualitativa realizadas en las nueve bacterias.

Bacterias Gram (+)	Inhibición del extracto Citronela (54.19 µg/ml)	Bacterias Gram (-)	Inhibición del extracto Citronela (54.19 µg/ml)
<i>Bacillus subtilis</i>	No presentó	<i>Escherichia coli</i>	No presentó
<i>Staphylococcus aureus</i>	No presentó	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Si presentó
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	No presentó	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Si presentó
<i>Streptococcus agalactiae</i>	No presentó	<i>Salmonella typhi</i>	Si presentó
<i>Streptococcus faecalis</i>	No presentó		

Tabla 5. Prueba cualitativa.

GRAM (-)	Del 44.44 % el 33.33 % presentó inhibición
GRAM (+)	El 55.55 % no presentó inhibición



Gráfica 2 . Del 100% de las bacterias, el 33.33% presentaron inhibición al confrontarla con el extracto. El 67% no presentaron inhibición en la prueba cualitativa.

Calculo para la obtención de la concentración en base al rendimiento obtenido.

$$\begin{aligned} &\text{Se obtuvo } 0.5419 \text{ mg/lit} \\ &0.5419\text{mg} * \frac{1000 \mu\text{g}}{1\text{mg}} = 541.9 \mu\text{g} \end{aligned}$$

$$541.9 \mu\text{g} / 10\text{ml} = 54.19\mu\text{g/ml}$$

A partir de la concentración inicial se obtienen las diluciones realizadas en la microplaca.

Tabla 6. Concentraciones obtenidas a partir de diluciones dobles empezando por 54.19 µg/ml

pozos	Concentración de extracto Citronela en µg/ml
1	54.19
2	27.095
3	13.547
4	6.773
5	3.386
6	1.693
7	0.846
8	0.423
9	0.211

6.4 Prueba cualitativa utilizando la Técnica de Mosmann

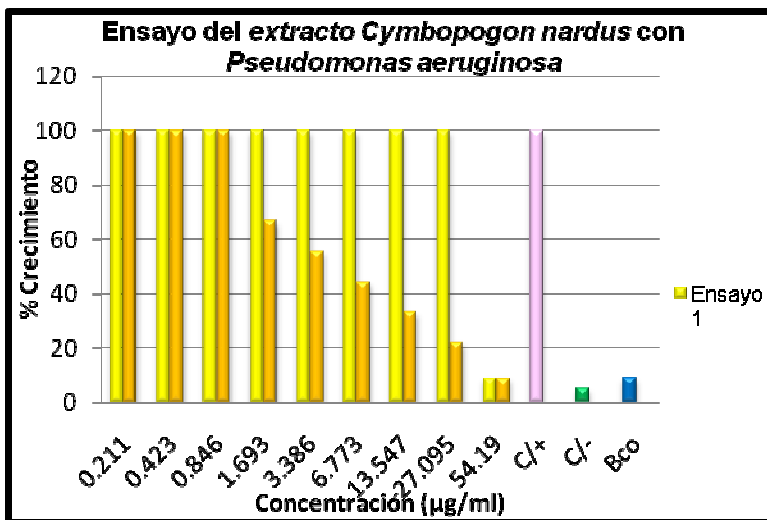
La técnica Mosmann, evidencia al extracto, en contacto directo con las bacterias, esperando como resultado una posible resistencia o una inhibición al crecimiento o desarrollo de la bacteria, y así poder conocer la concentración mínima inhibitoria.

Tabla 7. Mínima concentración inhibitoria de las bacterias G (-), utilizando la técnica de Mosmann.

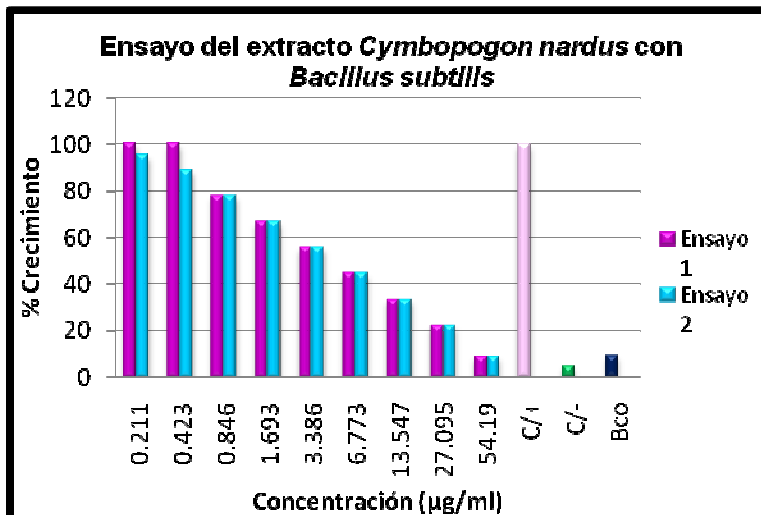
Bacterias GRAM (-)	Lectura visual (µg/ml)		Prueba MTT (µg/ml)	
	Ensayo I	Ensayo II	Ensayo I	Ensayo II
<i>Escherichia coli</i>	0.846	0.846	6.773	6.773
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.423	0.423	6.773	6.773
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	54.19	27.095	54.19	3.386
<i>Salmonella typhi</i>	0.423	0.423	3.386	13.547

Tabla 8. Mínima concentración inhibitoria de las bacterias G (+), utilizando la técnica de Mosmann.

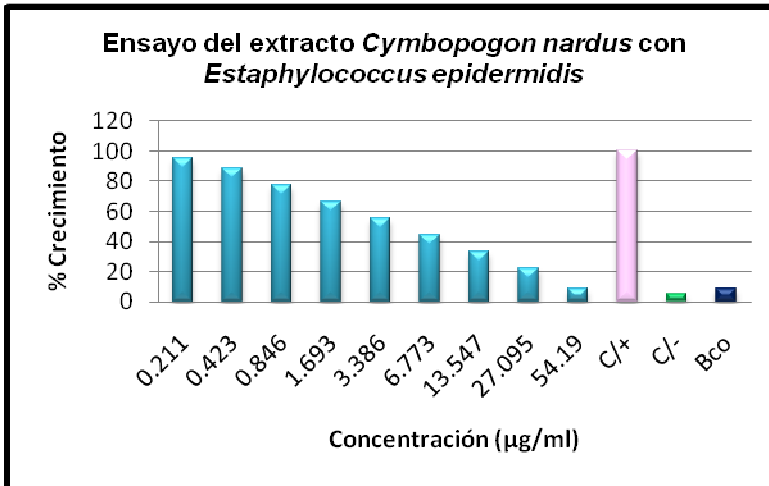
Bacterias GRAM (+)	Lectura visual (µg/ml)		Prueba MTT (µg/ml)	
	Ensayo I	Ensayo II	Ensayo I	Ensayo II
<i>Bacillus subtilis</i>	0.423	0.423	1.693	0.423
<i>Estaphylococcus aureus</i>	27.095	13.547	1.693	27.095
<i>Estaphylococcus epidermidis</i>	1.693	1.693	0.423	0.423
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0.846	3.386	6.773	13.547
<i>Streptococcus faecalis</i>	0.423	0.423	6.773	3.386



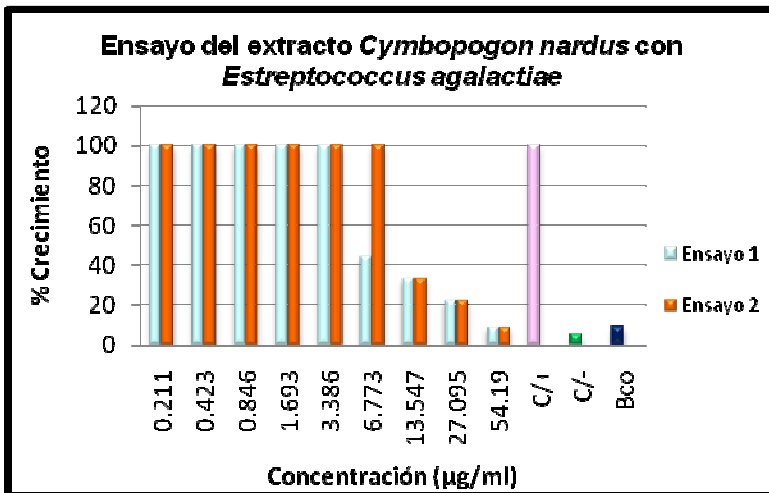
Gráfica 3. Ensayo del extracto *Cymbopogon nardus* con *P. aeruginosa*, A medida que aumentan las concentraciones hay mayor inhibición de la bacteria. CMI (1): 54.19 µg/ml y CMI (2): 3.386, prueba con MTT.



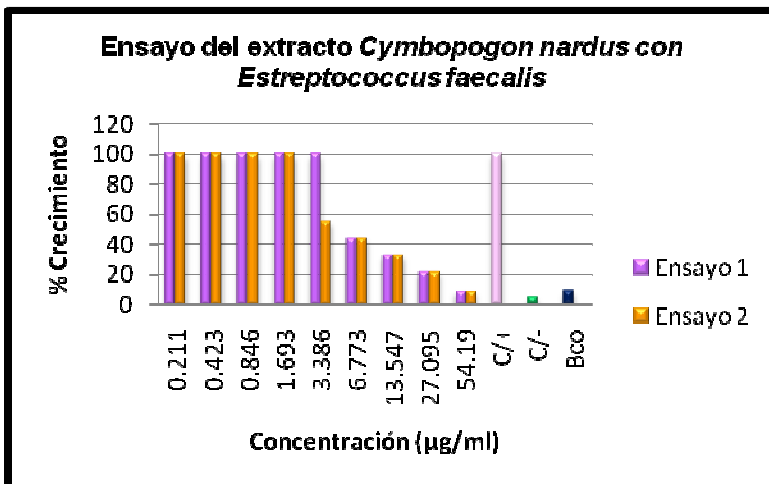
Gráfica 4. Ensayo del extracto *Cymbopogon nardus* con *B. subtilis*, A medida que aumentan las concentraciones hay mayor inhibición. CMI (1): 1.693 µg/ml y MCI (2): 0.423 µg/ml. Prueba con MTT.



Gráfica 5. Ensayo del extracto *Cymbopogon nardus* con *S. epidermidis*, A medida que aumenta la concentración hay menor inhibición bacteriana. CMI (Ensayos 1 y 2): 0.423 µg/ml. Prueba con MTT.



Gráfica 6. Ensayo del extracto *Cymbopogon nardus* con *S. agalactiae* A medida que aumentan las concentraciones hay mayor inhibición de la bacteria. CMI (1): 6.773 µg/ml y MCI (2): 13.547 µg/ml, prueba con MTT.



Gráfica 7. Ensayo del extracto *Cymbopogon nardus* con *S. faecalis*. A medida que aumentan las concentraciones hay mayor inhibición de la bacteria. CMI (1): 6.773 µg/ml y MCI (2): 3.386 µg/ml, prueba con MTT.

6.5 Prueba Bacteriostática o Bactericida

Bacterias GRAM (-)

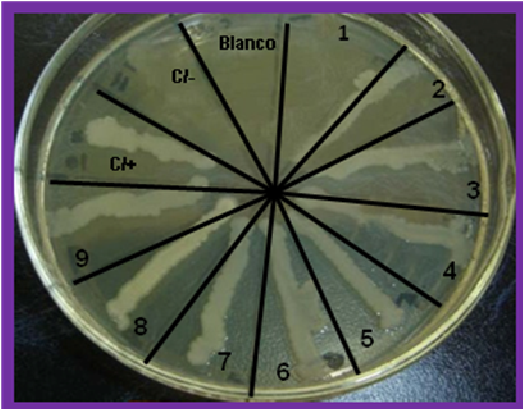


Figura 8.- *Salmonella typhi*

Figura 8. *Salmonella typhi* no presentó crecimiento en el espacio 1 después de haber sido incubada en presencia del extracto a la concentración de 54.19µg/ml, en las divisiones (2 al 6) se observa que el crecimiento va aumentando a medida que disminuye la concentración del extracto. A partir de los espacios 7 al 9 el crecimiento es similar al control positivo. El efecto del extracto *Cymbopogon nardus* fue bactericida y bacteriostático dependiente de la concentración.

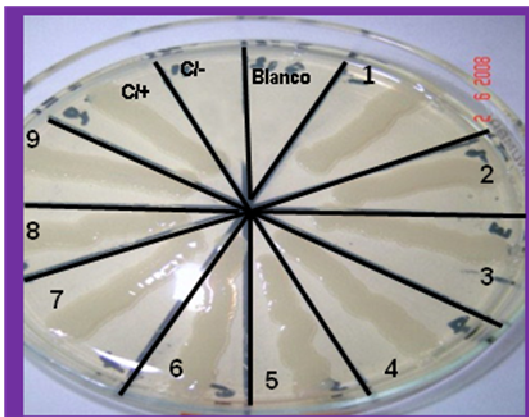


Figura 9. *Escherichia coli*

Figura 9. *Escherichia coli* presentó crecimiento homogéneo y similar al control positivo en todas las divisiones. No hubo ninguna inhibición que se pudiera comparar con el control negativo. El efecto del extracto de *Cymbopogon nardus* fue bacteriostático con esta bacteria.

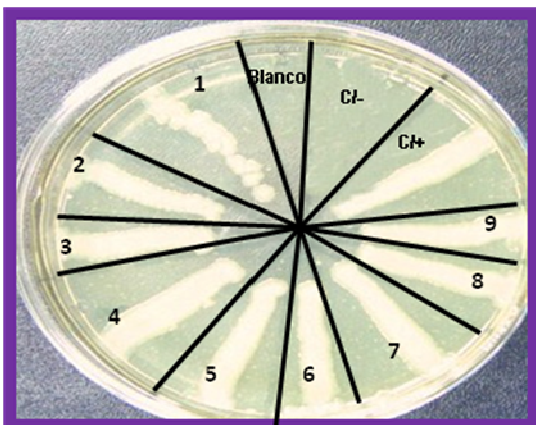


Figura 10. *Klebsiella pneumoniae*

Figura 10: En el espacio uno y dos se observa un crecimiento atípico de *Klebsiella pneumoniae* en comparación del control positivo. El efecto del extracto de *Cymbopogon nardus* fue bacteriostático con esta bacteria.

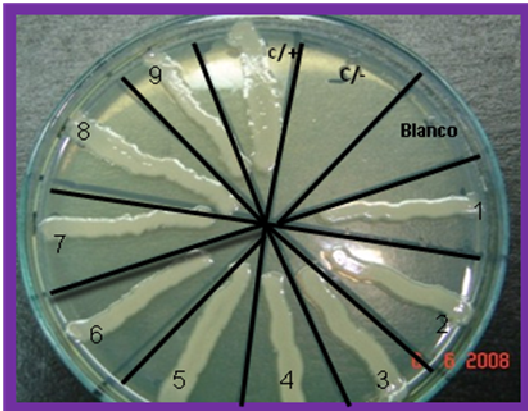


Figura 11. *Pseudomonas aeruginosa*

Figura 11. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* no se observa ningún cambio en las 9 divisiones en comparación con el control positivo. El efecto del extracto de *Cymbopogon nardus* fue bacteriostático con esta bacteria.

Bacterias GRAM (+)

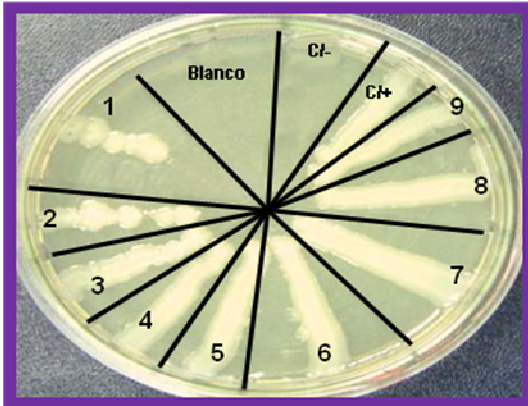


Figura 12.- *Streptococcus agalactiae*

Figura 12. Para *Streptococcus agalactiae*, en el espacio 1, se observa que hay poco crecimiento bacteriano y además atípico comparado con el control positivo. El efecto del extracto de *Cymbopogon nardus* fue bacteriostático con esta bacteria.

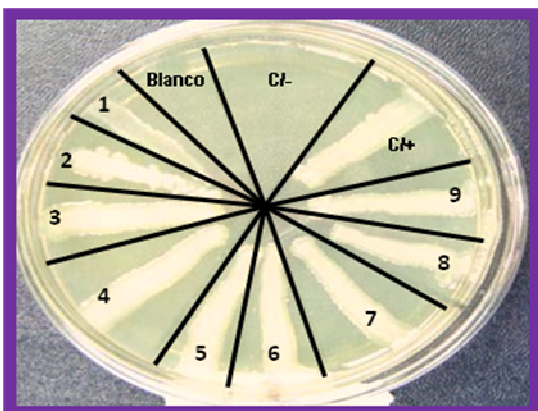


Figura 13.- *Streptococcus faecalis*

Figura 13. Para *Streptococcus faecalis* se observa un crecimiento atípico en los espacios 1-3. En las divisiones 4 a 9, el crecimiento es parecido al control positivo. El efecto del extracto de *Cymbopogon nardus* fue bacteriostático con esta bacteria.



Figura 14.- *Bacillus subtilis*

Figura 14: El crecimiento bacteriano es homogéneo en las 9 divisiones. No se observa inhibición con *Bacillus subtilis*. El efecto del extracto de *Cymbopogon nardus* fue bacteriostático con esta bacteria.

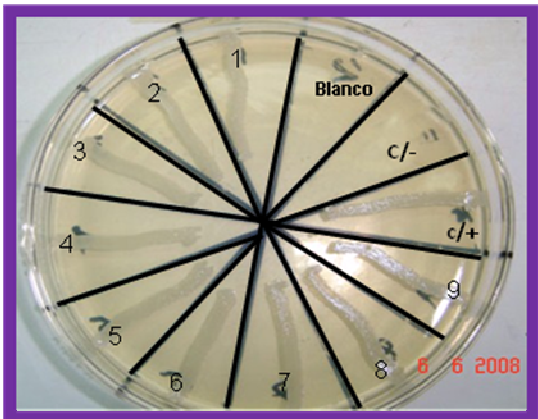


Figura 15.- *Staphylococcus epidermidis*

Figura 15: El crecimiento bacteriano es homogéneo en las 9 divisiones. No se observa inhibición con *Staphylococcus epidermidis*. El efecto del extracto de *Cymbopogon nardus* fue bacteriostático.

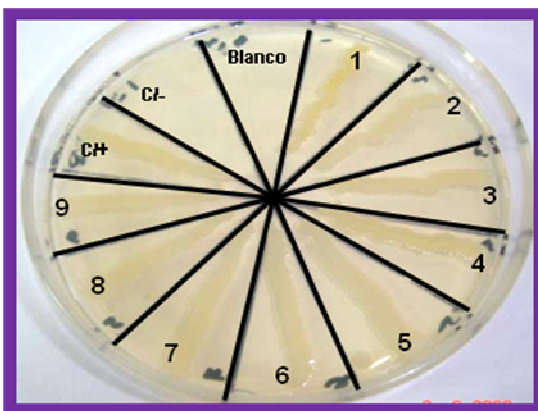
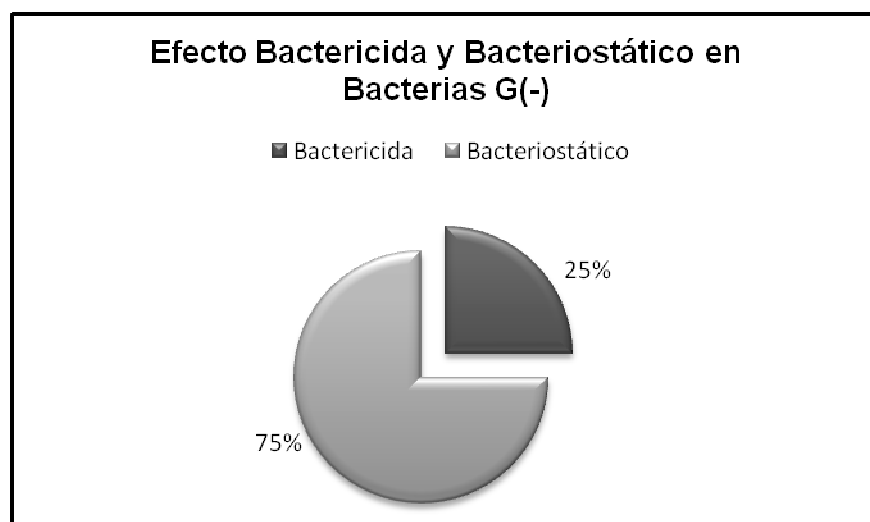


Figura 16. *Staphylococcus aureus*

Figura 16. *Staphylococcus aureus* en el espacio uno presenta un crecimiento atípico comparado con el control positivo. El efecto del extracto de *Cymbopogon nardus* fue bacteriostático con esta bacteria.

Tabla 9. Prueba bacteriostático y bactericida para bacterias GRAM (-)

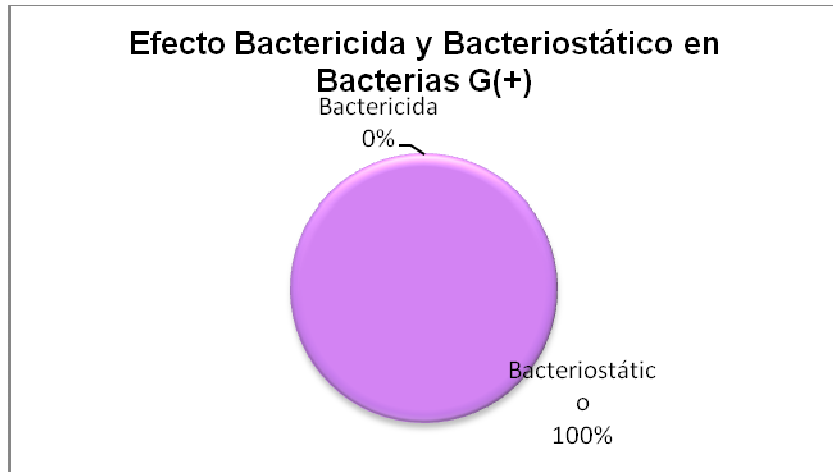
Bacteria G(-)	BACTERIOCIDA Y/O BACTERIOSTÁTICO
<i>Salmonella typhi</i>	Bactericida
<i>Escherichia coli</i>	Bacteriostático
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacteriostático
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacteriostático



Gráfica 8. Prueba bactericida y bacteriostático, en las 4 bacterias GRAM (-).

Tabla 10. Prueba bacteriostático y bactericida, para bacterias GRAM (+)

Bacterias G(+)	BACTERIOSIDA Y/O BACTERIOSTÁTICO
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Bacteriostático
<i>Streptococcus faecalis</i>	Bacteriostático
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacteriostático
<i>Estaphylococcus epidermidis</i>	Bacteriostático
<i>Estaphylococcus aureus</i>	Bacteriostático



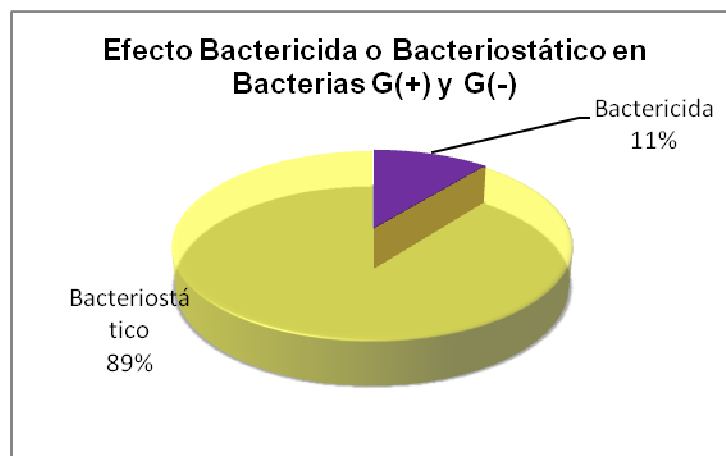
Gráfica 9. Prueba bactericida y/o bacteriostático, en las 5 bacterias GRAM (+).

Tabla 11. Prueba bacteriostático y/o bactericida, en bacterias GRAM (-) y GRAM (+).

	Bacteriostático	Bactericida
G (-)	75%	25%
G (+)	100%	0%

Tabla 12. Prueba bacteriostática y/o bactericida, en las nueve bacterias.

EFFECTO	%
Bacteriostático	88.88%
Bactericida	11.11%



Gráfica 10. Prueba bactericida y/o bacteriostático, en las 9 bacterias GRAM (-) y GRAM (+), utilizadas en la experimentación.

6.6 Técnica de Mosmann cuantitativamente

Lectura visual:

Escherichia coli (A-B):

Pozo A: Presentó inhibición en las concentraciones 27.095 µg/ml a 54.19 µg/ml.

Pozo B: Presentó inhibición en las concentraciones 0.211 µg/ml a 54.19 µg/ml.

Klebsiella pneumoniae (C-D):

Pozo C: Presentó inhibición en las concentraciones 0.211 µg/ml a 54.19 µg/ml.

Pozo D: Presentó inhibición en las concentraciones 0.211 µg/ml a 54.19 µg/ml.

Salmonella typhi (E-F):

Pozo E: Presentó inhibición en las concentraciones 3.386 µg/ml a 54.19 µg/ml.

Pozo F: Presentó inhibición en las concentraciones 0.846 µg/ml a 54.19 µg/ml.

Staphylococcus aureus (G-H):

Pozo G: Presentó inhibición en las concentraciones 13.547 µg/ml a 54.19 µg/ml.

Pozo H: Presentó inhibición en las concentraciones 27.095 µg/ml a 54.19 µg/ml.

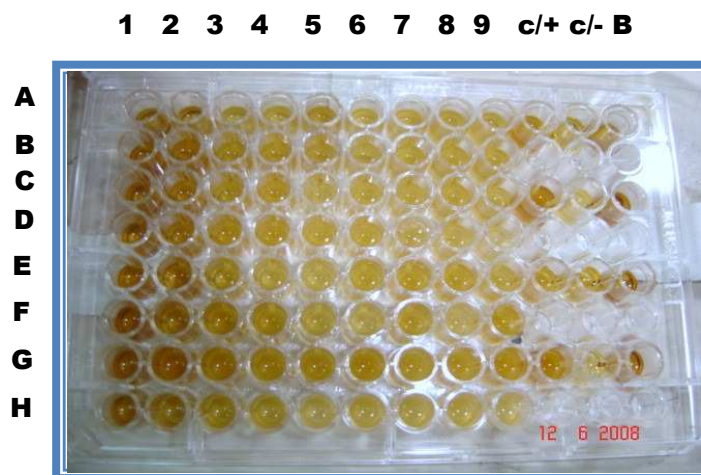


Figura 17. Ensayo en microplaca extracto – bacteria (*Escherichia coli* (A-B), *Klebsiella pneumoniae* (C-D), *Staphylococcus aureus* (G-H) y *Salmonella typhi* (E-F)). Diluciones del extracto de Citronella pozos (1-9). (10) control positivo, (11) control negativo, (12) blanco.

Lectura con el reactivo de MTT:

Escherichia coli (A-B):

Pozo A: Presentó inhibición en las concentraciones 27.095 µg/ml a 54.19 µg/ml.

Pozo B: Presentó inhibición en las concentraciones 0.211 µg/ml a 54.19 µg/ml.

Klebsiella pneumoniae (C-D):

Pozo C Presentó inhibición en las concentraciones 1.693 µg/ml a 54.19 µg/ml.

Pozo D: Presentó inhibición en las concentraciones 0.846 µg/ml a 54.19 µg/ml.

Salmonella typhi (E-F):

Pozo E: Presentó inhibición en las concentraciones 1.693 µg/ml a 54.19 µg/ml.

Pozo F: Presentó inhibición en las concentraciones 3.386 µg/ml a 54.19 µg/ml.

Staphylococcus aureus (G-H):

Pozo G Presentó inhibición en las concentraciones 6.773 µg/ml a 54.19 µg/ml.

Pozo H: Presentó inhibición en las concentraciones 27.095 µg/ml a 54.19 µg/ml.

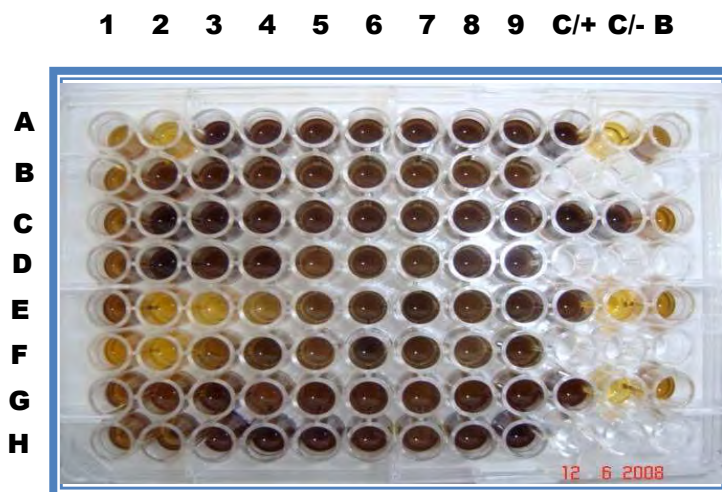


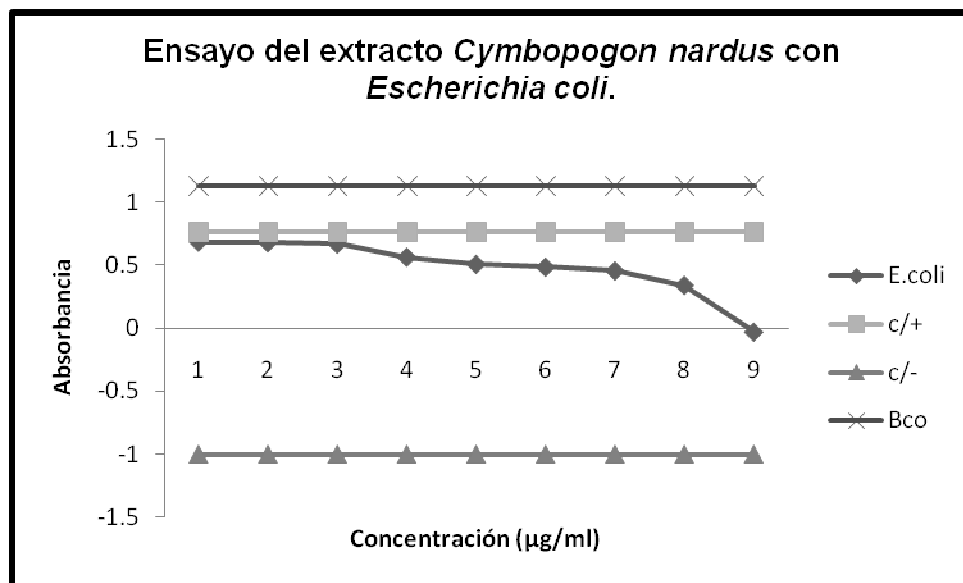
Figura 18. Ensayo en microplaca extracto - MTT – bacteria (*Escherichia coli* (A-B), *Klebsiella pneumoniae* (C-D), *Estaphylococcus aureus* (G-H) y *Salmonella typhi* (E-F)). Diluciones del extracto de Citronela pozos (1-9). (10) control positivo, (11) control negativo, (12) blanco.

Tabla 13. Mínima concentración inhibitoria de las bacterias G (+) y G (-), utilizando la técnica de Mosmann.

Bacteria	Concentración mínima inhibitoria en la lectura visual (µg/ml)		Concentración mínima inhibitoria en la prueba con MTT (µg/ml)	
	Ensayo I	Ensayo II	Ensayo I	Ensayo II
<i>Salmonella typhi</i>	3.386	0.846	1.693	3.386
<i>Escherichia coli</i>	27.095	0.211	6.773	0.211
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.211	0.211	1.693	0.846
<i>Staphylococcus aureus</i>	13.547	27.095	6.773	27.095

Tabla 14. Datos obtenidos del Ensayo en microplaca por el método de Mosmann con el extracto de *Cymbopogon nardus* con *Escherichia coli*.

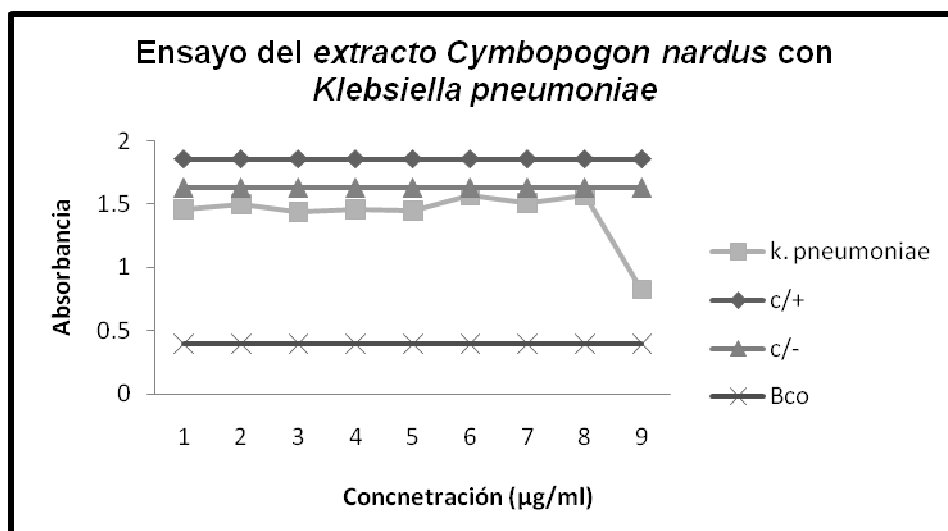
Concentración del extracto Citronela (µg /ml)	Absorbancia de <i>E.coli</i>
0.211	0.6845
0.423	0.679
0.846	0.668
1.693	0.563
3.386	0.5065
6.773	0.484
13.547	0.454
27.095	0.3395
54.19	-0.033
C/+	0.765
C/-	-1.002
Bco	1.127



Gráfica 11. Efecto inhibitorio del extracto *Citronela* a diferentes concentraciones con *Escherichia coli*, donde la Concentración Mínima Inhibitoria es de 13.547 µg/ml.

Tabla 15. Datos obtenidos del Ensayo en microplaca por el método de Mosmann con el extracto de *Cymbopogon nardus* con *Klebsiella pneumoniae*.

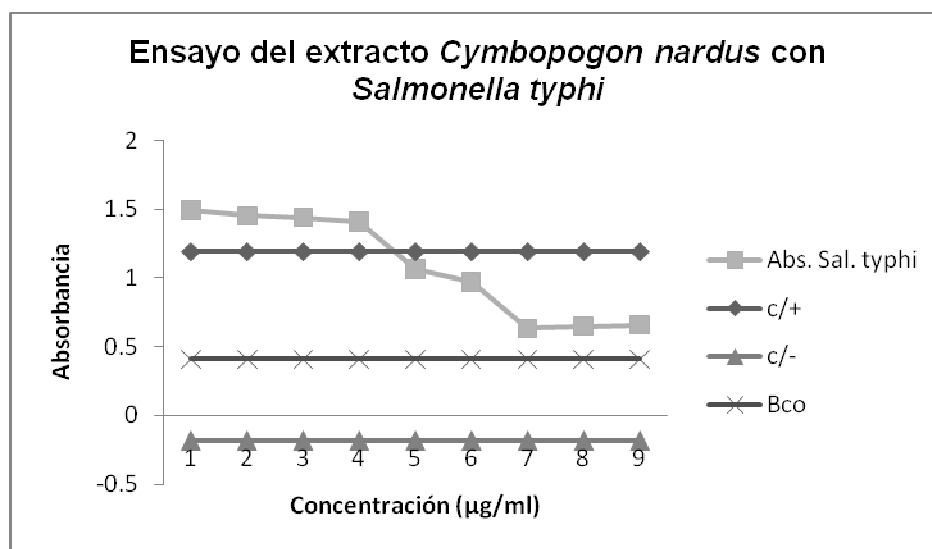
Concentración del extracto Citronela (µg/ml)	Absorbancia de <i>K. pneumoniae</i>
0.211	1.459
0.423	1.4995
0.846	1.436
1.693	1.456
3.386	1.45
6.773	1.5695
13.547	1.509
27.095	1.565
54.19	0.826
C/+	1.856
C/-	1.628
Bco	0.397



Gráfica 12. Efecto inhibitorio del extracto *Citronela* a diferentes concentraciones con *Klebsiella pneumoniae*, donde la Concentración Mínima Inhibitoria es de 0.211 µg/ml.

Tabla 16. Datos obtenidos del Ensayo en microplaca por el método de Mosmann con el extracto de *Cymbopogon nardus* con *Salmonella typhi*.

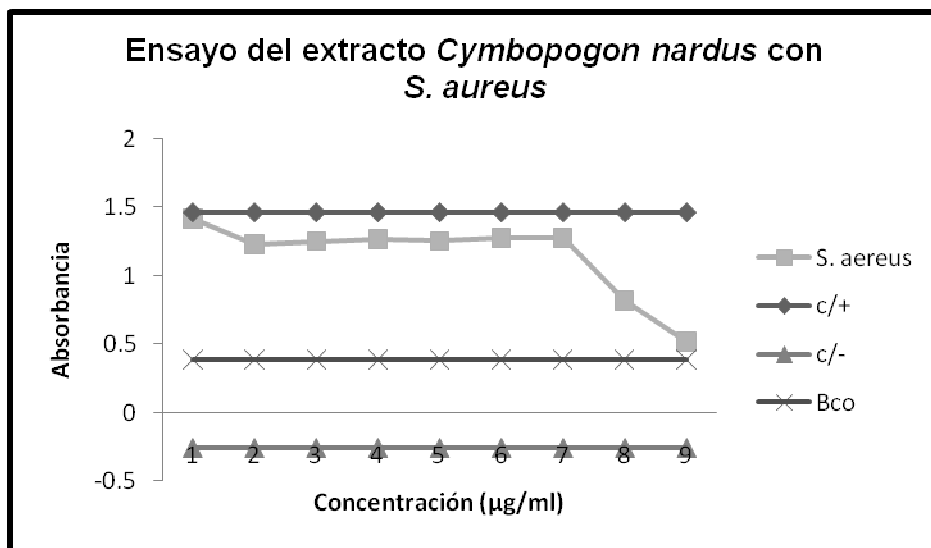
Concentración del extracto Citronela (µg /ml)	Absorbancia de <i>Salmonella typhi</i>
0.211	1.493
0.423	1.451
0.846	1.4405
1.693	1.4075
3.386	1.066
6.773	0.971
13.547	0.6315
27.095	0.648
54.19	0.6568
C/+	1.191
C/-	-0.182
Bco	0.408



Gráfica 13. Efecto inhibitorio del extracto *Citronela* a diferentes concentraciones con *Salmonella typhi*, donde la Concentración Mínima Inhibitoria es de 13.547 µg/ml.

Tabla 17. Datos obtenidos del Ensayo en microplaca por el método de Mosmann con el extracto de *Cymbopogon nardus* con *Staphylococcus aureus*.

Concentración del extracto Citronela ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Absorbancia de <i>S. aureus</i>
0.211	1.4145
0.423	1.227
0.846	1.2505
1.693	1.265
3.386	1.2535
6.773	1.2765
13.547	1.274
27.095	0.8195
54.19	0.52
C/+	1.46
C/-	-0.26
Bco	0.386



Gráfica 14. Efecto inhibitorio del extracto *Citronela* a diferentes concentraciones con *Staphylococcus aureus*, donde la Concentración Mínima Inhibitoria es de 0.423 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

6.7 Microscopia Electrónica de Transmisión (MET)

Salmonella typhi

Control sin tratamiento: Se puede observar en la figura (A y B), los bordes bien definidos e incluso también los flagelos peritricos.

Control tratado: Como podemos ver en las figuras, (C y D) los bordes de la *bacteria Salmonella typhi* se encuentran deformados y no se observan los flagelos. Es evidente que hay una ruptura o lisis de la bacteria, además se puede observar la evidente formación de protoplastos.

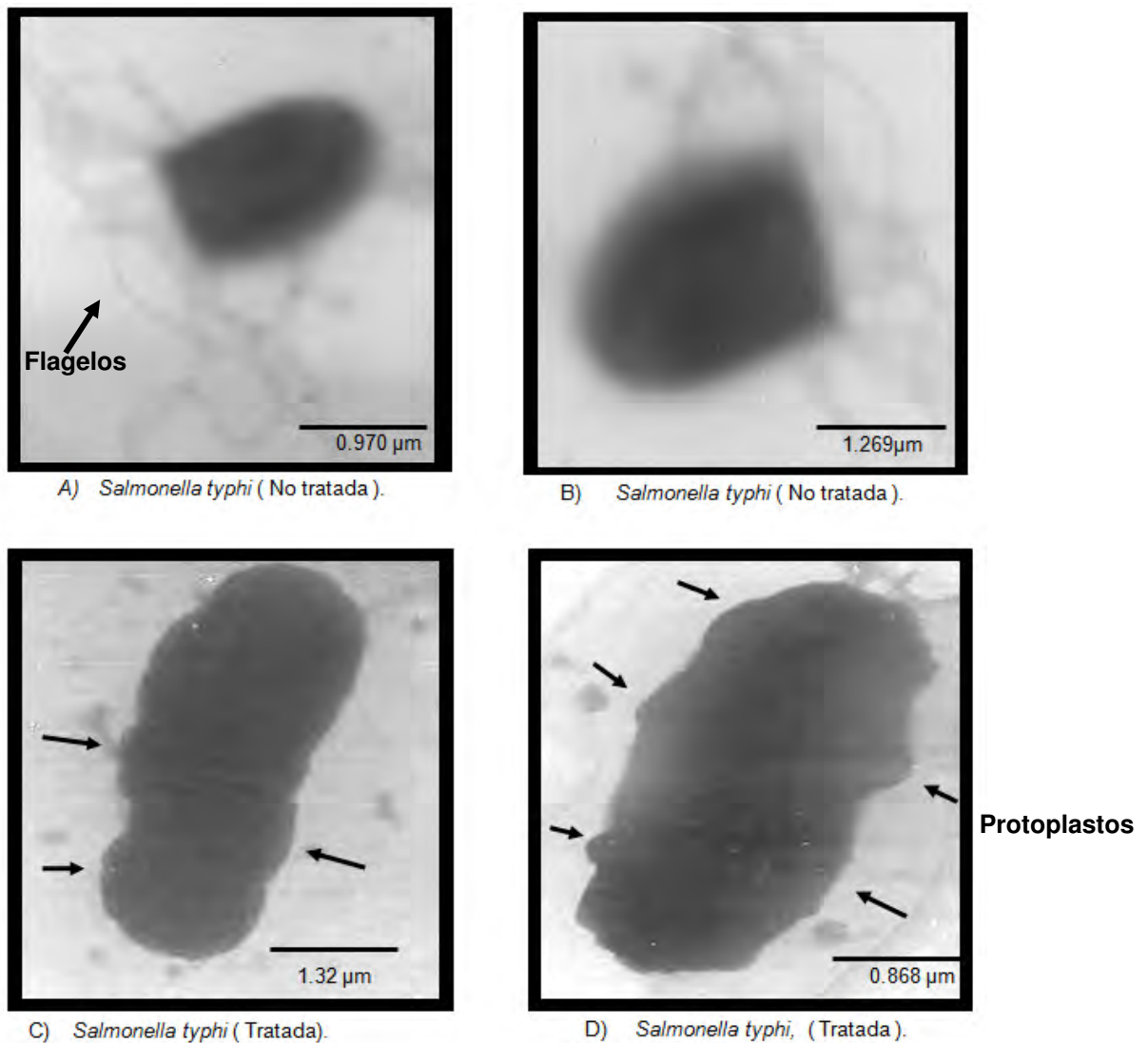


Figura 19. Microfotografías de *Salmonella typhi* a 10 000 magnificaciones, A y B pertenecen a una muestra control. Abajo C y D corresponden a una muestra tratada con extracto de *Cymbopogon nardus* (54.19 $\mu\text{g/ml}$).

Streptococcus faecalis

Control si tratamiento: Se observa en la figura (A y B, las agrupaciones con bordes bien delimitados y similitud en tamaño y forma esférica.

Control tratado: En las figuras (C) con la muestra tratada, ya no se observa la forma esférica definida, al contrario se ven irregularidades en forma y tamaño. Además se observa la pérdida parcial de la pared celular.

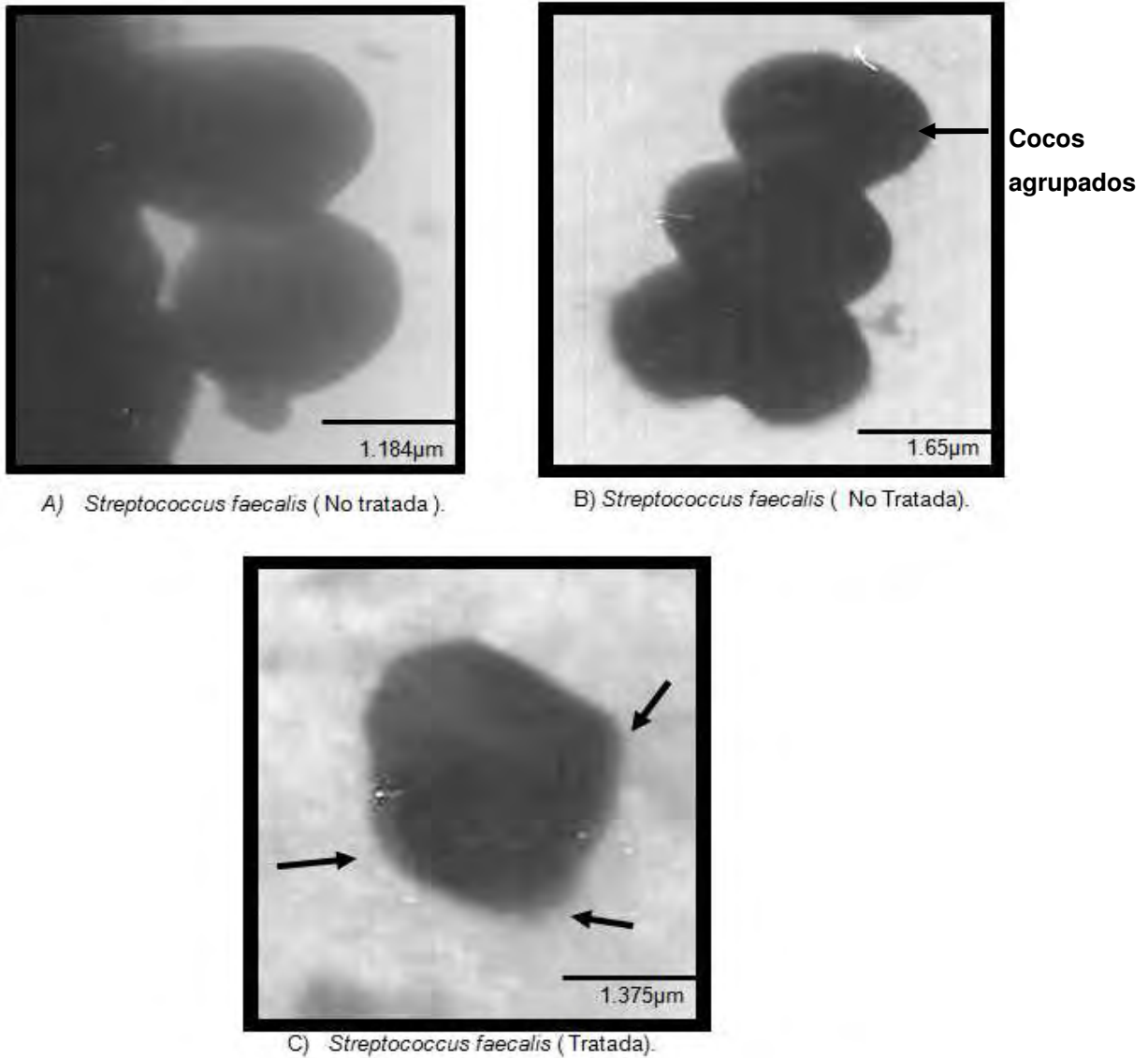
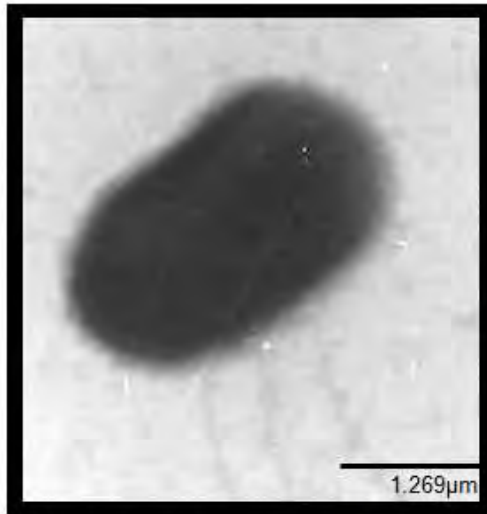


Figura 20. Microfotografías de *Streptococcus faecalis* a 10 000 magnificaciones, A y B pertenecen a una muestra control. Abajo C corresponde a una muestra tratada con extracto de *Cymbopogon nardus* (54.19 µg/ml).

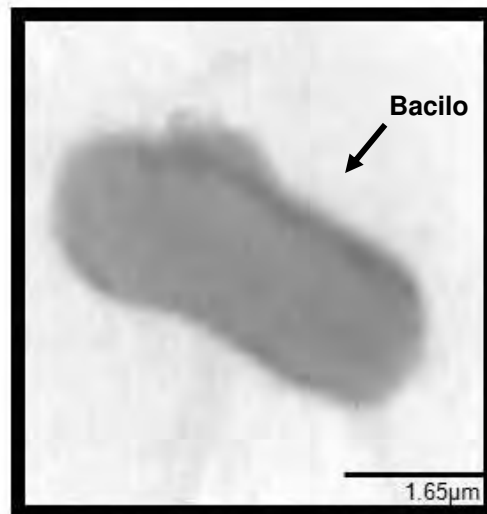
Klebsiella pneumoniae

Control sin tratamiento: En los controles positivos se observan los bacilos bien definidos (figuras A y B).

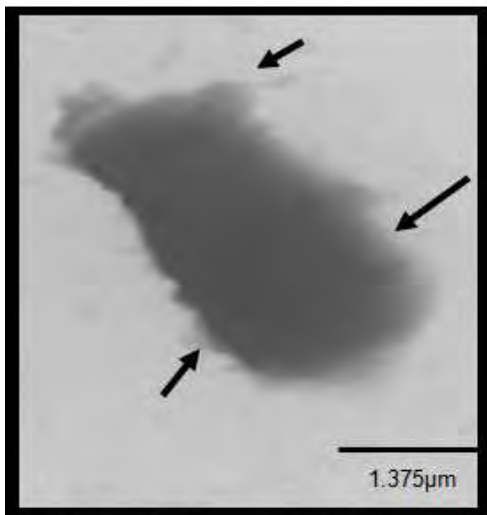
Control tratado: Como se puede ver en las figuras (C y D) hay un daño a nivel celular porque se puede observar con claridad la ruptura o lisis de la bacteria liberando su contenido al medio y deformando su forma de bacilo.



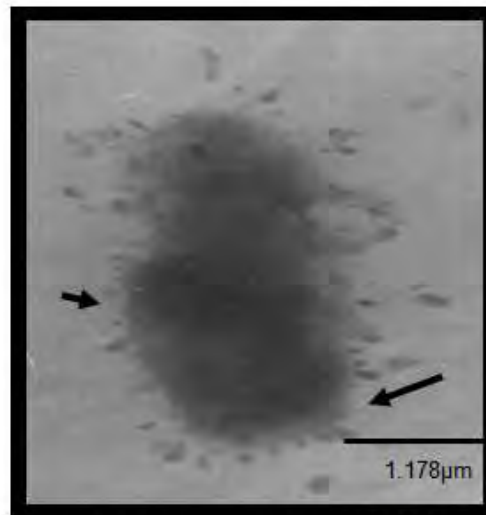
A) *Klebsiella pneumoniae* (No tratada).



B) *Klebsiella pneumoniae* (No tratada).



C) *Klebsiella pneumoniae* (Tratada).



D) *Klebsiella pneumoniae* (Tratada).

Figura 21. Microfotografías de *Klebsiella pneumoniae* a 10 000 magnificaciones, A y B pertenecen a una muestra control. Abajo C y D corresponden a una muestra tratada con extracto de *Cymbopogon nardus* (54.19 μg/ml).

7 Discusión

Casi 200 especies de bacterias son patógenas para el ser humano es decir causante de enfermedades. El efecto patógeno varía mucho en función de las especies esto depende tanto de la virulencia de la especie en particular como de las condiciones del organismo huésped. Entre las bacterias más dañinas están las causantes del cólera, tétanos, gangrena gaseosa, lepra, peste, disentería bacilar, tuberculosis, sífilis, fiebre tifoidea, difteria, fiebre ondulante o brucelosis neumonía. Hasta el descubrimiento de los virus, las bacterias fueron consideradas los agentes patógenos de todas las enfermedades infecciosas.¹

Una cepa bacteriana puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos por diversas especies bacterianas. Desde un punto de vista práctico una bacteria es sensible a un antibiótico, cuando este es eficaz frente a ella y podemos esperar la curación de la infección; por el contrario es resistente cuando su crecimiento sólo puede ser inhibido a concentraciones superiores a las que el fármaco puede alcanzar en el lugar de la infección (Pérez, 1998).

En la actualidad, la investigación de plantas utilizadas en la medicina tradicional ha tomado una perspectiva distinta y se ha enfocado en el aislamiento de los principios activos con la finalidad de generar estructuras líderes que pueden ser candidatos para desarrollar nuevos fitofármacos. Por lo tanto, el estudio de plantas medicinales con actividad biológica (comprobada científicamente) es prioritario y necesario para generar nuevas alternativas de tratamiento para enfermedades crónico degenerativas con la finalidad de obtener agentes terapéuticos más eficaces y menos costosos (Vergara, 2009).

En este estudio se presentaron algunas desventajas al trabajar con el extracto de *Cymbopogon nardus* como fue el rendimiento, nosotros obtuvimos 0.5419 mg/L, si se elaborará una forma farmacéutica por ejemplo; una capsula se tendrían que utilizar varios litros de dicho extracto. Otro aspecto importante que se debe discutir es la solubilidad del extracto, ya que este no se podía filtrar fácilmente porque se satura la membrana, así que se filtro con papel y después con la membrana de 0.45 µm, finalmente en condiciones estériles con membrana de 0.22 µm.

Una ventaja que se tuvo al trabajar con las 9 bacterias Gram positivas y Gram negativas, fue que son muy fáciles de manejar y de aislar aunque como sugerencia y en base a los resultados obtenidos nosotros consideramos que se deben trabajar más bacterias porque se demostró que el extracto Citronela tiene un amplio espectro de inhibición y también para comparar resultados en la MCI. Cabe mencionar que las bacterias utilizadas para este trabajo se seleccionaron bajo la revisión bibliográfica Guerra *et al* (2004), el cual trabajo con la especie *Cymbopogon citratus* que contiene componentes similares al extracto *Cymbopogon nardus* como son: geraniol, citronelol, citral, flavonoidas y canfeno (Roig, 2002).

¹ <http://www.bio-nica.info/Biblioteca/BacteriasEnfermedades.pdf>

La prueba cualitativa se realizó con el fin de determinar el efecto inhibitorio del extracto *Cymbopogon nardus* en 9 bacterias (tablas 4 y 5). Sólo se presentó inhibición en 3 (33.33%) *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhi*. Con estos resultados obtenidos en la prueba cualitativa, se sabe que el extracto *Cymbopogon nardus* posee componentes que inhiben a las bacterias, por ende se puede proceder a la cuantificación, ésta es una de las razones por la cual se hace la prueba antes mencionada.

Existen varias técnicas que sirven para analizar extractos de plantas, como Citronela y por ende determinar la MCI. Pero nosotros decidimos trabajar con la técnica de Mosmann la cual tiene la ventaja de ser cualitativa y cuantitativa, se utilizó el reactivo MTT, el cual es una sal de tratrazolio 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio bromide; es usado en la determinación de la viabilidad de células en ensayos de proliferación y citotoxicidad celular. El MTT oxidado es reducido metabólicamente por las células activas a través de la enzima deshidrogenasas bacterianas que dan lugar a la forma reducida originando un cambio de color: amarillo a morado. Así la prueba se vuelve cualitativa por simple inspección al producir un cambio de color del reactivo, ya que el color amarillo nos indica la ausencia de microorganismos y el color morado su viabilidad. La técnica antes mencionada tiene la ventaja de ser muy precisa, aunque es costosa. En comparación con la técnica de dilución en tubo es cualitativa. En el caso de cilindro placa en agar, al medir los halos de inhibición no se tiene un estándar con el cual se va a comparar. Es por estas razones que se decidió utilizar la técnica de Mosmann.

La técnica de Mosmann mide la activación celular cualitativamente y cuantitativa. En comparación a la técnica que utilizo Guerra *et al* (2004), que fue el método de dilución en caldo triptona de soja para las bacterias y las diluciones del extracto de *C. citrus*, Nosotros consideramos que fue mejor la técnica que utilizamos por las ventajas antes mencionadas y las desventajas que presenta el método de dilución en tubo.

La lectura visual de las microplacas, se realiza de la siguiente manera: se debe ver una total transparencia y ausencia de turbidez en los pozos que son control negativo y blanco, al contrario del pozo control positivo debe de presentar turbidez. Se comparan los pozos problemas con los controles y el blanco, para medir la turbidez visualmente. En caso de que si se presentara la turbidez en algunos de los pozos problemas y entre más se acerquen al control positivo indica la presencia o crecimiento de la bacteria, y por lo tanto no hay inhibición por parte del extracto. Los pozos que no presenten turbidez y sean más parecidos al control negativo indican que no existe crecimiento del microorganismo. Después de haber realizado la interpretación para la lectura visual, se procede a la lectura con el reactivo MTT, es una prueba colorida como antes se menciono, esta técnica permite observar y determinar fácilmente que pozos presentan crecimiento o inhibición por efecto del extracto y así determinar la MCI. Con esta técnica se tiene la opción de hacer lecturas en un espectrofotómetro (Elisómetro) a 655nm de longitud de onda. (Morales, 2009) Para las bacterias GRAM (-) en la prueba visual, las que tuvieron un mayor impacto ante el extracto Citronela fueron *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi*, (tabla 7) porque no se observo

turbidez en los pozos del 1 al 8 la MCI fue de 0.423 µg/ml, seguido de las bacterias, *Escherichia coli* 0.846 µg/ml y *Pseudomonas aeruginosa* 27.095 µg/ml. Esto se evidencio con la técnica de Mosmann, para comprobar si realmente estos resultados obtenidos visualmente son confiables. En el caso de la bacteria *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli* se observó una coloración amarilla en los pozos del 1 al 4, la MCI fue de 6.773 µg/ml, para la bacteria *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa* la MCI fue de 3.386 µg/ml el cual corresponde al pozo 5.

Para las bacterias GRAM (+), en la prueba visual, la que tuvo una mayor MCI ante el extracto *Cymbopogon nardus* fueron *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis* (tabla 8) porque no se observó turbidez en los pozos del 1 al 8 la MCI fue de 0.423 µg/ml, seguido de las bacterias *Streptococcus agalactiae* su MCI fue de 0.846 µg/ml, que corresponde a el pozo 7, seguido de la bacteria *Staphylococcus epidermidis* su MCI fue de 1.693 µg/ml, que corresponde al pozo 6 y por ultimo *Staphylococcus aureus* su MCI fue de 13.5475 µg/ml que corresponde al pozo 3. Esto se evidencio con la técnica de Mosmann, para comprobar si realmente estos resultados obtenidos visualmente son confiables. En el caso de la bacteria *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus epidermidis* se obtuvo la mínima concentración inhibitoria de 0.423 µg/ml correspondiente al pozo 9. Para las bacterias *Streptococcus faecalis* la MCI fue de 3.386 µg/ml correspondiente al pozo 5, *Streptococcus agalactiae* la MCI fue de 6.773 µg/ml y por ultimo *Staphylococcus aureus* la MCI fue de 1.693 µg/ml que corresponde al pozo 6. Las bacteria que obtuvieron un mayor MCI fueron *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus epidermidis*. En el trabajo de Guerra *et al* (2004) los microorganismos más sensibles fueron los Gram positivos y en nuestro trabajo los resultados obtenidos para las bacterias Gram negativas y Gram positivas resultaron ser sensibles al extracto *Cymbopogon nardus*. Esta significa que nuestra técnica fue mejor en comparación a la utilizada por Guerra *et al* (2004).

Todos los resultados obtenidos se compararon con los controles negativos, positivos y blanco.

Después realizamos la prueba bacteriostático y bactericida del extracto de *Cymbopogon nardus* en las nueve bacterias antes mencionadas (Figuras 8-16) en las cuales tiene acción bacteriostática, la única bacteria que presento efecto bactericida es *Salmonella typhi* a la concentración de 54.19 µg/ml.

En la tabla 11, se muestran los resultados finales obtenidos en la prueba antes mencionada, tiene un mayor efecto bacteriostático en Gram positivos (100%), sin embargo para las G (-) se tuvo un mejor resultado en el efecto bactericida (25%), aunado a esto también se obtuvieron resultados bacteriostáticos (75 %) con las G(-). Guerra *et al* (2004), reporto el efecto bactericida del extracto de *C. citrus* en *E. coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi* a excepción de *S. aureus* para el cual fue bacteriostática. En comparación con nuestros resultados, los de Guerra resultaron ser mejores, esto se le atribuye a que el extracto tiene algunos componentes diferentes aunque pertenezcan a la misma familia y género de planta. Nosotros consideramos que si se incrementara la concentración del extracto *Cymbopogon nardus* se obtendrían mejores resultados en el efecto bacteriostático y/o bactericida,

como los que obtuvo Guerra ya que utilizó concentraciones de 0.3 a 5.0mg/ml, y nosotros utilizamos un rango de concentraciones de 54.19 a 0.211µg/ml, las cuales son cantidades y unidades más pequeñas en comparación con Guerra.

Después haber elaborado la técnica cualitativa, se precede a realizarlo de manera cuantitativamente la lectura de la microplaca con el lector ELISA, esto se realizó con el fin de obtener de manera directa la concentración de bacterias viables en cada ensayo, de forma que se detecto la CMI para cada una de estas. Como resultados obtuvimos para las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* la CMI fue de 13.547 µg/ml, *Klebsiella pneumoniae* la CMI fue de 0.211 µg/ml y por último para *Staphylococcus aureus* fue de 27.095 µg/ml, estos resultados obtenidos se compararon con la lectura visual y con el reactivo MTT realizadas en los pozos y se concluyo que la técnica de Mossman es más precisa cuando se realizan la lectura en el elisómetro porque se obtuvieron resultados mejores que en la lectura visual. Como podemos ver el extracto Citronela tiene un amplio espectro de inhibición con respecto a las bacterias GRAM (-) y G (+) aunque se obtuvo una MCI mejor en la bacteria *Klebsiella pneumonia* esto es debido a que las bacterias G (-) tienen una membrana externa y de una delgada capa de peptidoglicano que las hace más susceptibles a los componentes del extracto.

Para la Microscopia Electrónica de Transmisión, se utilizaron bacterias G (-) como *Salmonella typhi* y *Klebsiella pneumoniae* y G (+) como *Streptococcus faecalis*. Al realizar la comparación antes mencionada con las muestras tratadas y no tratadas se puede decir que en todas las bacterias, probablemente hay alteraciones a nivel de membrana celular y pared celular, ésta última puede ser destruida por acción de alguno agentes, como la lisozima que rompe los enlaces glicosidicos β-1.4, entre las unidades N- acetilglucosamina y N- acetilmurámico, que en consecuencia debilitan la pared; lo que ocasiona que el agua pueda entrar a la célula produciendo lisis. Pero si ésta se encuentra en condiciones isotónicas, la lisosoma puede digerir el peptidoglicano sin embargo el agua no entraría a la célula lo que no ocasionaría la lisis de la célula, formándose un protoplasto como formas normalmente libres de cualquier material residual de la pared celular G (+), mientras que los esferoplastos, por lo general son restos de la pared unidos a la membrana de G (-). (Morales, 2009). Esta técnica nos permitió evidenciar el daño que causó el extracto Citronela en las bacterias y además de que se respaldan los resultados obtenidos. Como es el caso de la bacteria *Salmonella typhi* (Figura 19) que claramente se puede ver la formación de protoplastos, así como la desaparición de los flagelos en la muestra tratada en comparación con la no tratada. En el caso de *Streptococcus faecalis* se observa como en la muestra no tratado se ve claramente la forma esférica (Figura 20), en comparación con la muestra tratada que ya no tiene la forma esférica, además de que se observan protuberancias. En la bacteria que nosotros consideramos que causa un mayor daño fue *Klebsiella pneumoniae* (Figura 21) ya que las muestra tratadas se ven totalmente deformadas en comparación con la muestra no tratada.

Maguna *et al* (2006), realizó una prueba con terpenoides entre los cuales se encuentran algunos componentes que contiene el extracto de Citronela con la cual se determinó que las bacterias

Gram negativas son las que presentan mayor sensibilidad a los compuestos. Esto lo fundamentaron por el hecho de que uno de los principales mecanismos de acción propuestos para los terpenoides consiste en la disrupción de la membrana celular bacteriana mediante 3 posibles vías: 1 - aumentando la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, 2. - afectando la estabilidad estructural de la membrana y 3 - desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica, cualquiera de estos 3 efectos produce la muerte en la célula bacteriana. (Maguna *et al*, 2006).

En base a los resultados obtenidos concluimos que el extracto *Cymbopogon nardus*, tiene actividad inhibitoria en las bacterias Gram negativas y Gram positivas antes mencionadas, en base a esto decimos que las plantas medicinales continúan siendo una fuente inagotable de obtención de fitofármacos.

Este trabajo se realizó con la finalidad de conocer la importancia que tiene la medicina natural, así como sus ventajas. Con los resultados obtenidos en este estudio se proponemos darle seguimiento, ya que obtuvimos resultados satisfactorios en un futuro se amplió la gama de productos en las áreas de tecnología farmacéutica y desarrollo analítico, como supositorios, cremas, etc.

8 Conclusiones

- ✚ Comprobamos el que se presentó un efecto antimicrobiano del extracto de Citronella (*Cymbopogon nardus*) en las diferentes bacterias: *Salmonella typhi*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia Coli*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- ✚ Logramos identificar por tinciones y pruebas bioquímicas a las bacterias *Salmonella typhi*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia Coli*, *Bacillus Subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- ✚ Obtuvimos el extracto *Cymbopogon nardus* con calidad microbiológica.
- ✚ Logramos obtener las Concentraciones Mínimas Inhibitorias del extracto *Cymbopogon nardus* en la bacterias antes mencionadas.
- ✚ Determinamos el efecto bactericida y bacteriostático que ejerce el extracto Citronela en bacterias Gram negativas y Gram positivas.
- ✚ La Microscopia Electrónica de Transmisión nos permitió observar el efecto que ejerce en las bacterias Gram (+) y Gram (-), el cual se presento a nivel de membrana y pared celular.

9 Bibliografía

1. Abarca V., K., García P., y Vial C P. (2001) **MICROBIOLOGÍA CLÍNICA**. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago de Chile.
2. Acosta G., S., I. (2005). **ENTEROCOCCUS**. Control de Infecciones Epidemiología. CO de INEP. Pp. 1-2
3. Bautista. (2000) **EVALUACIÓN DEL BIOENSAYO DE MTT PARA DETERMINAR LA PROLIFERACIÓN “IN VITRO” DE LINFOCITOS BOVINO FRESCOS Y CONGELADOS**. Conacyt – SAGAR.
4. Belland R, Ouellette S, Gieffers J y Byrne G. (2004) *Chlamydia pneumoniae* **AND Atherosclerosis**. **CELL MICROBIOL**. Vol. 6. No 2. Estados Unidos. Pp. 117 – 27.
5. Benítez S., J., G. (2008) *Staphylococcus aureus* **RESISTENTE A METICILINA (SARM) O SUPERBUG**. Artículo para médicos. Hospital Clínica. Ecuador.
6. Blanco J, Blanco M, Blanco J.E, Alonso M.P y Escribano A. (1993) **PATOGÉNESIS, EPIDEMIOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES PRODUCIDAS POR *Escherichia coli* ENTEROHEMORRÁGICAS PRODUCTORES DE VEROTOXINAS**. Enferm Infec Microbiol Clin. No 11. Pp. 325-334.
7. Calva E. (2001) *Salmonella typhi* **Y LA FIEBRE TIFOIDEA: DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR A LA SALUD PÚBLICA**. Instituto de Biotecnología, UNAM. México. Pp 3.
8. Castro C. (2006) **DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DE EXTRACTOS POR LA PRUEBA DE MTT**. Rev. Facultad de Medicina.
9. Cordies J., L., Machado R., A., y Hamilton C., L., M. (1998) **PRINCIPIOS GENERALES DE LA TERAPÉUTICA ANTIMICROBIANA**. Revista terapéutica Antimicrobiana.
10. Crowcroft N.S y Catchpole M. (2002) **LA TASA DE MORTALIDAD POR *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA EN INGLATERRA Y GALES: ANÁLISIS DE LOS CERTIFICADOS DE DEFUNCIÓN**. No 325. Pp.1390-1391.

11. Daza P., R.M. (1998) **RESISTENCIA BACTERIANA ANTIMICROBIANOS: SU IMPORTANCIA EN LA TOMA DE DECISIONES EN LA PRÁCTICA DIARIA.** Sección del Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Clínica Puerta de Hierro. Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud. Vol. 22. Madrid. Pp. 57-67.
12. Drasar BS y Hill MJ. (1974) **HUMAN INTESTINAL FLORA.** Academic Press. London, UK. Pp 49.
13. Embid A. (2008) **RESISTENCIA DE LAS BACTERIAS A LOS ANTIBIOTICOS.** Revista de Medicinas Complementarias. Medicina Holística. Nº 53. Pp. 45-46.
14. Flórez J., Armio J., A., y Mediavilla Á. (2005) **FARMACOLOGÍA HUMANA.** 4º edición. Editorial Masson. Barcelona España
15. Fraile M., R., y Cueto L., M. (1998) *Streptococcus agalactiae*. Servicio de Microbiología. Hospital Virgen de las Nieves, Granada. Control Calidad, SEIMC.
16. Gambero S., N. D. P. Secco V, R. Ferreira R.,, Deffune E., E. A. Machado P. (2004) **FREQÜÊNCIA DE HEMOLISINAS ANTI-A E ANTI-B EM DOADORES DE SANGUE DO HEMOCENTRO DE BOTUCATU.** Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. Vol. 26 no.1.
17. Gerlier Denis and Thomasset Nicole. (1994) **USE OFF MTT COLORIMETRIC ASSAY TO MEASURE CELL ACTIVATION.** Journal of immunological methods. Pp: 57-63.
18. Gonzales G., S, Ruiz V., M.R, Eliseo Hernández B., M. (2003) **GUIA DE MICROSCOPIA ELECTRONICA.** Primera edición. UNAM Cuautitlán.
19. Guerra O., M. (2004). **ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL Y CREMA DE *Cymbopogon citratus*.** Revista Cubana Planta Medicina; Centro de investigación y Desarrollo de Medicamentos. Vol. 9. Pp. 2.
20. Hart C. A. (1998). **LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS. ¿UN PROBLEMA CRECIENTE? .**Ed. Latinoamericana. Vol. 6. Pp. 147-148.

21. Heise E. (1982) **DISEASES ASSOCIATED WITH IMMUNOSPPRESSION.** Environ Health Perspect. Vol. 43. Estados Unidos. Pp. 9-19.
22. Iañez P., E. (1998) **CONCEPTO DE HISTORIA DE LA MICROBIOLOGÍA.** Universidad Nacional del Nordeste. México.
23. Ingrahomy J. L. y Ingraham A., C. (1998) **INTRODUCCIÓN A LA MICROBIOLOGÍA.** Editorial Reverté, S.A. Volumen II. España.
24. Izbizky G. y Minig L. (2004) **PREVENCIÓN DE LA INFECCIÓN PERINATAL POR ESTREPTOCOCCO GRUPO B.** Evidencia Actualización en la Práctica Ambulatoria. Vol. 7. Número 3. Hospital Italiano de Buenos Aires.
25. Izquierdo L. L. (2003) **BIOSÍNTESIS DEL LIPOPOLISACÁRIDO DE *Klebsiella pneumoniae*.** Universidad de Barcelona Facultad de Biología. Departamento de microbiología. Barcelona. Pp 4
26. Judd, W.S, Campbell, C.A, Kellogg, E.A, Stevens, P.F y Donoghue, M.J. (2002) **COMPUESTOS SECUNDARIOS DE PLANTAS. EN: SISTEMÁTICA VEGETAL: UN ENFOQUE FILOGENÉTICO.** 2^a. Ed. Sinauer Axxoc, capítulo 4. Estados Unidos.
27. Koneman E. Stephen D. Allen W., M. Janda P., C. Schereckenberg. (1999) **DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO, TEXTO Y ATLAS COLOR.** Ed. Medica Panamericana, 5a edición, Buenos Aires .Arg. Pp. 800-805
28. Lancet. (2006) ***Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA ES EL PATÓGENO RESISTENTE MÁS EXTENDIDO DEL MUNDO.** Revista de Microbiología.
29. Le Minor L y Popoff M.Y. (1987) **REQUEST FOR AN OPINION. DESIGNATION OF *Salmonella enterica* sp. Rev.** as the type and only species of the genus *Salmonella*. Int J Syst Bacteriol. Pp. 37: 465 – 468.
30. Libby SJ, Fang FC. (2008) **A NITRIC OXIDE-INDUCIBLE LACTATE DEHYDROGENASE ENABLES *Staphylococcus aureus* TO RESIST INNATE IMMUNITY.** Science.
31. Lisboa M., M. A. (2003) **EFFECTIVIDAD DE *Bacillus subtilis* Y DE UNA CEPA NATIVA DE *Trichoderma harzianm* SOBRE LA INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE PUDRICIÓN GRIS**

- (BOTRYTIS CINÉREA) EN VID VINÍFERA.** Universidad de Talca facultad de ciencias agrarias escuela de agronomía.Chile. Pp 20.
32. Lode H. y Stahlmann R. (2006) *Salmonella typhi*. Revista Zeitschrift für Chemotherapie. Steinplatz. Berlín. Antibiótico terapia.
33. Ludemann V., Zampa L., y Oddone S. (2007) **OLEORRESINAS Y ACEITES ESENCIALES, A BASE DE EXTRACTOS NATURALES.** Universidad Nacional de Quilmes.
34. Maguna F., P, Romero, A., M, Garro, O., A y Okulik Nora B. (2006) **ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE UN GRUPO DE TERPENOIDES.** UNNE. Universidad nacional del nordeste.
35. Mateos F., P. (2009) **AGENTES ANTIMICROBIANOS Y MICROORGANISMOS** Departamento de Microbiología y Genética. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca.
36. Margall N, Domínguez A, Prats G y Salleras L (1997) *Escherichia coli* **ENTEROHEMORRÁGICA.** Revista Española Salud Pública. No 71. Pp. 437-443.
37. Mgtra. Yamilka L. Sánchez A. (2009) **INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.** Universidad de Panamá-Facultad de Medicina .Departamento de Farmacología.
38. Morales Á., V. (2009) **ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE *Thymus vulgaris* EN LAS BACTERIAS: *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*; *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.** UNAM. FES-C. México
39. Mora M., A.L, Torres Ch., R, Rojas L., D. y Stashenko E. (2002) **ESTUDIO CROMATOGRÁFICO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE LAS ESPECIES *Cymbopogon citrus* y *Cymbopogon nardus*.** Laboratorio de Productos Naturales UNALMED. Colombia.
40. Murray Patrick R. (2006) **MICROBIOLOGÍA MÉDICA.** 4° ed. Elsevier Science. Editorial México.
41. Ojeda S., J. (1997) **MÉTODOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO EN BIOLOGÍA** Univ. de Cantabria.

42. Padrón G. G., González C., M. (2003) *Bacillus subtilis* **INMOVILIZADO EN ESPUMADAS BIODEGRADABLES PARA MODIFICAR LAS RESPUESTAS AL ESTRÉS SALINO EN HORTALIZAS**. Vol. 3, N°2.3. Pp. 397-406.
43. Paredes F., y Roca J., J (2004). **ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS, PERSPECTIVA DE LA MEDICINA ANTIMICROBIANA**. Ámbito Farmacéutico. Farmacología. ELSEVIER. Vol. 23. Número 3. Pp. 116-117.
44. Patterson MJ. (1996) *Streptococcus* **IN: BARON'S MEDICAL MICROBIOLOGY**. 4th ed. Editorial Univ of Texas Medical Branch.
45. Pedrique de A., M., y Gutiérrez de G. S. (2002) **CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LOS AGENTES ETIOLÓGICOS DE LAS ENFERMEDADES ESTUDIADAS EN LOS CASOS DE LA ASIGNATURA MICROBIOLOGÍA (REGIMEN ANUAL)**. Pp.58, 11.
46. Pérez A., Y. (2008) **DETERMINACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE TRES EXTRACTOS NATURALES: *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa*, (SOLOS Y COMBINADOS) EN BACTERIAS AISLADAS DE CASOS DE MASTITIS BOVINA.**” Edo de México. Cuautitlán Izcalli. UNAM. FES.C.
47. Pérez, M. A. Brito y A. Guzmán. (2002) **RESISTENCIA DE *Klebsiella pneumoniae* A LOS ANTIMICROBIANOS EN VENEZUELA: ANÁLISIS DE UNA DÉCADA**. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* Vol.21. No.2. Pp.14 -22.
48. Ramírez Z., G., A. (2009) **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE *Eucalyptus globulus* CON *Bacillus Cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. TODAS ESTAS DE IMPORTANCIA MÉDICA**. Edo de México. Cuautitlán Izcalli. UNAM. FES.C.
49. Reeves MW, Evins Gm, Heiba A, Plikaytis BD Farmer JJ. (1989) **CLONAL NATURE OF *Salmonella typhi* AND ITS GENETIC RELATEDNESS TO OTHER *Salmonella* AS SHOWN BY MULTILOCUS ENZYME ELECTROPHORESIS, AND PROPOSAL OF *Salmonella bongoricom***. nov. *J Clin Microbiol.* Pp. 313 – 320.
50. Roig T., J. (2002) **INSTRUCTIVO TÉCNICO DEL CULTIVO DE *CYMOPOGON CITRATUS* (D.C) STAPF (CAÑA SANTA)**. *Rev Cub Plant Med* Vol. 7, 02.

51. Romero M. y Goldsmidt G. (2004) **PLANTAS AROMÁTICAS: TRATADO DE AROMATERAPIA CIENTÍFICA**. Editorial Kier, Buenos Aires, Argentina.
52. Rubeglio E. y Tesone, S. (2007) **Escherichia coli O157 H7: PRESENCIA EN ALIMENTOS NO CÁRNICOS**. *Arch. Argent. Pediatr.* Vol .105. No.3. Argentina. Pp.193-194.
53. Salazar R., González R., D., Palma M. (2002) **SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA Y SEROTIPAJE DE Pseudomonas aeruginosa AISLADAS DE PACIENTES VIH/SIDA**. *Revista cubana*. No 54. Pp. 142-146.
54. Soberón Ch. G. (2003) **Pseudomonas aeruginosa: UNA BACTERIA FASCINANTE Y TEMIBLE**. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F.
55. [Suárez P., Maritza](#). (2002) **TENDENCIA ACTUAL DEL ESTREPTOCOCO COMO INDICADOR DE CONTAMINACIÓN FECAL**. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. *Rev. Cubana Hig Epidemiol.* No 40. Pp 38-43.
56. Tafur J., D., Torres J., A. y Villegas M., V. (2008) **MECANISMO DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS**. Vol.12. No. 3. CIDEIM. Colombia.
57. TM Hooton, M.D. and SB Levy, M.D. (2001) **RESISTENCIA ANTIMICROBIANA: UN PLAN DE ACCIÓN PARA LA PRÁCTICA COMUNITARIA**. *American Family Physician*.
58. Tremino R., A. (2003) **PRESENCIA DE Escherichia coli O157: H7, Listeria monocytogenes y Salmonella spp. EN ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL EN COSTA RICA**. Editorial ALAN. Vol.53. No.4. Pp. 389-392.
59. Vázquez C., E. (2003) **TERPENOS**. Instituto de Química, UNAM. Bioquímica y biología molecular en línea.
60. Vergara G., J. (2009) **DETERMINACION DEL EFECTO VASORRELAJANTE DE laelia anceps, Laelia speciosa y Laelia autumnalis**. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Facultad de Farmacia. Laboratorio de Farmacognosia y Química de Productos Naturales. Tesis doctoral. Cuernavaca Morelos.

61. Villarroel, E., Navarro, P., Ramos, R. (2002) *Escherichia coli* **IDENTIFICADAS EN PACIENTES CON INFECCIONES URINARIAS: SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA**. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* Vol.22. No.1. P. p.18-21.
62. Wenzel RP, Reagan, Bertino JS. (1998) **METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* BROTE: INFECT CONTROL**. Revista consenso de la definición y directrices de gestión. No; 26. Año 1998. Pp. 102-110.
63. Young G., G. (1972) **WITTON`S MICROBIOLOGIA**. Cuarta edición. Editorial continental, S.A. México.
64. Zambrano F., Alcides y Herrera A. (2004) **SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* AISLADAS EN EL LABORATORIO DEL HOSPITAL REGIONAL DR. LEONARDO GUZMÁN DE ANTOFAGASTA**. Revista. Chile. *Infectologia. Chile.* Pp.117-124.

ENLACES

<http://www.bio-nica.info/Biblioteca/BacteriasEnfermedades.pdf>

<http://www.herbotecnia.com.ra>

http://es.wikipedia.org/wiki/Dimetil_sulf%C3%B3xido

10 Anexo

Tabla.18. Resumen de las diferentes pruebas realizadas en las 9 bacterias que se utilizaron en este trabajo y que nos permitieron constatar su identificación.

	<i>S. tiphy</i>	<i>E. Coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Stp Epidermidis</i>	<i>Strep. agalactiae</i>	<i>Strep. faecalis</i>	<i>Stp aereus</i>
RM	+	+	-	-	+	+	+	+	+
VP	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Malonatos	-	-	+	*	*	*	*	*	*
Citratos	+	-	+	+	*	*	*	*	*
Ureasa	-	-	+	*	*	*	*	*	*
MIO	+/-/+	+/+/+	-/-/+	*	*	*	*	*	*
SIM	+/-/+	-/+/+	*	*	*	*	*	*	*
BS	*	*	*	*	*	*	-	+	*
TSI	K/A/-/+	A/A/+/-	A/A/-/-	+	*	*	*	*	*
O/F	F	F	F	O	F	F	F	F	F
Nitratos	*	+	*	*	*	*	*	*	*
Coagulasa	*	*	*	*	*	*	*	*	+
CAMP	*	*	*	*	*	*	+	-	*
Motilidad	+	+	-	+/-	+	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Oxidasa	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Tinción Gram	-	-	-	-	+/-	+	+	+	+

*no se les realizó la prueba

G(+) = Gram positiva

G(-) = Gram negativa.

+ =resultado positivo

-=resultado negativo

A= acido

K =alcalino

O= oxidativo

F= fermentativo

Un punto importante que se debe mencionar es la realización de las pruebas primarias, se utilizan para determinar la familia y el género. Las pruebas primarias son: Gram, catalasa, oxidasa, movilidad, etc y las pruebas bioquímicas secundarias son específicas para las bacterias y sirven para identificar la especie (ej: producción de pigmentos, indol a partir de triptófano, de coagulasa, de fenilalanina deaminasa, etc.)

Tabla 19. Resultados obtenidos de la lectura en el elisometro, con las bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*.

Numero de pozos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	C/+	C/-	Bco
<i>E. coli</i>	-0.033	0.3395	0.654	0.484	0.5065	0.563	0.668	0.679	0.684	0.765	-1.002	1.127
<i>Klebsiella p.</i>	0.826	1.565	1.509	1.5695	1.1985	1.483	1.336	1.499	1.459	1.856	1.628	0.397
<i>Salmonella typhi</i>	0.658	0.315	0.6315	0.971	1.066	1.4075	1.440	1.131	1.493	1.191	-0.182	0.408
<i>Estap. aureus</i>	0.42	0.8195	1.274	1.2765	1.3535	1.265	1.105	1.227	1.514	1.46	-0.26	0.386

Promedio de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda 655nm.

COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

- Caldo Infusión Cerebro Corazón (BIOXON)

Cloruro de sodio	5.0g
Dextrosa	2.0g
Fosfato disodico	2.5g
Infusión de Cerebro de ternera	7.7g
Infusión de corazón de res	9.8g
Peptona de gelatina	10,0g

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

- Agar Infusión Cerebro Corazón (BIOXON)

Agar agar	15.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Dextrosa	2.0g
Fosfato disodico	2.5g
Infusión de Cerebro de ternera	12.5g
Infusión de corazón de res	5.0g
Peptona especial	10.0g

Disolver 52.0g del medio en un litro de agua destilada, calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante un minuto para disolver por completo, estandarizar la autoclave a 121C

(15 libras de presión) 15 minutos. Enfríar a 45 a 50 C, vaciar en cajas de Peri estériles pH =7.4 mas menos 0.2.

- Solución Salina Fisiológica

Disolver 0.9g de NaCl en un litro de agua destilada, agitar frecuentemente para disolver por completo, verter en tubos de ensaye y estandarizar la autoclave a 121C (15 libras de presión) 15 minutos, pH = 7.4 mas menos 0.2.

PREPARACION DE REACTIVOS

- MTT ò 3-[4,5-dimetiltiazol-2 y 1]-2,5-dimetiltetrazolio (SIGMA 21 28)

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

- Dimetil sulfòxido (SIGMA D-5879) DMSO.

Se usa a la concertación que viene del fabricante.

- Acido Fosfotùgstico

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

- Glutaraldehido-paraformaldehido (Karnosky)

Prepare una solución amortiguadora de fosfatos al 0.2M o una solución de cacodilato al 0.2N a pH 7.0. Prepare 20ml de una solución de paraformaldehido al 10% disolviendo 2g de paraformaldehido en polvo en 20ml de agua destilada calentando a 60-70C mientras se agita vigorosamente (en campana de extracción de gases). Agregue unas gotas de NaOH 0.2N hasta que la solución se vuelva transparente. Esperar a que se enfríe.

Ya fría la solución anterior se prepara el fijador.

Amortiguador de fosfatos al 0.2M	50ml
Paraformaldehido al 10% en agua	20ml
Glutaraldehido al 25% en agua	10ml
Agua destilada hasta volumen final de	100 ml

Tabla 20. HOJA TECNICA

CITRONELLA	
<i>Cymbopogon nardus</i>	CODÍGO 3051HC
DESCRIPCIÓN	Extracto hidroalcoholico de citronella
APARIENCIA	Líquido ligeramente turbio
COLOR	Ámbar
OLOR	Característico
MEDIO	Agua - Alcohol etílico
SOLUBILIDAD	Agua – Alcoholes
ESPECIFICACIONES	
INDICE DE REFRACCIÓN	1.3478 – 1.3638
°BRIX	10.0 – 20.0
MESOFILCOS AEROBIOS	< 100 ufc / ml
HONGOS Y LEVADURAS	< 100 ufc / ml
COLIFORMES	< 10 ufc / ml
COMPONENTES PRIMARIOS	Los terpenos, componentes del aceite volátil de olor agradable de la citronela, son responsables, en una gran parte, de los efectos relajantes y carminativos (alivio de los gases) de esta planta. Los flavonoides, los ácidos fenólicos y otros componentes parecen ser los responsables de los efectos antiherpéticos y reguladores de la tiroides de la citronela.
PROPIEDADES	Antibacteria, astrngente, humectante, cicatrizante.
USO	Cosmético.
ALMACENAMIENTO	Temperatura ambiente y protegido de la luz, si presenta precipitado agite hasta su completa incorporación