



**SEP**

**TECNM**

**DITD**

---

---

# **INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE ATLIXCO**

*Organismo Público Descentralizado del Gobierno del Estado de Puebla*

**DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA ANTIMICROBIANA DEL  
EXTRACTO ETANÓLICO DE LA FLOR DE SOSPÓ (*Pseudobombax ellipticum*)  
EN LAS BACTERIAS *Escherichia coli* 11229, *Escherichia coli* 25922, *Pseudomona  
aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538**

**OPCIÓN I.**

**TESIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**INGENIERO BIOQUÍMICO**

**PRESENTA:**

**YADIRA PÉREZ GONZÁLEZ**

**ASESOR INTERNO:**

**Dra. JOHANA RAMÍREZ HERNÁNDEZ**

**M.T.A. GUADALUPE GABRIELA BÁRCENA VICUÑA**

**ASESOR EXTERNO:**

**DR. JOSÉ DEL CARMEN REJÓN ORANTES**

ATLIXCO, PUE., AGOSTO, 2020.

*“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”*

*Marie Curie*

## **Dedicatoria**

A mi madre por siempre estar conmigo en todo momento, por su apoyo incondicional y su esfuerzo por alcanzar esta meta, por no permitir rendirme y ser mi motivación.

A mi padre y hermana por confiar en mí y por estar conmigo en todo momento.

A Jorge por ser parte importante en mi vida, su motivación constante, por su cariño incondicional, por su apoyo desde el principio hasta ahora.

## **Agradecimientos**

A la M.T.A. Gabriela Bárcena por brindarme la confianza para realizar este proyecto, por sus asesorías, por transmitir sus conocimientos y siempre impulsarnos a la superación, por paciencia y apoyo incondicional en todo momento.

A la Dra. Johana Ramírez por su apoyo, asesoramiento y motivación en el transcurso del proyecto.

Al Dr. José Rejón por su vinculación con el Tecnológico de Atlixco y pionero en este proyecto tan importante y por sus valiosas donaciones.

## Resumen

El proyecto tuvo como objetivo determinar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la flor de sospó (*Pseudobombax ellipticum*) contra los microorganismos *E. coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Se desarrolló un estudio experimental para especificar si dicho extracto presentaba actividad antimicrobiana a concentraciones de entre 300 y 700 µg utilizando como disolvente etanol puro.

Se evaluó la eficiencia del extracto a partir del método Kirby-Bauer el cual consiste en la determinación de la sensibilidad bacteriana ante los efectos antimicrobianos, en el que las cepas deben alcanzar su densidad óptica, esto con ayuda de un espectrofotómetro para medir la absorbancia, una medida de luz transmitida a través de la suspensión, es decir, en su etapa exponencial de acuerdo a la curva de crecimiento bacteriano, que es donde las bacterias tienden a un mayor desarrollo. Posteriormente las cepas fueron sometidas a dos controles un negativo (el disolvente), y un positivo; los antibióticos, nitrofurantoína, bencilpenicilina y ceftriaxona, y las diferentes concentraciones del extracto en un rango de entre 300 y 700µl, donde después de 24 horas se observaron resultados donde se comprobó la eficacia del extracto etanólico de la flor de sospó a partir de la formación de halos de inhibición, llegando a la conclusión, que el extracto etanólico de la flor de sospó a altas concentraciones, presenta actividad antimicrobiana, y consecuentemente una posible alternativa de antibiótico natural.

## Contenido

Introducción.....	1
Antecedentes .....	2
Justificación.....	4
Objetivos .....	5
Objetivo general.....	5
Objetivos específicos .....	5
Hipótesis .....	5
Capítulo 1. <i>Pseudobombax ellipticum</i> .....	6
Características.....	6
Taxonomía.....	6
Descripción.....	7
Origen, distribución y hábitat .....	8
Características ecológicas .....	8
Nombres comunes .....	9
Usos.....	9
Capítulo 2. Bacterias .....	10
Definición .....	10
Clasificación .....	10
<i>Escherichia coli</i> .....	11
<i>E. coli</i> enterotoxigénica .....	12
<i>E. coli</i> enterohemorrágica .....	13
<i>E. coli</i> enteroinvasiva .....	14
<i>E. coli</i> enteropatógena .....	14
<i>E. coli</i> enteroagregativa .....	15
<i>E. coli</i> de adherencia difusa.....	16
<i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	18
<i>Staphylococcus aureus</i> .....	19
Cultivo Bacteriano.....	20
Método Kirby-Bauer .....	20
Concentración Mínima Inhibitoria .....	22

Capítulo 4. Antibióticos.....	23
Definición .....	23
Nitrofurantoina .....	23
Bencilpenicilina .....	24
Ceftriaxona.....	24
Resistencia a los antibióticos .....	25
Capítulo 5. Metodología .....	26
Obtención del extracto etanólico .....	26
Recuperación de la cepa .....	26
Preparación del medio de cultivo. ....	27
Aislamiento de microorganismos. ....	27
Preparación del inóculo. ....	28
Inoculación de las placas.....	29
Colocación de los discos.....	29
Lectura de los halos de inhibición.....	30
Análisis e interpretación de datos .....	31
Resultados.....	32
<i>E. coli</i> 11229 .....	32
<i>E. coli</i> 25922 .....	33
<i>P. aeruginosa</i> .....	34
<i>S. aureus</i> .....	36
Conclusiones .....	38
Referencias.....	40
Anexos.....	42

## Índice de Figuras

Figura 1. <i>P. ellipticum</i> . a) hoja joven, b) hoja madura c) tallo d) árbol e,f) flor blanca y fruto g, h) flor rosa y fruto.....	8
Figura 2. Representación de las bacterias según su forma .....	10
Figura 3. Representación de las bacterias según Tinción de Gram .....	11
Figura 4. Centro de Investigación de Infecciones Helmholtz. imagen tomada mediante un telescopio electrónica una bacteria EHEC, una cepa de la bacteria ' <i>Escherichia coli</i> ' de alta resistencia a los antibióticos, en Braunschweig (Alemania). .....	12
Figura 5. Medical illustration of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . .....	18
Figura 6. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	19
Figura 7. Método Kirby-Bauer .....	21
Figura 8. Sensibilidad antimicrobiana en <i>E. coli</i> 11229, con concentraciones de 300 µl -500µl.....	22
Figura 9. Estructura química de nitrofurantoína .....	23
Figura 10. Estructura química de Bencilpenicilina.....	24
Figura 11. Estructura química de Ceftriaxona .....	25
Figura 12. Extracción de la cepa previamente activa.....	26
Figura 13. Representación gráfica de siembra por estría .....	27
Figura 14. Activación de las cepas, con agitación constante .....	28
Figura 15. Inoculación bacteriana.....	29
Figura 16. Colocación de los discos en agar Mc Conkey .....	30
Figura 17. Lectura de halos de inhibición utilizando la luz reflejada para medir las zonas sin crecimiento .....	30
Figura 18. Zona de inhibición. ....	31

## Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía de <i>Pseudobombax ellipticum</i> .....	6
Tabla 2. Comparación del efecto antimicrobiano del extracto, con nitrofurantoína (control positivo) y etanol (control negativo) en <i>E. coli</i> 11229.....	32
Tabla 3. Comparación del efecto antimicrobiano del extracto, con bencilpenicilina (control positivo) y etanol (control negativo) en <i>E. coli</i> 25922.....	33
Tabla 4. Comparación del efecto antimicrobiano del extracto, con Nitrofurantoína (control positivo) y etanol (control negativo) en <i>P. aeruginosa</i> .....	34
Tabla 5. Comparación del efecto antimicrobiano del extracto, con Ceftriaxona (control positivo) y etanol (control negativo) en <i>S. aureus</i> .....	36

## Índice de gráficos

Gráfico 1. Comparación del promedio de inhibición del antibiótico, concentraciones y el solvente, en <i>E. coli</i> 11229.....	33
Gráfico 2. Comparación del promedio de inhibición del antibiótico, concentraciones y el solvente, en <i>E. coli</i> 25922.....	34
Gráfico 3. Comparación del promedio de inhibición del antibiótico, concentraciones y el solvente, en <i>P. aeruginosa</i> .....	35
Gráfico 4. Comparación del promedio de inhibición del antibiótico, concentraciones y el solvente, en <i>S. aureus</i> .....	36

## Introducción

Las enfermedades causadas por diferentes microorganismos son tan comunes como antiguas.

Al principio las enfermedades causadas por organismos patógenos fueron responsables de varias pérdidas humanas, sin embargo, con los avances tecnológicos y varios descubrimientos esto fue cambiando, y un número creciente de las enfermedades infecciosas pudieron ser tratadas.

Dos de los sucesos más importantes para el tratamiento de las enfermedades infecciosas fueron; el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming, en 1928, donde observó el crecimiento de un hongo contaminante (*Penicillium notatum*), junto a colonias de *Staphylococcus aureus* en proceso de lisis (1), concluyendo que este hongo producía una sustancia capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, fue a partir de ese momento donde surge la idea de desarrollar el primer antibiótico, sin embargo las dificultades técnicas para la producción de la penicilina no permitieron su uso masivo hasta 1944. No obstante, en 1935 se desarrolla el primer antibiótico de uso, las sulfonamidas obtenidas por síntesis por Gerhard Domagk a partir de colorantes y denominado Prontosil (1).

No obstante, con el paso del tiempo, lo que aparentemente era una solución, se volvió un problema en virtud que cada día es mayor la resistencia bacteriana.

Los pacientes con enfermedades de organismos patógenos, generaron una copia o modificación de sustancias presentes en dichos microorganismos, y estos a su vez generaron una especie de mecanismo de protección contra otras especies, (antibióticos), generando cierta resistencia a ellos, pero esto ha ido incrementando debido a que con el uso incorrecto de los antibióticos se genera que estos microorganismos desarrollen estos mecanismos de protección cada vez más complejos y el antibiótico no tenga el efecto que debería tener (2).

El presente proyecto tiene como objetivo determinar la actividad antimicrobiana presente en la flor se sospó en las diferentes cepas bacterianas *E. coli* 11229, *E. Coli* 25922, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 6583 y *Staphylococcus aureus* ATCC 27853.

## **Antecedentes**

En la medicina tradicional el empleo de la *Pseudobombax ellipticum* esta reportado como antimicrobiano (3).

En este proyecto se utilizaron 22 especies de plantas medicinales en el estado de Morelos, entre ellas *Pseudobombax ellipticum*, los extractos fueron utilizados a partir de hexano, acetona y metanol, todos los extractos mostraron actividad antioxidante. Sin embargo, los extractos de metanol parecían tener la mayor actividad antioxidante, por lo que fueron analizados con mayor precisión.

Estos nuevos extractos fueron 9, lo que permitió considerar algunas de las plantas estudiadas como una fuente potencial de antioxidantes de origen natural, entre ellas *Pseudobombax ellipticum* (3).

Un segundo estudio realizado por la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, por el Instituto de Ciencias Biológicas, en el año 2018, desarrolló un proyecto a partir de las Antocianinas y fotosíntesis durante el desarrollo foliar de *Pseudobombax ellipticum* (Kunth) Dugand, donde el objetivo principal fue establecer la asociación entre la presencia de antocianinas y la capacidad fotosintética durante la ontogenia foliar de *Pseudobombax ellipticum*.

La finalidad de este proyecto fue determinar si el color rojizo de las hojas en su etapa inicial de dicho árbol se debe a la presencia de antocianinas en las hojas, para esto se hizo un análisis con ayuda de un espectrofotómetro para medir la presencia y ausencia de antocianinas, además se utilizó un analizador infrarrojo de gases para medir su actividad fotosintética.

Como conclusión se descubrió que el desarrollo foliar de *Pseudobombax ellipticum* es de expansión rápida y maduración lenta.

Las fases tempranas del desarrollo de las hojas están acompañadas de la presencia significativa de antocianinas, a su vez la abundancia de estos pigmentos, está inversamente relacionada con la maduración del aparato fotosintético en fases ontogénicas foliares avanzadas (4).

Por último, un estudio realizado por el Instituto Tecnológico de la Zona Maya, en el año 2013, menciona que se desarrolló un monitoreo de la especie amapola (*Pseudobombax ellipticum*), con diferentes condiciones de crecimiento.

En este proyecto el objetivo fue el monitoreo de esta especie para su conocimiento y obtener una mayor información acerca de las características ideales de crecimiento del árbol de amapola, o flor de sospó, como las condiciones del clima, la temperatura, y el hábitat, para un mejor aprovechamiento del mismo.

Se ubicaron 5 árboles en diferentes puntos de ubicación, por edades; se analizaron por 6 meses, donde se concluyó que, el árbol de selva húmeda tuvo un mejor desarrollo debido a que es nativo de este tipo de climas, sugiriéndose el cultivo de este árbol a partir de plantaciones inventarios forestales, para un uso en años posteriores, como el uso de madera como triplay o chapa, así como sus flores y semillas como medicina tradicional.

## **Justificación**

La resistencia que presentan los microorganismos ante los diferentes antibióticos es cada día mayor, esto obliga a buscar nuevas alternativas para su tratamiento. Por tal motivo, se sugiere el empleo de plantas medicinales actúen como antibióticos, *Pseudobombax ellipticum* es un árbol cuya flor y corteza son utilizadas en la medicina tradicional, el empleo de la *P. ellipticum* esta reportado como antimicrobiano (3).

En este proyecto se propone evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la flor de sospó en *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, para determinar si tiene actividad inhibitoria sobre las cepas.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Determinar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la flor de *Pseudobombax ellipticum* contra *E. coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

### **Objetivos específicos**

1. Obtener diferentes diluciones del extracto etanólico de *Pseudobombax ellipticum*
2. Determinar la concentración mínima del extracto de la flor *Pseudobombax ellipticum* para inhibir a las bacterias *E. coli* 11229, *P. aeruginosa*, y *S. aureus*.
3. Comparar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Pseudobombax ellipticum* y un antibiótico de uso común contra diferentes cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, y *S. aureus*.

### **Hipótesis**

El extracto etanólico de la flor de sospó (*Pseudobombax ellipticum*) posee actividad antimicrobiana contra las bacterias *E. coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

## Capítulo 1. *Pseudobombax ellipticum*

### Características

El género *Pseudobombax* pertenece a la familia *Malvaceae* que está formado por 22 especies. Es un árbol de hasta 30 m de altura, 1.5 m de diámetro, tiene una corteza lisa gris clara verdosa, la corteza interna es de un color ligeramente rosado, cuando este tiene un corte rápidamente presenta pardeamiento. Las flores son grandes y vistosas, con pétalos que se asemejan a un color blanco o rosado, están tienen una característica muy especial ya que son en forma de estambres muy delgados. Tiene peciolos pulvinados de 6 a 25 cm de largo o más, has verde brillante, envés más pálido, florece de enero a junio y fructifica de marzo a julio.

### Taxonomía

Reino	<i>Plantae</i>
Filo	<i>Tracheophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Malvales</i>
Familia	<i>Malvaceae</i>
Género	<i>Pseudobombax Dugand</i>
Especies	<i>Pseudobombax ellipticum</i> <i>(Kunth) Dugand</i>

Tabla 1. Taxonomía de *Pseudobombax ellipticum*

## **Descripción**

**Corteza.** Lisa y fisurada verdosa con marcas grisáceas en los individuos adultos

**Hojas.** Digitado-compuestas, dispuestas en espiral y aglomeradas en las puntas de las ramas de hasta 45 cm de largo con todo y peciolo. Tienen 5 folíolos elípticos de 4 a 24 cm de largo por 1.8 a 14 cm de ancho, con el ápice redondeado o truncado, a veces cortamente acuminado, la base aguda, obtusa o truncada y el margen entero. El folíolo central es de mayor tamaño que los demás. Son glabros, tienen una coloración verde oscuro brillante en el haz y verde pálido en el envés.

**Flores.** Nacen solitarias o geminadas sobre pedúnculos rojizos. Son actinomorfas, tienen el cáliz tubular y la corola compuesta de 5 pétalos rosados hasta de 15 cm de largo, lineares y con el ápice redondeado. Al interior llevan numerosos estambres de color blanco o rosa intenso, de 10 a 12 cm de largo. El ovario es superior y está provisto de un estilo delgado de unos 13 cm de largo y retorcido en el ápice.

**Frutos.** Consisten en cápsulas dehiscentes, oblongos elipsoides, agudas en el ápice, pardo amarillentas en la madurez, de 15 a 25 cm de largo, con 5 surcos longitudinales, con el cáliz persistente y cupuliforme. Contienen numerosas semillas inmersas en una masa de pelos amarillentos y sedosos.

**Semillas.** Obovoides o globosas, redondeadas o reniformes, de 4 a 6 mm de largo por 3.7 a 4.4 mm de diámetro. En el extremo subbasal basal llevan un hilo circular o elíptico, blanquecino. La cubierta es de color castaño oscuro, opaca, lisa y cartácea. Contienen diversas cantidades de endospermo carnoso de color blanco y un embrión del mismo color, con los cotiledones contortuplicados (5).



Figura 1. *P. ellipticum*. a) hoja joven, b) hoja madura c) tallo d) árbol e, f) flor blanca y fruto g, h) flor rosa y fruto

### Origen, distribución y hábitat

El árbol de la flor de sospó es originario de las regiones tropicales húmedas y subhúmedas de América, su área de distribución comprende desde México hasta Guatemala, Belice y El Salvador.

En la República Mexicana habitan en los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo, Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Colima, Jalisco, Nayarit, Sinaloa, Puebla y Morelos (6).

### Características ecológicas

Especie intermedia que persiste hasta etapas avanzadas de la sucesión próspera, en los márgenes de los ríos y áreas con inundaciones estacionales, poco tolerante a la sombra y muy favorecida por la luz directa, se presenta por debajo de los 500 m de altitud en selvas altas perennifolias, mediana subperennifolia y subcaducifolias y bajas caducifolias. Sus semillas son dispersadas por el viento (6).

La propagación de recolección de semillas puede realizarse durante el mes de mayo, la viabilidad de las semillas es corta, la germinación de la semilla alcanza un promedio de 75% iniciados o tres días después de la de la siembra.

### **Nombres comunes**

*Pseudobombax ellipticum* tiene 60 nombres vernáculos, 33 de ellos en lenguas étnicas.

En el estado de Chiapas es conocido como Amapola, Bote, Carolina, Chospó, Chucté, Coquito, Güigüi, Ococ, Sospó. En otros estados es conocida como Amapola, Amapola blanca, Amapola colorada, Bailador, Bailarina, Cabellos de ángel, Ceiba, Clavellina, Clavellina roja, Coquito, Coquito blanco, Tambor, Tindusa, Yaco de costa (4).

### **Usos**

La madera es blanda y no recibe usos industriales, localmente es empleada para leña, cerca viva para delimitar terrenos y construcción de canoas.

La fibra algodonosa contenido en el fruto es empleada en diversas localidades para rellenar almohadas y cojines, es una especie de rápido crecimiento y se planta con frecuencia como ornamental a las orillas de los caminos, cementerios, atrios de iglesias, patios, parques y jardines por lo vistoso de sus flores de color rosa intenso o blanco.

Las flores y la corteza son utilizadas en la medicina tradicional como ansiolítico y para controlar dolores estomacales (4).

Las semillas contienen un aceite que se emplea con fines de iluminación y para la fabricación de jabones de aroma.

## Capítulo 2. Bacterias

### Definición

Las bacterias son organismos procariotas unicelulares, es decir, carecen de núcleo y están conformados por una sola célula. Se encuentran en casi todas las partes de la Tierra.

Existen bacterias que son perjudiciales, llamadas patógenas, que son las responsables de enfermedades (*S. aureus*, *Salmonella*, y *Listeria*), asimismo existen bacterias buenas; como las que se encuentran en nuestro sistema digestivo.

La ciencia que estudia a las bacterias se llama bacteriología, una rama de la microbiología. Esta disciplina ha clasificado a las bacterias de acuerdo a su forma, o bien a la tintura que estas presentan.

### Clasificación

#### Bacterias según su forma:

1. Bacilos: Formas alargadas, como barras microscópicas
2. Cocos: Con forma esférica o redonda
3. Vibrios: con forma de sacacorchos o tirabuzón
4. Espirilos: con forma de hélice o espiral

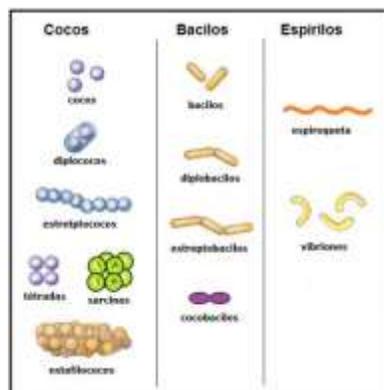


Figura 2. Representación de las bacterias según su forma

### Bacterias según su respuesta a la tinción:

1. Gram positivas: Adquiere un color violáceo o claramente violeta cuando se emplea el tinte
2. Gram negativas: Toman un color claramente rojo cuando se emplea el tinte.

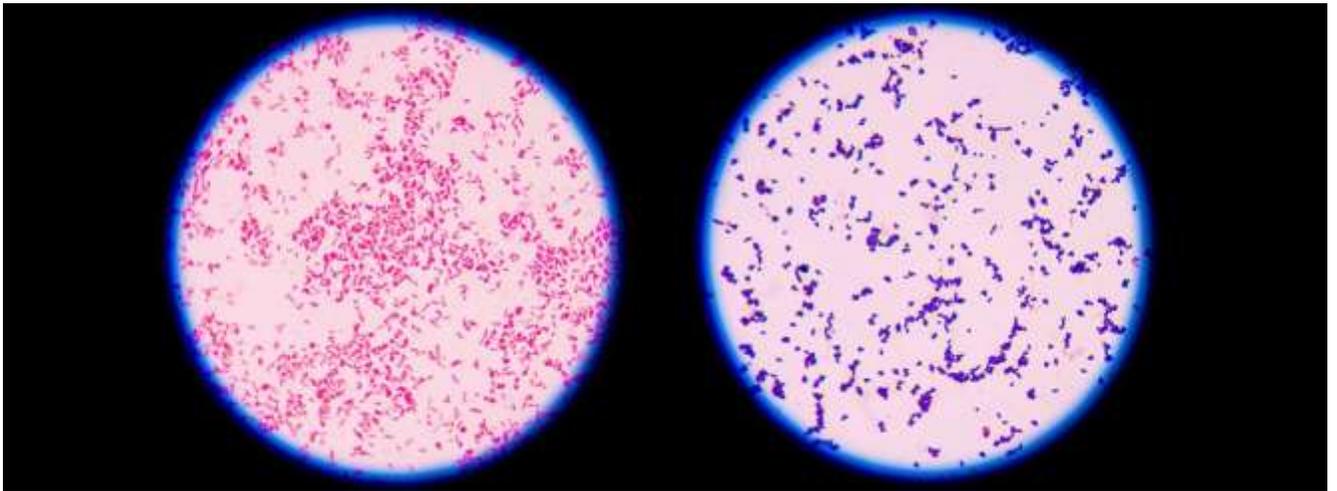


Figura 3. Representación de las bacterias según Tinción de Gram

### *Escherichia coli*

*Escherichia coli* se describió por primera vez en 1885 por el pediatra alemán Theodore Escherich. Fue nombrada inicialmente como “*Bacterium coli commune*”, pero en 1919 fue renombrada con el nombre actual en honor a su descubridor (7).

*Escherichia coli* es un bacilo gram negativo, de la familia *Enterobacteriaceae*, con un tamaño promedio de 1.1-1.5  $\mu\text{m}$  de ancho y 2.0-6.0  $\mu\text{m}$  de largo. Se consideran anaerobios facultativos y pueden ser móviles por la presencia de flagelos periticos o no móviles.

Las *E. coli* son causantes de dolores intestinales, generalmente no graves, sin embargo, existen algunas cepas que causan diarrea hemorrágica, lo que en ocasiones puede causar insuficiencia renal incluso la muerte.

Existen 6 tipos de *E. coli* descritos, que con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, son causantes de diarrea: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC),

enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC).



Figura 4. centro de Investigación de Infecciones Helmholtz. imagen tomada mediante un telescopio electrónica una bacteria EHEC, una cepa de la bacteria '*Escherichia coli*' de alta resistencia a los antibióticos, en Braunschweig (Alemania).

### ***E. coli enterotoxigénica***

Las ETEC colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA (colonization factor antigens), siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST). Sus genes están en un plásmido que también puede tener información genética para los CFA's, aunque algunos genes de ST se han encontrado en transposones. Las toxinas LT y ST aumentan el nivel intracelular de cAMP y cGMP respectivamente, que se encuentran en la membrana de las células intestinales, provocando la salida de agua y iones.

Las ETEC son importantes en lactantes, principalmente en niños menores de dos años, y en particular durante los primeros seis meses de vida. La frecuencia de aislamiento de este grupo patógeno de *E. coli* en niños con diarrea es de 10 a 30%. En los niños en edad escolar y en adultos puede ser asintomática y poco frecuente o producir la diarrea del viajero. La enfermedad tiene un periodo de incubación de 14 a 50 h. El cuadro clínico se caracteriza por diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presentan fiebre y vómito. La diarrea producida por ETEC puede ser leve, breve y autolimitada, pero también puede ser grave.

La contaminación fecal de agua y alimentos es la principal fuente de infección, siendo la dosis infectiva de 10<sup>8</sup> UFC (unidades formadoras de colonias) (8).

### ***E. coli enterohemorrágica***

Riley describió y relacionó a EHEC con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, cuadro al que se le llamó colitis hemorrágica (CH) y que era debido a la ingestión de carne cruda o mal cocida. La bacteria aislada en todos los casos fue *E. coli* del serotipo O157:H7. Karmali en 1983, la asoció con casos aislados de síndrome urémico hemolítico (SUH) caracterizado por daño renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática, precedida por diarrea con sangre, con la presencia en heces de *E. coli* productora de una citotoxina con actividad en células Vero, por lo que se le llama verotoxina (VT), y a las cepas capaces de producirla se les denominó *E. coli* verotoxigénicas (VTEC). Además, se observó que la citotoxina se neutralizó con antitoxina obtenida a partir de *Shigella dysenteriae* tipo 1, por lo que también se le llamó "shiga-like toxin" o toxina semejante a shiga (SLT) o "shiga toxin" (STX), y a las *E. coli* capaces de producirla se les da el nombre de STEC.

La capacidad toxigénica de las cepas es necesaria para que el paciente desarrolle colitis hemorrágica y diarrea con sangre, ya que la citotoxina STX es el principal mecanismo de patogenicidad de EHEC y su síntesis está relacionada con la presencia del bacteriófago STX, que está insertado en el genoma. La STX actúa a nivel de síntesis de proteínas ya que se une a la subunidad 60S de los ribosomas de las células intestinales o renales del hospedero. En las cepas EHEC aisladas, se han encontrado las variantes STX1 y STX2 que son inmunológicamente diferentes, de tal manera que se pueden aislar bacterias que sintetizen alguna de las toxinas o ambas.

Además de la toxina, las EHEC tienen otros mecanismos de patogenicidad como el fenómeno de adherencia y esfacelación (A/E), y presentan el gene cromosomal *eae* que codifica para la proteína de membrana externa (OMP) de 94 kilodaltones (kDa), llamada intimina, cuya expresión es regulada por genes plasmídicos; el gene *eae* también se encuentra en las cepas

EPEC. Otro factor de patogenicidad es el plásmido pO157, de 60 megadaltones (MDa), que codifica para la enterohemolisina (8).

### ***E. coli enteroinvasiva***

El grupo EIEC y *Shigella spp* están relacionados genética y bioquímicamente ya que son descarboxilasa negativas, no móviles y lactosa negativa. El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posterior multiplicación de la EIEC dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes. La información genética para este mecanismo está en loci del cromosoma y del plásmido, además de tener la capacidad de elaborar una o más enterotoxinas que pudieran ser importantes en la producción de diarrea. Los genes necesarios para la invasión se encuentran en un plásmido de 140 MDa llamado pInv, que codifica para proteínas, como por ejemplo las Ipa y otras que están involucradas en el proceso de patogénesis.

Los síntomas característicos en personas infectadas por EIEC son diarrea acuosa, con sangre y moco, pero algunos casos sólo presentan diarrea, esta en ocasiones es indiferenciable de la que produce ETEC. Las cepas EIEC se asocian más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante (8).

### ***E. coli enteropatógena***

EPEC fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad. El proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de la microvellosidad, con polimerización de actina, que lleva a la alteración del citoesqueleto en el sitio de la unión de la bacteria, debido al aumento de los niveles de calcio intracelular y de proteína cinasa C, ha sido denominado adherencia y

esfacelamiento (A/E).2. La adherencia está mediada por pilis o fimbrias rizadas que se llaman Bfp (bundle-forming pilus) cuya información genética está codificada en un plásmido de 50-70MDa denominado EAF (EPEC adherence factor) y de algunos genes cromosomales. En la adherencia es necesaria la síntesis de una proteína de membrana externa de 94 kDa llamada intimina, codificada por el gene cromosomal eae y que sirve como señal en A/E.

EPEC puede ocasionar brotes o casos aislados de diarrea. Este grupo afecta principalmente a niños menores de seis meses y a los de dos años. También puede aislarse en adultos enfermos y sanos, principalmente cuando hay un factor predisponente como diabetes. La forma de transmisión de la enfermedad es fecal-oral por manos contaminadas de manipuladores de alimentos. Los reservorios de EPEC pueden ser niños y adultos con o sin síntomas.

El cuadro clínico que produce EPEC se manifiesta con diarrea aguda, la cual puede ser leve o grave, con vómito, fiebre baja y mala absorción (8).

### ***E. coli enteroagregativa***

Se entiende como diarrea persistente (DP), aquel episodio diarreico de más de 14 días de duración, de comienzo agudo y presunta etiología infecciosa, que afecta el estado nutricional y pone al paciente en riesgo sustancial de muerte. Desde el punto de vista operacional es un episodio diarreico que dura 14 días o más.

La cepa hipervirulenta, es una cepa atípica en muchos aspectos:

1. Se trata de una cepa híbrida de dos patotipos ya que es a la vez enteroagregativa y productora de la toxina Shiga del subtipo Stx2a. La combinación de genes de virulencia de estos patotipos no es frecuente y previamente se había observado en una cepa del serotipo O111:H2 responsable de un pequeño brote en niños con HUS ocurrido en Francia.
2. Pertenece a un serotipo (O104:H4) muy raramente aislado hasta la fecha en pacientes humanos y nunca observado en cepas aisladas de animales ni de alimentos.

3. Carece de la isla de patogenicidad LEE que lleva el gen *eae* que está presente en las cepas STEC más virulentas de los serotipos A y B.
4. También se diferencia de la mayoría de las cepas de STEC, en que es multiresistente, siendo productora de la beta-lactamasa de espectro extendido CTX-M-15 también presente en el clon intercontinental O25b:H4-ST131.

Además de genes de virulencia de STEC y EAEC, la cepa del brote posee factores de virulencia de cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC) que también están presentes en cepas del clon O25b:H4-ST131 (9).

### ***E. coli de adherencia difusa***

Las *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) son el sexto grupo de *E. coli* diarrogénicas reconocidas. Su asociación con diarrea es controversial. No se conoce la variabilidad en los patrones de adherencia de cepas clínicas (10).

La adhesión es el primer paso para mantener a los miembros de la microflora normal en el intestino; sin embargo, es también la primera etapa crítica en todas las infecciones diarreicas causadas por cepas patógenas de *E. coli*. Es importante, por lo tanto, comprender las características que subyacen a la adhesión de *E. coli* difusamente adherente. Estudios morfológicos han descrito que las cepas DAEC generan un fenotipo inusual de adherencia celular sobre el cultivo de células HEp-2, observándose la inducción de algunas proyecciones de la membrana celular, la prueba de FAS (tinción fluorescente para actina, por sus siglas en inglés) es una técnica alternativa que ha sido ampliamente usada para la identificación de la alteración histopatológica en el intestino, conocida como lesión A/E (adherencia y borramiento) causada por EPEC. La lesión se lleva a cabo mediante un mecanismo de virulencia complejo, que induce la degeneración de las microvellosidades y altera la morfología normal de la región apical del enterocito (10).

Muchos procariotas son móviles y esta capacidad de movimiento independiente se debe con frecuencia a una estructura especial, el flagelo. Un número creciente de estudios han incluido la motilidad mediada por los flagelos en la virulencia, como en la adhesión, la invasión y la

respuesta proinflamatoria en bacterias Gram negativas. Un patrón asociado a cepas DAEC fue la liberación de interleuquina 8 (IL-8) y su asociación con la motilidad. La prueba de la movilidad entonces puede ser un método sencillo a tomar en cuenta para predecir la capacidad patogénica de DAEC aislados en laboratorios (10).

### ***Pseudomona aeruginosa***

*Pseudomona aeruginosa* es un bacilo recto o ligeramente curvo, mide de 0.5 a 0.8  $\mu\text{m}$  x 1.5 a 4  $\mu\text{m}$  y suele presentarse en forma individual, aunque ocasionalmente se le puede observar en pares o en cadenas cortas. Posee un flagelo polar único que le confiere una gran movilidad, la cual aumenta en algunas cepas en las que se evidencian hasta tres flagelos polares; esta especie no es capsulada ni esporulada y en frotis teñidos es indiferenciable de las enterobacterias, crece con facilidad en diversos medios y produce en ocasiones un olor dulce y forma colonias lisas redondas (11). Se considera a esta especie como bacteria aerobia facultativa debido a la capacidad que tiene para crecer en medios anaerobios tomando el nitrógeno o arginina como terminal de aceptación de protones (12).

*P. aeruginosa* tiene tres formas principales de movilidad en función de la viscosidad del medio. Utiliza su único flagelo polar para nadar en medios acuosos y en bajas concentraciones de agar. La bacteria también posee pili tipo IV para realizar la motilidad por contracción sobre superficies sólidas o interfaces (11).

*P. aeruginosa* produce pigmentos que difunden en el medio; el principal es la piocianina (del griego “pus azul”) y corresponde a una fenacina no fluorescente de color azul-verdoso con pH neutro o ligeramente alcalino; otro pigmento es la pioverdina (fluoresceína) que es de color amarillo o amarillo-verdoso. Cabe señalar que la piocianina sólo es producida por este tipo de bacterias. Es un agente patógeno nosocomial, de amplia distribución mundial. Frecuentemente asociada con mayores tasas de mortalidad y elevados costos de los antibióticos. Puede sobrevivir en ambientes diferentes, incluyendo el suelo, las plantas y los animales.



Figura 5. Medical illustration of *Pseudomonas aeruginosa*.

### ***Staphylococcus aureus***

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$ , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Ogston introdujo el nombre de *Staphylococcus*, del griego *Staphyle* que significa racimo de uvas, para describir a los cocos responsables de inflamación y supuración. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas. La mayoría de los estafilococos producen catalasa (enzima capaz de desdoblarse el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos (14).

Las infecciones por *S. aureus* son a menudo agudas, piogénicas y superficiales, aunque también puede producir, con menor frecuencia, infecciones profundas como osteomielitis, neumonía y endocarditis aguda. A nivel nosocomial *S. aureus* es un importante agente de infecciones de herida quirúrgica, de prótesis y otras. También *S. aureus* es causa de una serie de infecciones producidas por toxinas como el síndrome del shock tóxico, la intoxicación alimentaria y el síndrome de piel escaldada. *Staphylococcus epidermidis* es integrante de la flora normal de piel, pero produce infecciones crecientes de piel y anexos, colonizando cuerpos extraños y también es causa de infecciones profundas en huéspedes inmunocomprometidos. *Staphylococcus saprophyticus* es causa de infección urinaria baja en la mujer joven (1).

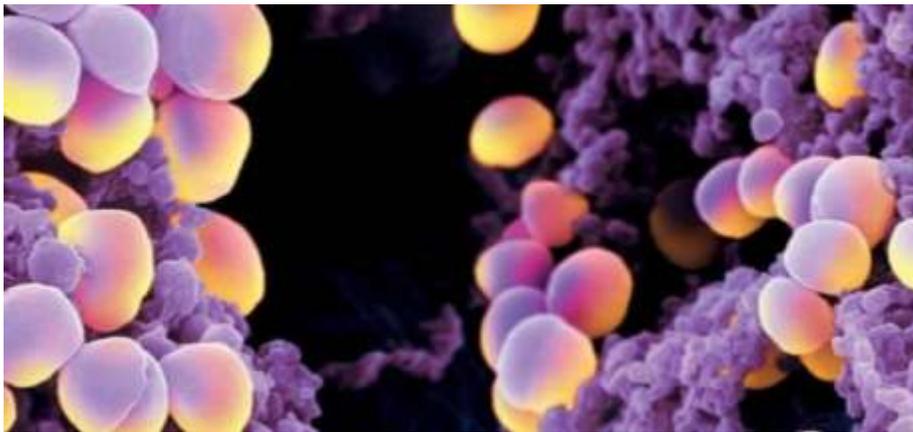


Figura 6. *Staphylococcus aureus*.

## **Cultivo Bacteriano**

Se conoce como cultivo bacteriano al proceso mediante el cual se propagan microorganismos, proporcionando las características de desarrollo adecuadas a cada microorganismo, como temperatura, fuentes de carbono, nitrógeno, vitaminas, agua, luz, entre otros.

Los microorganismos que son cultivados generan réplicas de sí mismos y requieren de los elementos que se encuentran en su composición química. Se le debe dar al microorganismo los nutrimentos necesarios para su desarrollo, por eso, generalmente los medios de cultivo consideran estas características de acuerdo a la cepa que se pretenda estudiar. Además, los microorganismos requieren energía metabólica con el objetivo de sintetizar macromoléculas y conservar los gradientes químicos esenciales a través de sus membranas. Durante el crecimiento se deben regular los factores nutricionales (carbono, nitrógeno, azufre y fósforo, elementos trazas y vitaminas) y los factores físicos (pH, temperatura, oxígeno, humedad, presión hidrostática, presión osmótica y radiación (15).

## **Método Kirby-Bauer**

Las pruebas de sensibilidad bacteriana se llevan a cabo mediante el antibiograma que sirve para medir la sensibilidad de una cepa bacteriana a uno o varios antibióticos. El estudio de la sensibilidad *in vitro* es uno de los requisitos previos para la eficacia *in vivo* de un tratamiento antibiótico. También es importante para realizar estudios sobre la evolución de las resistencias bacterianas que permite revisar los protocolos de la antibioticoterapia empírica (16).

Se entiende por antibiograma el resultado de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* llevadas a cabo para conocer el comportamiento de un microorganismo frente a determinados antibióticos, cuyos resultados se expresan en términos de "sensibilidad" y "resistencia" (17).

El método de Kirby-Bauer consiste en medir la sensibilidad bacteriana a partir de discos de papel de filtro, un disco que contiene una cantidad específica de antimicrobiano, este es

aplicado a una superficie de agar inoculado con un microorganismo, El antimicrobiano difunde desde el disco al medio de cultivo produciendo una zona de inhibición en la cual una concentración crítica de antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano. La zona de inhibición es medida y se relaciona inversamente con la CMI.

El microorganismo a investigar se inocula en una o varias placas de agar y sobre su superficie se disponen los discos correspondientes a varios antibióticos. Se incuban las placas durante 16-24 horas y se estudia el crecimiento en ellas. Se valora el diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco, de esta manera se sabe si el microorganismo es Sensible, Intermedio o Resistente a cada uno de los antibióticos (16

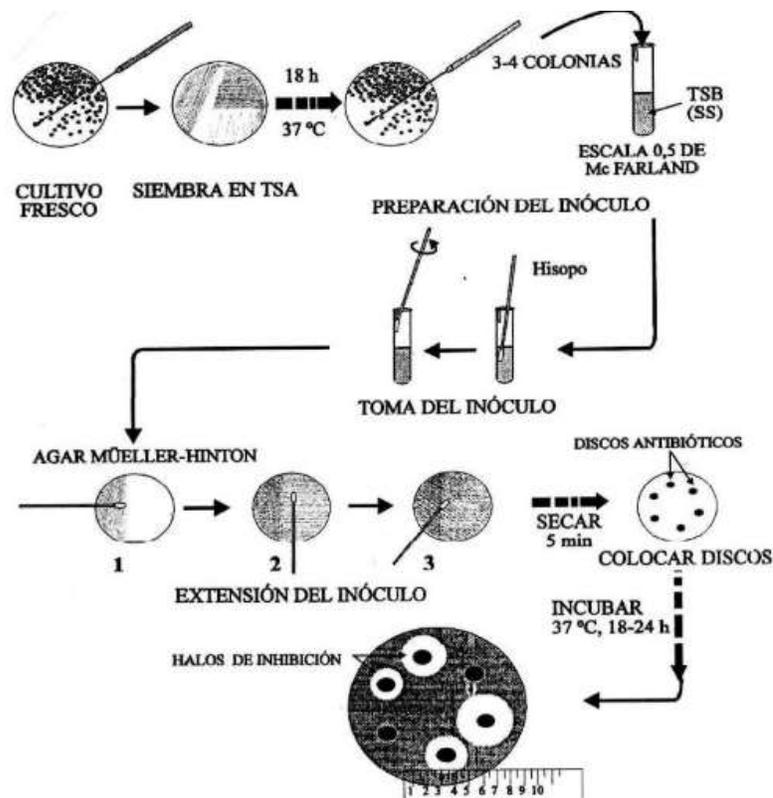


Figura 7. Método Kirby-Bauer

## Concentración Mínima Inhibitoria

Concentración Mínima Inhibidora (CMI) es la medida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico. La CIM se define como la menor concentración de una gama de diluciones de antibiótico que provoca una inhibición de cualquier crecimiento bacteriano visible. Es el valor fundamental de referencia que permite establecer una escala de actividad del antibiótico frente a diferentes especies bacterianas.

Hay diferentes técnicas de laboratorio que permiten medir o calcular de rutina, y de manera semicuantitativa, estos métodos se conocen como CIM (métodos manuales y métodos automatizados o semiautomatizados). Los métodos de rutina permiten categorizar una cierta cepa bacteriana en función de su sensibilidad frente al antibiótico probado. Esta cepa se denomina Sensible (S), Intermedia (I) o Resistente (R) al antibiótico.

Para un determinado antibiótico, una cepa bacteriana es, según el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS):

1. Sensible, si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual.
2. Resistente, si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento.
1. Intermedia, cuando el éxito terapéutico es imprevisible. Se puede conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones (fuertes concentraciones locales o aumento de la posología) (18).



Figura 8. Sensibilidad antimicrobiana en *E. coli* 11229, con concentraciones de 300 µl -500µl

## Capítulo 4. Antibióticos

### Definición

Un antibiótico es una sustancia de origen biológico, producida por microorganismos y que tiene la capacidad de eliminar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Sin embargo, en la actualidad, también los producimos nosotros de forma artificial, y es por eso que se utiliza el término antimicrobiano, que incluye todas las sustancias, sintéticas y biológicas, con actividad inhibitoria contra microorganismos (19).

### Nitrofurantoina

La nitrofurantona es un antibiótico, que se usa en tratamientos de infecciones urinarias levemente graves. Eficaz para el tratamiento de bacterias Grampositivas y Gramnegativas.

La nitrofurantoína fue aprobada por la FDA en 1953 para el tratamiento de la infección del tracto urinario inferior. La nitrofurantoína es un antimicrobiano sintético creado a partir de furano y un grupo nitro agregado y un cambio lateral que contiene hidantoína.

La nitrofurantoína es bactericida contra los patógenos del tracto urinario más comunes; *E. coli*, *Enterococos.*, *Klebsiella*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Enterobacter* (20).



Figura 9. Estructura química de nitrofurantoína

## Bencilpenicilina

Se le conoce como Penicilina G o penicilinas naturales, Es un antibiótico betalactámico bactericida, por tanto, no activa frente a organismos productores de penicilinas (beta-lactamasas). Se le puede asociar la procaína y la benzatínica para aumentar su vida media en el organismo.

Las penicilinas G más utilizadas comercialmente son las sódicas, potásicas, benzatínica, y procaína (21).

La penicilina G benzatínica y penicilina G procaína sólo se pueden administrar por vía intramuscular (22).

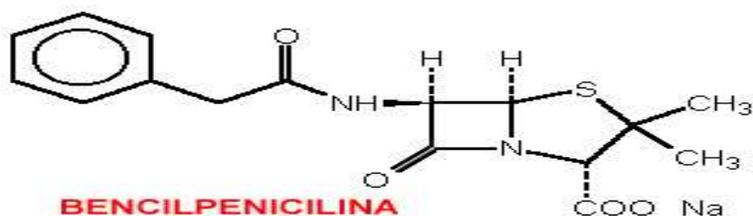


Figura 10. Estructura química de Bencilpenicilina

## Ceftriaxona

Es un antibiótico llamado Cefalosporina, de tercera generación, la ceftriaxona se usa para tratar muchos tipos de infecciones bacterianas, incluyendo tipos severos o que amenazan la vida, como la meningitis. La ceftriaxona también se usa para prevenir infección en las personas que tiene ciertos tipos de cirugía (23).

Tiene un espectro antimicrobiano similar a cefotaxima. Espectro de actividad basado en bacterias aerobias Gram negativas, con mayor actividad que las cefalosporinas de 2ª generación frente algunas bacterias, y en cocos Gram positivos, pero con menor actividad que la cefuroxima, especialmente frente a *S. aureus*, inactiva frente *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus sp.* resistentes a la meticilina y *Enterococcus sp* (24).

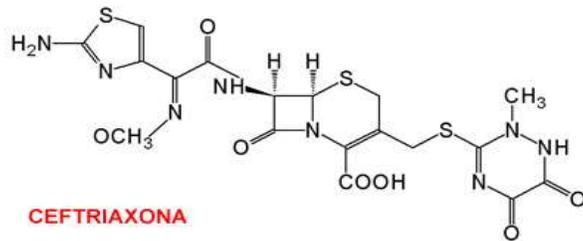


Figura 11. Estructura química de Ceftriaxona

### Resistencia a los antibióticos

La resistencia a los antibióticos es hoy una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo, puede afectar a cualquier persona, sea cual sea su edad o el país en el que viva, es un fenómeno natural, aunque el uso indebido de estos fármacos en el ser humano y los animales está acelerando el proceso (25).

La resistencia de las bacterias a los antibióticos puede ser natural, provenir de mutaciones o bien originarse por transferencia de genes. Cuando todas las cepas pertenecientes a la misma especie son resistentes a un antibiótico, se habla de resistencia natural. Ésta puede producirse por particularidades de la pared bacteriana que impiden acceder el antibiótico a su blanco, es el caso de las bacterias Gram negativas que son impermeables a la penicilina G. En otros casos algunas bacterias como los micoplasmas carecen de una pared celular típica y son resistentes a las penicilinas. También el organismo puede alterar el antibiótico pasándolo a una forma inactiva por la producción de enzimas que hidrolizan o modifican la molécula. Cuando la resistencia bacteriana sólo aparece en algunas cepas de una especie normalmente sensible se habla de resistencia adquirida, que es la forma más habitual de su presentación y puede ser por mutación o por la adquisición de nuevos genes (26).

## Capítulo 5. Metodología

### Obtención del extracto etanólico

El extracto etanólico de la flor de *Pseudobombax ellipticum* fue obtenido y proporcionado por el Laboratorio Experimental de Farmacobiología de la Facultad de Medicina Humana de la UNACH a cargo del Dr. José del Carmen Rejón Orantes.

### Recuperación de la cepa

De la muestra de la cepa se toman 100  $\mu\text{l}$  y se colocan en 10 ml del medio previamente estéril. El tubo debe estar bien sellado para evitar alguna fuente de contaminación, esta se debe dejar en una incubadora para su crecimiento, por 24 horas, a una temperatura idónea, por lo que fue a 37 °C en constante agitación.

Una vez transcurrido el tiempo de crecimiento, se prosigue a la crio congelación, este método consiste en tomar una muestra de 500  $\mu\text{l}$  de la cepa ya activa y verter en 500  $\mu\text{l}$  de glicerol contenido en un tubo ependor, y mezclarlos de manera que no se generen burbujas y que la mezcla sea homogénea, se rotula y se somete a una congelación a temperatura -20 °C.



Figura 12. Extracción de la cepa previamente activa.

### Preparación del medio de cultivo.

Se realizaron los cálculos necesarios para determinar el porcentaje de agar y agua a utilizar, siguiendo las especificaciones del envase, donde se especificó que para cada litro de agua se necesitaron 50 g de agar; se esterilizó en autoclave a una temperatura de 102 °C por 15 minutos y se distribuyó de forma aséptica en cajas Petri con un aproximado de 37 mL en cada una, dejándose solidificar el medio a temperatura ambiente.

### Aislamiento de microorganismos.

Se consideraron colonias aisladas, ya que garantiza la obtención de cultivos puros. Este método consistió en tomar la muestra con un asa bacteriológica ya estéril y colocarla en la caja Petri con el medio previamente solidificado haciendo movimientos por toda la caja en forma de zigzag.

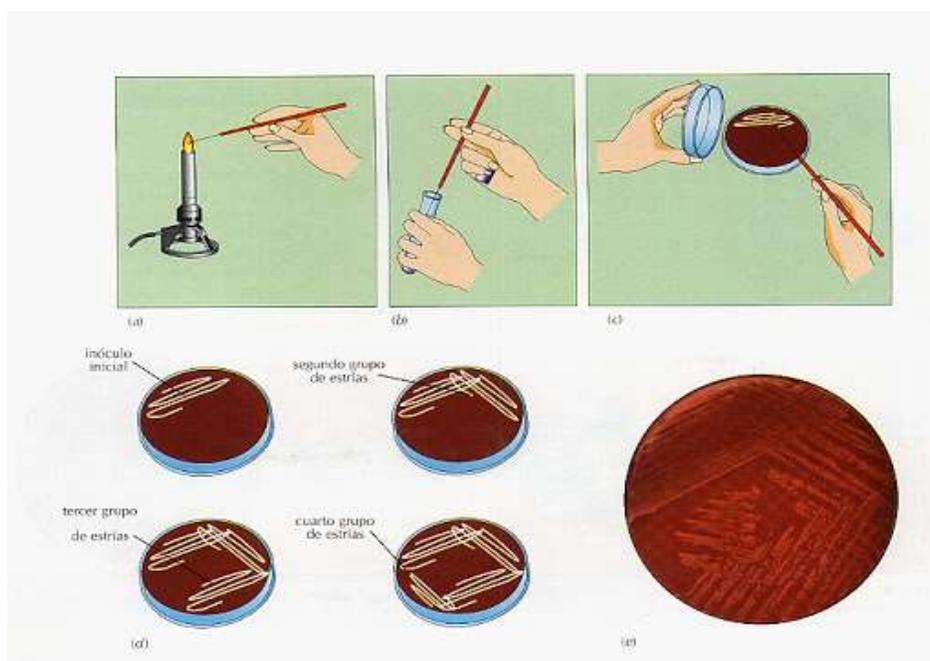


Figura 13. Representación gráfica de siembra por estría

Aislamiento de microorganismos por estría cruzada. (Argeneua K., 2015)

### **Preparación del inóculo.**

Se seleccionaron 3 colonias aisladas de los microorganismos y se colocaron en un tubo con 10 ml de caldo de Müller Hinton previamente estéril, se incubó a 37 °C por aproximadamente de 2 a 3 horas hasta que se alcanzara la densidad óptica es decir en un rango de 600 a 750 nm, con ayuda de un espectrofotómetro, que mide la relación de la absorbancia con el número de microorganismos, esto es el estado exponencial de acuerdo a la curva bacteriana.



Figura 14. Activación de las cepas, con agitación constante

### **Inoculación de las placas**

Se introdujo un hisopo en la suspensión, haciendo movimientos circulares por todo el tubo, y se prosiguió a colocar el inoculo en las placas, procurando hacer la siembra uniforme y por toda la placa.



Figura 15. Inoculación bacteriana

### **Colocación de los discos**

Se colocaron discos de papel filtro sobre la siembra una vez sumergidos en diferentes diluciones (antibiótico para el control positivo, etanol, control negativo y diferentes concentraciones del extracto), con ayuda de pinzas estériles, tratando de que la distancia entre cada uno fuera igual para observar adecuadamente la reacción en las cepas.

Posteriormente las placas fueron colocadas hacia abajo en la incubadora por 24 horas a 37 °C para observar cambios.



Figura 16. Colocación de los discos en agar Mc Conkey

### **Lectura de los halos de inhibición**

Una vez transcurridas 24 horas de incubación se revisaron las placas para observar el comportamiento del extracto y medir los halos de inhibición (incluyendo el diámetro del disco) con un vernier.



Figura 17. Lectura de halos de inhibición utilizando la luz reflejada para medir las zonas sin crecimiento

### Análisis e interpretación de datos

Se realizó una comparación del comportamiento de los halos de inhibición para observar con mayor precisión la efectividad del extracto.

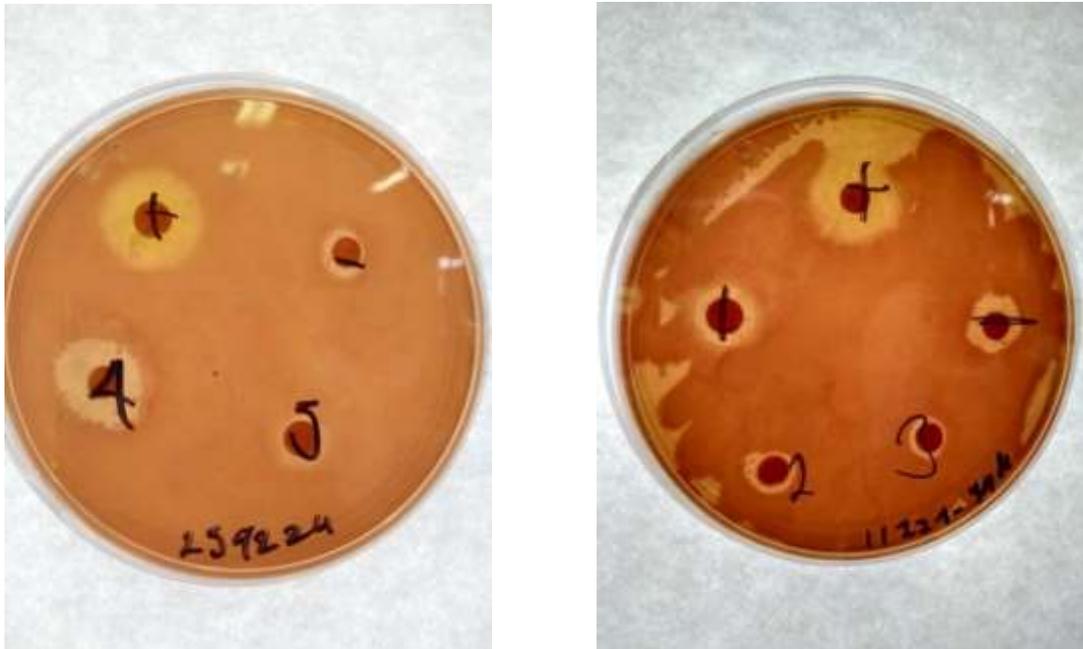


Figura 18. Zona de inhibición.

## Resultados

Los datos obtenidos en la medición de los halos de inhibición fueron registrados en tablas que se muestran a continuación, donde se hace una comparación estadística de los resultados que presentan las diferentes concentraciones del extracto y dos controles; un positivo (antibiótico), y un negativo (solvente).

### *E. coli* 11229

<i>E. coli</i> 11229							
Concentración( $\mu$ L)/control	Tamaño de los halos (mm)			Promedio (mm)	Varianza	Desv. Estandar	Coef. De variación
(+)	6.81	4.98	2.66	4.8167	4.32563333	2.0798157	0.431795646
(-)	1.37	2.45	0	1.2733	1.50763333	1.22785721	0.964285769
300	2.49	2.22	2.18	2.2967	0.02843333	0.16862186	0.07342026
400	2.32	1.53	1.23	1.6933	0.31703333	0.56305713	0.332514054
500	2.06	1.4	1.51	1.6567	0.12503333	0.35360053	0.213440963
(+)	2.49	1.83	2.54	2.2867	0.15703333	0.39627432	0.173297806
(-)	1.53	3.78	0	1.7700	3.6153	1.90139423	1.074234026
600	2.04	0.96	0	1.0000	1.0416	1.02058807	1.020588066
700	1.53	0.99	0	0.8400	0.6021	0.77595103	0.923751225

Tabla 2. Comparación del efecto antimicrobiano del extracto, con nitrofurantoina (control positivo) y etanol (control negativo) en *E. coli* 11229.

De acuerdo con la tabla se puede observar que para el caso de *E. coli* la concentración a 300  $\mu$ l presenta una mayor inhibición, con un promedio de 2.29 mm, y es aceptada por que no presenta una variación significativa al comparar su varianza, así como también su desviación estándar, sin embargo, su actividad inhibitoria es menor en comparación con la del antibiótico, que presenta un halo de 4.81 mm para ese experimento.

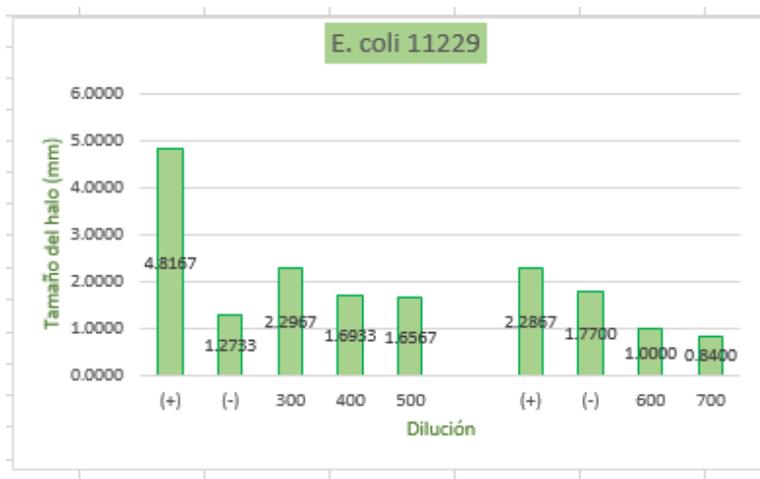


Gráfico 1. Comparación del promedio de inhibición del antibiótico, concentraciones y el solvente, en *E. coli* 11229

De igual forma en esta gráfica se puede observar que la dilución de 300  $\mu$ l presenta una mayor inhibición a la cepa, sin embargo, por debajo del control positivo.

### *E. coli* 25922

<i>E. coli</i> 25922								
Concentración( $\mu$ l)/control	Tamaño de los halos (mm)			Promedio (mm)	Varianza	Desv. Estandar	Coef. De variación	
(+)	3.42	3.62	3.02	3.3533	0.09333333	0.30550505	0.091104885	
(-)	2.27	1.29	0	1.1867	1.29623333	1.13852243	0.959429018	
300	3.1	1.39	2.15	2.2133	0.73403333	0.85675745	0.387089211	
400	2.46	1.97	0	1.4767	1.69543333	1.30208807	0.881775214	
500	3.18	1.09	0	1.4233	2.61143333	1.61599299	1.13535807	
(+)	6.23	4.25	6.13	5.5367	1.24413333	1.11540725	0.201458263	
(-)	5.08	1.45	2.84	3.1233	3.35443333	1.83151122	0.586396334	
600	3.58	4.37	1.46	3.1367	2.26443333	1.50480342	0.479746043	
700	1.96	1.15	0	1.0367	0.97003333	0.9849027	0.950066916	

Tabla 3. Comparación del efecto antimicrobiano del extracto, con bencilpenicilina (control positivo) y etanol (control negativo) en *E. coli* 25922

En *E. coli* 25922, quien presenta un mayor promedio en los halos de inhibición es la concentración de 600  $\mu$ l, con un promedio de 3.1367, sin embargo, esta opción es rechazada ya que la desviación estándar es mayor a 1, con un total de 1.504 mm, por lo que existe un margen de error mayor, por lo tanto, considero como mi dilución al promedio de la

concentración de 300 µl de 2.2133 mm y una desviación estándar de 0.856, pero es menor al tamaño que presenta el antibiótico sobre la cepa.

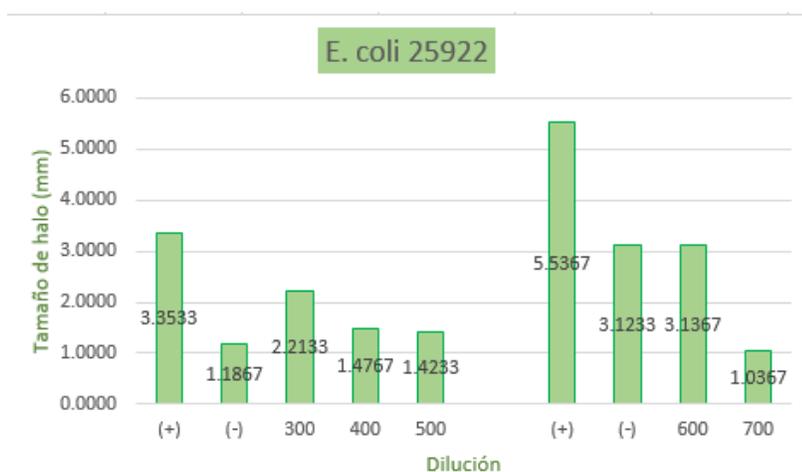


Gráfico 2. Comparación del promedio de inhibición del antibiótico, concentraciones y el solvente, en *E. coli* 25922

En este gráfico, se observa que en el experimento 1, quien tiene una mejor inhibición es la concentración de 300 µl, y en el experimento 2, la concentración a 600 µl se tienen mejores resultados de manera general, sin embargo, para un análisis global se acepta el resultado del experimento 1, por lo descrito anteriormente.

### *P. aeruginosa*

<i>Pseudomona aeruginosa</i>								
Concentración(µl)/control	Tamaño de los halos (mm)			Promedio (mm)	Varianza	Desv. Estandar	Coef. De variación	
(+)	4.64	4.84	4.09	4.5233	0.15083333	0.38837267	0.085859839	
(-)	3.4	0.31	3.49	2.4000	3.2781	1.8105524	0.754396834	
300	2.75	2.37	3.2	2.7733	0.17263333	0.41549168	0.14981671	
400	1.61	0.81	1.81	1.4100	0.28	0.52915026	0.375283874	
500	2.64	0	1.04	1.2267	1.76853333	1.32986215	1.084126751	
(+)	4.51	6.15	6.77	5.8100	1.3636	1.16773285	0.200986721	
(-)	0.18	0	0	0.0600	0.0108	0.10392305	1.732050808	
600	1.94	2.5	2.33	2.2567	0.08243333	0.28711206	0.127228386	
700	0	0	1.85	0.6167	1.14083333	1.068098	1.732050808	

Tabla 4. Comparación del efecto antimicrobiano del extracto, con Nitrofurantoína (control positivo) y etanol (control negativo) en *P. aeruginosa*.

En la cepa de *P. aeruginosa* la concentración que presenta una mayor inhibición es de 300  $\mu$ l, con un promedio de halos de inhibición de 2.773, sin embargo, sucede algo parecido en el ejemplo anterior, por lo tanto, considero como una mejor concentración inhibitoria la de 600  $\mu$ l, con una desviación estándar de 0.287, y un promedio de 2.256 mm, lo que me permite tener un margen de error mínimo por lo tanto es más confiable.

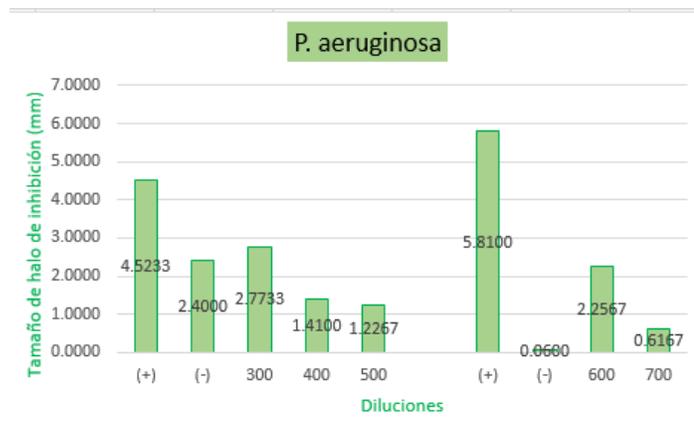


Gráfico 3. Comparación del promedio de inhibición del antibiótico, concentraciones y el solvente, en *P. aeruginosa*.

En el análisis visual, se observa que en efecto la concentración de 300  $\mu$ l, presenta una mejor inhibición, sin embargo, se rechaza y se toma como referencia la concentración de 600  $\mu$ l, por que presenta un margen de error mínimo, no obstante, tiene un efecto menor en comparación con el antibiótico que presenta un promedio de 5.81. (Se toma este valor, porque pertenece al mismo experimento).

*S. aureus*

<i>Staphylococcus aureus</i>								
Concentración( $\mu$ L)/control	Tamaño de los halos (mm)			Promedio (mm)	Varianza	Desv. Estandar	Coef. De variación	
(+)	15.69	13.14	15.44	14.7567	1.9758	1.4056	0.0953	
(-)	5.75	4.98	5.11	5.2800	0.1699	0.4122	0.0781	
300	2.82	1.98	0.76	1.8533	1.0729	1.0358	0.5589	
400	4.21	5.35	0	3.1867	7.9410	2.8180	0.8843	
500	0	3.84	3.57	2.4700	4.5939	2.1433	0.8677	
(+)	16.73	15.39	16.49	16.2033	0.5105	0.7145	0.0441	
(-)	6.33	7.46	5.44	6.4100	1.0249	1.0124	0.1579	
600	4.18	5.26	6.22	5.2200	1.0416	1.0206	0.1955	
700	0	7.05	6.38	4.4767	15.1426	3.8914	0.8693	

Tabla 5. Comparación del efecto antimicrobiano del extracto, con Ceftriaxona (control positivo) y etanol (control negativo) en *S. aureus*

En *S. aureus*, se analiza que, existe un promedio superior de 5mm de diámetro en la concentración de 600 $\mu$ l, sin embargo, el promedio que nos arroja no es del todo confiable porque existe una variación en sus datos realmente significativa, presentando una desviación estándar de 1.02.

En este caso, se propone realizar nuevamente el experimento, o bien realizarlo con una mayor cantidad de ensayos, para que nos de valores más certeros.

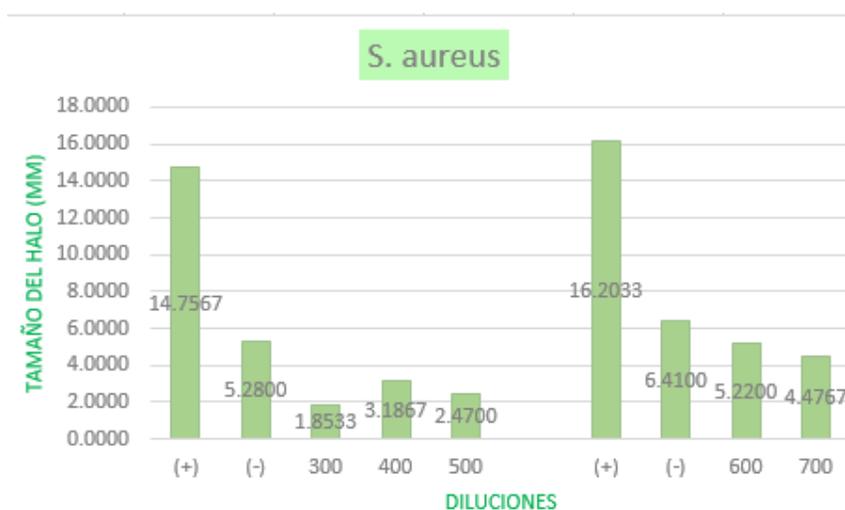


Gráfico 4. Comparación del promedio de inhibición del antibiótico, concentraciones y el solvente, en *S. aureus*.

Para el análisis visual, se observa que, de las concentraciones, la que presenta un mejor resultado de inhibición es la de 600  $\mu$ l, pero es menor que la inhibición presentada por el antibiótico, además de que, de acuerdo a lo anterior, no es un resultado confiable.

## Conclusiones

De acuerdo a las tablas y graficas mostradas anteriormente, se concluye que el extracto etanólico de la flor de sospó (*Pseudobombax ellipticum*), si presenta actividad antimicrobiana para las cepeas. *E. coli* 11229, *E. coli* 25922, *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

- ❖ *E. coli* 11229, la concentración de 300 µl presenta un promedio del tamaño de los halos de 2.29mm con una desviación estándar de 0.16, lo que nos indica que el comportamiento de esta concentración es uniforme, sin embargo, no es tan efectivo en comparación con la nitrofurantoína, que fue el antibiótico usado para este evento.
- ❖ *E. coli* 25922, la concentración con mayor actividad antimicrobiana fue de 300 µl, presentando un promedio en los halos de inhibición de 2.21 mm, con una desviación estándar de 0.85, lo que me representa que los datos son congruentes y que no existe una dispersión de los datos notable, además de que en comparación con bencilpenicilina, antibiótico usado en esta cepa, el promedio que presenta para el experimento 1, es de 3.35, lo que nos indica que si tiene una actividad antimicrobiana prometedora.
- ❖ *P. aeruginosa*, presenta un promedio de 2.25 mm que genera la concentración de 600µl, con una desviación estándar de 0.28, lo que indica que no existe una variación significativa entre los resultados, sin embargo, es mucho menor en comparación con nitrofurantoína que es el antibiótico utilizado en la cepa, que presento un promedio de 5.81.
- ❖ *S. aureus*, presento un caso muy particular, ya que la mejor concentración fue de 600 µl, con un promedio de inhibición de 5.22 mm, sin embargo, la desviación estándar que presenta es muy alta (1.02) es decir, que los valores que me generan las placas son bastante dispersos, y que no existe uniformidad entre las misma, lo que se puede considerar como un resultado no fiable, para este caso, es recomendable, hacer el experimento con una mayor cantidad de repeticiones, para así, generar un resultado más congruente.

La cepa que muestra mayor resistencia antimicrobiana fue la *E. coli* 25922, ya que presenta un menor promedio en los halos de inhibición, mientras que el *S. aureus*, presenta una mayor sensibilidad respecto al extracto ya que, aunque su desviación estándar fue mayor, también

muestra que los halos presentados en las repeticiones del experimento, fueron mayor a 4mm cada uno.

Con base a los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, se recomienda evaluar el extracto etanólico de la flor de sospó en otras cepas patógenas, o bien en las presentadas en este proyecto, pero se recomienda el uso de concentraciones mayores para una mejor evaluación.

## Referencias

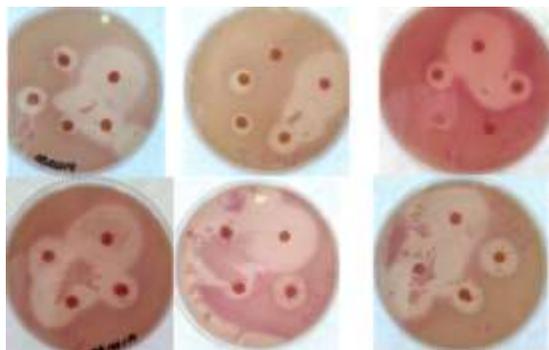
1. Sejía V. Temas de bacteriología y virología médica.2006; Sección III:257-271.
2. Echeverría Z. Resistencia Bacteriana. Rev Med Hered. 1998; 9(2).
3. Ruíz T, Medrano M. Antioxidant and free radical scavenging activities of plant extracts used in traditional medicine in Mexico. African Journal of Biotechnology. 2008; 7(12): 1886-1893.
4. Toledo M. Antocianinas y fotosíntesis durante el desarrollo foliar de *Pseudobombax ellipticum* (Kunth) Dugand. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 2018.
5. Niembro R, Vázquez T. Árboles de Veracruz, 100 especies para la reforestación estratégica. Xalapa, Veracruz.2010.
6. Román D F. Árboles de la Selva Lacandona útiles para la restauración ecológica. Zapopan, Jalisco. Comisión Nacional Forestal.
7. Fernández F. *Escherichia coli* como causa de diarrea infantil. Rev Cubana Pediatr. 2003; 75(3).
8. Rodríguez A. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública de México. Salud pública Méx. 2002;44(5): 464-475.
9. Blanco J. *Escherichia coli* enteroagregativa O104:H4-ST678 productora de Stx2a. ¿Diagnóstico microbiológico ya, de este y otros serotipos de STEC/VTEC!.Elsevier.2012; 30(2): 84-89.
10. Riveros M, et al. Patrones de adherencia de cepas de *Escherichia coli* difusamente adherente (daec) provenientes de niños con y sin diarrea. Rev. perú. med. exp. salud publica. 2011; 28(1).
11. Tejeda D. Efecto de RhlA en la producción de ramnolípidos y polihidroxicanoatos en *Pseudomonas aeruginosa*.México D.F. 2012.
12. Paz-Zarza M. *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. Rev. chil. infectol. 2019; 36(2).
13. De Gante-Martínez E. *Pseudomonas Aeruginosa* y la Implicación de los Mecanismos de Resistencia. Arch Salud Sin.2011; .5(3): 80-85.
14. Cervantes G, García G. Características generales del *Staphylococcus aureus*. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab. 2014; 61 (1): 28-40.
15. Junco D. Cultivo y crecimiento de los microorganismos. Microbiología y Parasitología Médicas. 2015; 45-54.
16. Franco M. Microbiología. Universidad Nacional Autónoma de México. 2002.
17. Hernández R. Lectura interpretada del antibiograma. Rev Cub Med Mil. 2013;42(4):502-6.
18. Val D. Los antibióticos. Obtenido de <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioAntibioticos.htm>
19. Velasco B. El sexo de las bacterias. Biol. on-line. 2015; 4(2):1-23.
20. Squadrito J. Nitrofurantoina. Centro Nacional de Información Biotecnológica. 2020.
21. JG. Restrepo S, M. E. (1997). Penicilina y Bencilpenicilina. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 38-46.
22. Asociación Española de Pediatría. Penicilina G (Bencilpenicilina). 2015.
23. Cigna. Ceftriaxone (injection). Estados Unidos de Norteamérica. 2017.
24. Asociación Española de Pediatría. Ceftriaxona. Madrid, España. 2015.
25. OMS, O. M. (5 de febrero de 2018). Resistencia a los antibióticos. Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos#:~:text=Los%20antibi%C3%B3ticos%20son%20medicamentos%20utilizados,vuelven%20resistentes%20a%20los%20antibi%C3%B3ticos>.

26. Oromí D. Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Medicina Integral*. 2000; 36(10): 367-9.
27. Biblioteca Nacional de Medicina. Infecciones por *Escherichia coli*. 2019.
28. García F, Rojas A. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Rev. chil. Infectol*. 2006; 33(4): 438-450.
29. Picazo J. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
30. Morabito S. *Escherichia coli* O111: H2 enteroagregativa productora de toxina Shiga asociada con un brote de síndrome urémico hemolítico. *American Society for Microbiology*.1998; 840-842.
31. Bettie J. Graham, P. (s.f.). Nacional Human Genome Research Institute . Obtenido de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Bacteria>
32. Paredes F. Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación antimicrobiana. Elsevier.2004; 116-124.
33. Hernández D. Lectura interpretada del antibiograma. *Rev Cub Med Mil*.2013; 42.
34. Margall N. *Escherichia coli enterohemorrágica* Revista Española de Salud Pública 1997; 71.
35. Nataro P. Diarreogénicos *Escherichia coli*. *American Society fir Microbiology*.
36. Bernal M. El antibiograma de discos. Normalización de la técnica Kirby-Bauer. 1984.
37. López B. Curva de crecimiento bacteriano en la producción de proteínas recombinantes. 2016. Obtenido de [https://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/Transferencia\\_de\\_conocimientos\\_Liz\\_Lopez\\_2015.pdf](https://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/Transferencia_de_conocimientos_Liz_Lopez_2015.pdf)
38. OMS, O. M. (s.f.). Obtenido de [https://www.who.int/topics/escherichia\\_coli\\_infections/es/](https://www.who.int/topics/escherichia_coli_infections/es/)
39. Organization, W. H. (1988). Persistent diarrhoea in children in developing. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2491148/pdf/bullwho00071-0030.pdf>
40. Salud O. P. (s.f.). Diagnóstico e investigación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos. Obtenido de <https://www.paho.org/arg/publicaciones/publicaciones%20virtuales/libroETAs/modulo2/modulo2w.html>
41. Cavalieri J. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. Seattle, Washington. 2005.
42. VADECUM. (s.f.). Obtenido de <https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/c039.htm>
43. VADEMECUM. (s.f.). Obtenido de <https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/b008.htm#formula>

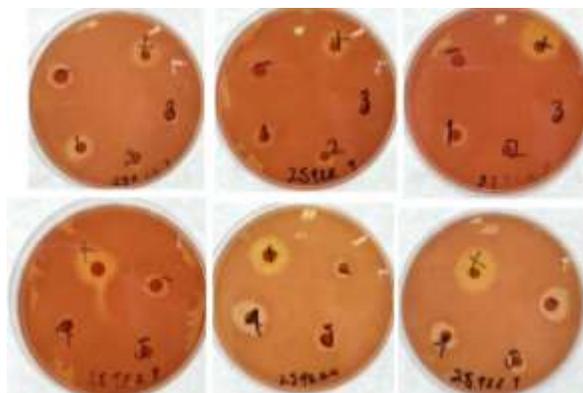
## Anexos

### ❖ Halos de inhibición que presentaron las cepas

*S. aureus*



*E. coli* 25922



*E. coli* 11229



*P. aeruginosa*

