



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA.**



Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Química Inorgánica

Tesis profesional:

*“Elaboración de un gel humectante para manos
con quitosano como una nueva alternativa
de manejo antimicrobiana”*

Para obtener el grado de:
Licenciada en Químico Farmacobiólogo

Presenta:

Betsabe Morales Islas

Director de Tesis: M.C. Alejandra Castro Lino

Co asesores: M.C. María de la Cruz Meneses Sánchez

Dr. Javier Martínez Juárez



Diciembre 2018

Puebla **BUAP**

Indice

Planteamiento del problema

Justificación

Objetivos

Capítulo I

2.1 Componentes a considerar para la elaboración de un gel antibacterial

2.2 Mecanismo de un desinfectante

2.3 Interpretación del antibiograma y conceptos generales

2.4 Interpretación del antibiograma KYRBY-BAUER

2.5 Quitosano

2.6 Bacterias de importancia

Capitulo III

3.1 Materiales y reactivos

3.2 Metodología

3.3 Reto antimicrobiano

Capitulo IV

4.1 Resultados

4.2 Conclusiones

4.3 Glosario

4.4 Bibliografía



Introducción

Las infecciones asociadas con la atención de la salud afectan anualmente a cientos de millones de pacientes en todo el mundo, que se presentan en un hospital o en otro establecimiento de atención de salud donde la infección no se había manifestado ni estaba en período de incubación en el momento de ingreso, prolongando el tiempo de internación, produciendo discapacidad a largo plazo y aumentan los costos que con frecuencia producen de manera significativa una trágica pérdida de vidas humanas.

Las infecciones son causadas por diferentes factores que se relacionan con los sistemas y procesos de atención de salud, así también con el comportamiento humano condicionado por la educación y los límites económicos.

Sin embargo, la mayoría de las infecciones se pueden prevenir, mediante la higiene de las manos ya que es la medida primaria para reducir infecciones con una acción simple, pero la falta de cumplimiento de la misma por parte de los profesionales de salud es un problema mundial.

Basándose en investigaciones sobre los aspectos que influyen el cumplimiento de la higiene de manos se buscan nuevos productos de prevención por lo que se pretende realizar un gel que sea humectante, que no reseque las manos, que el uso a largo plazo no cause daños a la salud y que sea eficiente como bactericida.

Obteniendo el quitosano en el laboratorio de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por el método químico en caliente, este producto que se pretende obtener se evaluará por medio de una sensibilidad antimicrobiana.



BUAP

Justificación

Debido a la contaminación cruzada de enfermedades en lugares concurridos como los hospitales o lugares públicos, se tiene la necesidad de mejorar e innovar el uso de un producto que ayude a la prevención y eliminación de microorganismos por medio de un gel antibacterial, el cual se pretenderá sustituir el triclosán por quitosano obtenido a partir de la cáscara de camarón el cual presenta una función bactericida, ya que de acuerdo a la investigación realizada el triclosán es un antimicrobiano usado extensamente en productos de higiene, belleza y limpieza. Se emplea como compuesto de pastas dentales que han mostrado ser eficaces en el control y tratamiento de gingivitis. Sin embargo, en la última década, el triclosán ha tomado relevancia porque se ha observado que tiene efectos citotóxicos, que altera procesos metabólicos celulares relacionados al sistema endócrino, y porque induce actividad cancerígena in vitro y en modelos animales. La opinión pública a puesto atención de tal situación, participando en una discusión controversial sobre los posibles efectos dañinos del triclosán. En este caso se pretende cambiar el triclosán por quitosano el cual es de origen biológico, con capacidad bactericida según este artículo (“Actividad antibacteriana de soluciones ácidas de quitosano obtenido de exoesqueleto de camarón, (Alexander Pérez Cordero, 2014)).



BUAP

Objetivo general.

Elaboración de un gel humectante para manos con quitosano evaluado por sensibilidad antimicrobiana.

Objetivos particulares.

1. Obtención del quitosano a partir de la cáscara de camarón.
2. Validación de quitosano obtenido a partir de la cáscara de camarón.
3. Elaboración del gel antibacterial con quitosano
4. Evaluación del gel obtenido por medio de un reto antimicrobiano



ANTECEDENTES



BUAP

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Por generaciones el lavado de manos con agua y jabón ha sido considerado como parte de la higiene personal; uno de los primeros en reconocer el valor del lavado y la limpieza de las manos para mantener una buena salud, fue un médico judío, cuyo nombre era Musaiba Maimum, mejor conocido como Maimonides en 1199, dio esta lección: “Nunca olvide lavar sus manos después de tocar a una persona enferma”. El concepto de higiene de las manos surge en el siglo XIX; cuando en 1822 un farmacéutico francés demostró que las soluciones cloradas erradicaban la totalidad de los olores asociados con los cuerpos; en 1843, el médico americano, Oliver Wendell Holmes, llegó a la conclusión de que la fiebre puerperal se transmitía de una paciente a otra, por medio de los médicos y enfermeras que los atendían e impuso como práctica sanitaria el lavado de manos antes y después de la atención de las pacientes y logró reducir la fiebre puerperal significativamente, generando un gran impacto al demostrar la importancia del lavado de manos en la prevención de la transmisión de la enfermedad; el médico húngaro, Ignaz Phillip Semmelweis, fue el primero en probar científicamente la importancia del lavado de manos con antiséptico en 1861.⁽¹⁾

Esta aportación de Semmelweis es la primera evidencia que señala que enjuagarse intensamente las manos contaminadas con un agente antiséptico entre contactos con pacientes podría reducir más efectivamente la transmisión de enfermedades contagiosas asociadas con los entornos sanitarios que el lavado de manos con simple jabón y agua.⁽²⁾



BUAP

A Joseph Lister se debe el tributo de haber introducido en la práctica médica la eliminación de la microbiota transitoria de la piel por medio del uso de agentes antisépticos, que hoy día, en la forma de geles no acuosos con contenido alcohólico (gel antibacterial), suponen una alternativa de similar o mayor eficacia que el Lavado de manos. (3)

1995/1996 Comité Asesor de Prácticas de Control de Infecciones de Helthcare (HICPAC) recomendó que se usara tanto el jabón antimicrobiano o un agente antiséptico sin agua para lavarse las manos al salir de las habitaciones de pacientes con cepas patógenas multiresistente, estas guías también aportaban recomendaciones para el lavado de manos y antisepsia en otros entornos clínicos, incluyendo el cuidado rutinario de pacientes. (6)



BUAP

GENERALIDADES



BUAP

Componentes a considerar para la elaboración de un gel antibacterial

Gel antibacterial

Un gel es un sistema sólido o semisólido de dos componentes por lo menos, que consiste en una masa condensada que contiene un líquido interpenetrado y encerrado en la misma, cuando éste sistema coherente es muy rico en la fase líquida, se le suele denominar jalea. Es una red tridimensional de cadenas flexibles, constituida por segmentos conectados de una determinada manera e hinchada por un líquido. (8)

El uso de agentes químicos desinfectantes ha aumentado a través de los años; los geles a base de alcohol han sido postulados como una buena alternativa de uso para mejorar la higiene de las manos, dado que han mostrado tener una buena eficiencia antimicrobiana. (9)

Un gel puede estar formado por macromoléculas dispuestas en forma de hebras enredadas y entrelazadas unas con otras, muchas de estas unidades están entrelazadas entre sí por los tipos de fuerzas de Van der Waals, dando lugar a unas regiones amorfas y otras cristalinas a través de todo el sistema; estos geles se les considera como sistemas de una sola fase, debido a la no existencia de límites de separación entre las macromoléculas dispersas y la fase líquida. (8)

Compuesto orgánico de dispersión y disolución rápida, altamente estabilizado, para el tratamiento y la desinfección que elimina de las manos y antebrazos los gérmenes más comunes causantes de contaminación, práctico por su fácil acceso y técnica simple, no requiere enjuague ni secado. La apariencia de gel le confiere una excelente percepción sensorial que hace al producto agradable de usar, está especialmente indicado para usar en el sector de la salud en centros de terapia física y laboratorios, tiene una aplicación directa sobre la piel seguida de una dispersión manual (Sanitización profunda: 2 a 3 ml), (Sanitización periódica: 0,5 a 1 ml). (10)

Al aplicarse el gel se forma una película transparente y elástica de alta adherencia sobre la piel que no obstruye los poros cutáneos, no influye en la transpiración y se elimina fácilmente con agua. (11)



BUAP

Tradicionalmente el alcohol ha sido utilizado para la desinfección de heridas, aunque el uso de alcohol en gel no sustituye un adecuado lavado de manos, se ha encontrado que su uso individual (sin lavar manos) reduce significativamente la cantidad de bacterias que se encuentran en las manos y es recomendado como una medida precautoria para evitar el contagio de enfermedades trasmisibles a través del contacto de las manos con objetos y otras superficies como otra mano luego de un saludo ó otro tipo de contacto con un paciente. Los carbopoles son polímeros sintéticos del ácido acrílico, de alto peso molecular y carácter aniónico, que dan lugar a dispersiones en medio acuoso, hidroalcohólico, y con distintos solventes orgánicos, existen diferentes tipos de carbopol, que vienen designados por un número, pero los que más se utilizan actualmente en farmacia son el Carbopol 934 y el Carbopol 940, los que llevan la letra P después del número significa que son de elevada pureza, con un contenido residual de benceno muy bajo, que los hace aptos vía oral (p. ej. como aglutinante en comprimidos). (12)

Los polímeros Carbopol, Pemulen y Noveon son polvos con un diámetro promedio de dos a siete micrones, se producen con partículas primarias del polímero de aproximadamente 0.2 micrones de diámetro.

Cada partícula primaria se puede ver como una estructura en red de las cadenas poliméricas interconectada por las reticulaciones. Sin las reticulaciones, la partícula primaria sería un conjunto de cadenas de polímeros lineales entrelazados, pero sin estar unidos químicamente, los polímeros lineales son en general solubles en solventes polares como el agua, mientras que los polímeros reticulados no.

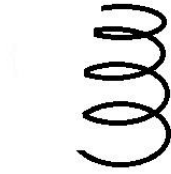
Los polímeros reticulados se pueden hinchar en agua hasta 1,000 veces su volumen original para formar un gel. Los polímeros reticulados no se disuelven en agua, pero se pueden dispersar, y a veces hasta parecen ser solubles a simple vista.



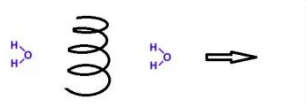
BUAP

Polímeros súper absorbentes

Los polímeros acrílicos, en estado seco, se asemejan a un ovillo rizado.



Cuando estas moléculas son colocadas en agua, se forman enlaces por puente de hidrógeno con el HOH las cuales son causantes de que se despliegan y enderecen.

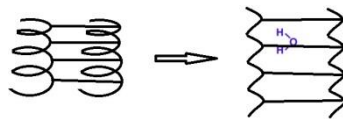


Cuando las moléculas se enderezan, aumentan la viscosidad del líquido circundante es por esto que varios tipos de acrilatos se utilizan como espesantes.

Para que una molécula sea súper absorbente requiere dos cosas:

La adición de pequeñas moléculas que unen transversalmente las hebras de polímero constituyen una red (reticulación) y la neutralización parcial de los grupos ácido carboxilo (-COOH) a lo largo de la cadena principal del polímero (-COO⁻Na⁺).

Las moléculas de agua son atraídas hacia la red a través de un gradiente de difusión que está formada por la neutralización de sodio de la cadena principal del polímero, las cadenas de polímero desean enderezarse pero se ven limitados debido a la reticulación, así las partículas se expanden formando una red.



Las moléculas de agua se sujetan firmemente a los iones carboxilato de la red del polímero súper absorbente por enlaces de puente de hidrógeno, muchos metales solubles también tienen tendencia al intercambio iónico con el sodio a lo largo de la cadena principal del polímero y son retenidos. (13)

Los hidrogeles han surgido como un material novedoso y han llevado a un gran avance en el campo de los productos farmacéuticos y biomédicos, los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales reticuladas que tienen funcionalidades hidrófilas, son capaces de absorber grandes cantidades de agua, solución salina y otros fluidos biológicos. En otras palabras, los polímeros hidrófilos se reticulan, química o físicamente para formar redes tridimensionales que hacen que el material se hinche en agua o cualquier otro fluido biológico mientras permanecen insolubles.

La naturaleza hidrófila de los hidrogeles se debe a la presencia de grupos polares tales como $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{HSO}_3$, $-\text{CONH}_2$ y similares; la estructura del hidrogel como se muestra en la Figura 1. (14)

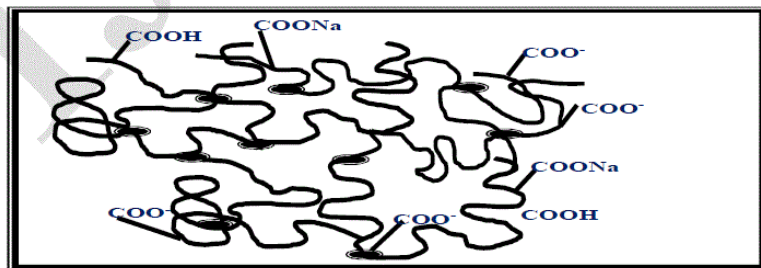


Figura 1: estructura de hidrogel con grupos polares. Obtenida de (Gamma Irradiation as an Environment Friendly Process for Synthesis of Hydrogels)

El panel de expertos de Revisión de Ingredientes Cosméticos (CIR) y otras pruebas toxicológicas subsiguientes han demostrado una baja toxicidad y un bajo potencial de irritación del Carbopol, como resultado de esto y las propiedades que ofrecen los polímeros han ganado una amplia aceptación en una variedad de aplicaciones farmacéuticas, cosméticas y de detergentes. (15)

Mecanismo de acción de los desinfectantes.

Los desinfectantes químicos actúan sobre las células microbianas de diferentes maneras, de acuerdo con el grupo químico al cual pertenecen y a las características fisicoquímicas de cada uno de ellos.

Los principales mecanismos de acción son los siguientes:

- Daño de la pared celular.
- Alteración de la permeabilidad de la membrana y la pared celular.
- Alteración de las moléculas de proteínas y ácidos nucleicos.
- Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.
- Inhibición enzimática (16)

Características de un desinfectante ideal.

- Actividad antimicrobiana, debe ser capaz de matar a los microorganismos y debe tener un amplio espectro de actividad antimicrobiana inactiva bacterias (Gram positivas, Gram negativas).
- Solubilidad, debe ser soluble en agua u otros solventes.
- Estabilidad durante el almacenamiento los cambios en sus propiedades deben ser mínimos y no deben causar una pérdida significativa de su acción germicida.
 - No debe ser tóxico para el hombre ni para los animales.
- Homogeneidad, la preparación debe ser uniforme en composición, de manera que los ingredientes activos estén presentes en cada aplicación.
- Debe ser tóxico para los microorganismos a temperatura ambiente, para que al usar el agente no sea necesario elevar la temperatura más allá de la que se encuentra normalmente en el lugar donde se va a utilizar.
- Capacidad para penetrar, esto no es necesario si se requiere solo una acción superficial.
- No debe ser corrosivo, ni teñir el material que se trate.
- Capacidad detergente, un desinfectante que sea a la vez detergente cumple 2 objetivos: limpieza y desinfección: la acción limpiadora mejora la efectividad del desinfectante.
- Económico



BUAP

- No dañino para el medio ambiente.
- No inducir ni desarrollar resistencia. (17)

El carbómero tiene una alta viscosidad y un buen efecto de pegajosidad, se utiliza para formulaciones tópicas y es adecuado para la preparación de geles, cremas y agente de acoplamiento. El carbómero se utiliza ampliamente en la actualidad y se usan a menudo en loción tópica, crema y gel. (18)

Emolientes humectantes presentes en el gel

Los emolientes y los hidratantes tienen un objetivo común: tratar la piel seca, los hidratantes se utilizan para aportar agua a la piel y recobrar la humedad, los emolientes tienen un uso añadido ya que son un plus de hidratación recomendado para las pieles con sequedad extrema. (23)

Los emolientes son sustancias que se agregan a los cosméticos para suavizar la piel, funcionan llenando los espacios entre corneocitos que se descaman y crean una superficie suave y con menos fricción y mayor refracción de luz. (24)

Los humectantes son materiales hidrosolubles con gran capacidad de absorción de agua y son capaces de atraer agua de la atmósfera (si la humedad atmosférica es mayor del 80%) y de la epidermis subyacente, pero en condiciones de baja humedad pueden absorber agua de la epidermis profunda y de la dermis, lo que resulta en una mayor sequedad de piel.

Los humectantes son aditivos de los hidratantes cosméticos, porque previenen la evaporación del producto y el engrosamiento, lo que aumenta la vida útil del mismo, los humectantes aportan agua a la piel, que causan una leve hinchazón del estrato córneo que da una percepción de piel más suave y menos arrugada.

Entre los humectantes más utilizados están la glicerina, el sorbitol, el hialuronato de sodio, la urea, el propilenglicol y los azúcares.

Cutina



Mezcla de monoacilglicerol, principalmente estearoilglicerol y palmitoilglicerol (40 – 50 %), junto con cantidades variables de di- y triacilglicerol.

Lentejas cerosas blancas o ligeramente amarillentas, insoluble en agua y soluble en etanol caliente y en éter, punto de fusión: 54 – 64 °C.

Se trata de un agente con pobre acción emulsificante pero usado habitualmente como estabilizante en emulsiones O/W (aceite/ agua) y W/O (agua/aceite) se emplea como factor de consistencia en ungüentos, cremas, y lociones, así como en preparaciones anhidras, preparados en barra, y champús en cremas y emulsionados. Las emulsiones se distinguen por su estructura uniforme y buena estabilidad, principalmente en estado líquido, su afinidad cutánea es excelente. (25)

Aceite mineral

Aceites minerales y grasas derivadas del petróleo y se usan en vez de aceites vegetales porque son más baratos y la piel los absorbe más rápido, sirven como conservantes y para aportar esa apariencia cremosa en los cosméticos, algunos forman una película sobre la piel para darle un aspecto “hidratado.”(26)

Los aceites vegetales proceden de las semillas ó frutos de plantas oleaginosas, la utilización de estos aceites naturales para uso cosmético no es de nuestra época más reciente, si no que se ha utilizado durante siglos como tratamiento de belleza.

Estos aceites vegetales son usados como base para la elaboración de cosméticos y también de aceites de masajes, son utilizados como ingredientes principales en el uso de cosmética, estos aceites naturales tienen propiedades dermatológicas, aportan una alta hidratación y penetran muy bien en nuestra piel, dándole elasticidad, suavidad y nutrición, aportando un excelente cuidado para nuestro cuerpo.

El uso de aceites vegetales en la cosmética es una alternativa al uso de grasas animales y de grasas derivadas del petróleo. En la cosmética natural certificada se usan aceites vegetales vírgenes cuya procedencia es siempre de la agricultura ecológica y han sido procesados con el método de prensados en frío para que permanezcan intactos todos sus componentes y propiedades. (27)

Glicerina

La glicerina fue descubierta por el químico inglés Claude Joseph en 1741. Es subproducto de la fabricación del propileno y de la industria del jabón además de un subproducto de la fabricación de biodiesel. (28)

Es una sustancia versátil que, debido a su combinación única de propiedades físicas y químicas, posee más de 1.500 usos finales. Se usa como ingrediente o para su transformación en productos cosméticos, artículos de tocador o cuidado personal, medicamentos y productos alimenticios. Sus características la destacan como un componente muy estable bajo las condiciones típicas de almacenamiento, no es irritante, tiene bajo grado de toxicidad sobre el medio ambiente y, además, es compatible con muchos otros productos químicos. (29)

Alcohol etílico

El alcohol etílico, es un alcohol cuya molécula tiene dos átomos de carbono, de sabor urente y olor fuerte, que arde fácilmente dando llama azulada y poco luminosa, se obtiene por destilación de productos de fermentación de sustancias azucaradas o feculentas, como uva, melaza, remolacha, patata. Forma parte de muchas bebidas, como vino, aguardiente, cerveza, etc., y tiene muchas aplicaciones industriales como disolvente, fabricación de acetaldehído, etc. Este alcohol es miscible en agua, otros alcoholes, éter, benceno y líquidos orgánicos.

Se encuentra en perfumes, extractos de comidas como vainilla, almendra, limón, preparaciones farmacéuticas como elixir y sirve como antídoto en el tratamiento de emergencia de intoxicación por metanol, etilenglicol y fluoracetato de sodio.

El etanol tiene varias vías de ingreso en el organismo; estas son: gastrointestinal (oral, es la más frecuente), respiratoria, parenteral (IV), rectal, dérmica (usada en niños por su efecto antipirético). (30)

Líquido incoloro y transparente con acción bactericida rápida (2 minutos), pero poco efecto residual, presenta un inicio de acción retardado, motivo por el que hay que dejarlo actuar durante 2 minutos antes de cualquier procedimiento.

Su uso está indicado para asepsia de **BUAP**

- Punciones venosas.
- Inyecciones subcutáneas.
- Inyecciones intradérmicas.
- Inyecciones intramusculares.
- Extracciones de sangre.

Dosificación y empleo

El alcohol etílico a 70° confiere un gran poder de desinfección para eliminar las bacterias y microorganismos potencialmente patógenos de las manos, por ello resulta ideal para la limpieza y asepsia de las manos sin necesidad de utilizar agua ni toalla, su uso prolongado produce irritación y sequedad de la piel, no debe utilizarse sobre heridas ya que irrita el tejido dañado debido a que puede formar un coágulo que protege a las bacterias sobrevivientes.

El mecanismo de acción de los alcoholes es la desnaturalización de las proteínas de los microorganismos, la desnaturalización proteica sólo es posible en presencia de agua; por este motivo el alcohol absoluto presenta un poder bactericida mucho menor que las mezclas de alcoholes con agua podría tener cierta acción bacteriostática al inhibir la producción de metabolitos esenciales para la división celular rápida, tiene acción bactericida pero poco efecto residual, presenta un inicio de acción retardado; por este motivo se debería dejar actuar dos minutos antes de cualquier procedimiento. (31)

Agua



El agua es una molécula sencilla formada por átomos pequeños, dos de hidrógeno y uno de oxígeno, unidos por enlaces covalentes muy fuertes que hacen que la molécula sea muy

estable, este enlace tiene una gran importancia porque confiere al agua propiedades que se corresponden con mayor masa molecular, de ahí sus elevados puntos de fusión y ebullición, imprescindibles para que el agua se encuentre en estado líquido a la temperatura de la Tierra, su alto calor específico la convierte en un excepcional amortiguador y regulador de los cambios térmicos, manteniendo la temperatura corporal constante, otra propiedad que hace que esta molécula sea única es su amplia capacidad como disolvente de sustancias polares. (32)

Trietanolamina

Es un compuesto químico orgánico formado, principalmente por una amina terciaria y tres grupos hidroxilos, que actúan como una base química débil debido al par solitario de electrones en el átomo de nitrógeno, se presenta como un líquido viscoso (aunque cuando es impuro puede presentarse como un sólido, dependiendo de la temperatura), puro de color amarillo pálido ó incoloro, poco higroscópico y volátil, totalmente soluble en agua y miscible con la mayoría de los solventes orgánicos oxigenados. Posee un olor amoniacal suave.

Es resultante de la reacción de óxido de etileno con amoníaco en solución acuosa; la reacción también produce monoetanolamina y dietanolamina.

Este compuesto es ampliamente utilizado en productos de cuidado personal como regulador de pH y agente alcalinizante; se usa en la fabricación de productos de limpieza, impermeabilizantes, geles para cabello, gel desinfectante, cremas, lociones, limpiadores de piel, shampoo, productos para cabello, desodorantes, fragancias, maquillaje, productos para uñas y cutícula, en el área del cemento y del concreto, agricultura y fotografía.

Antibiograma y conceptos generales



La sensibilidad a antimicrobianos tiene 2 objetivos fundamentales: guiar en la elección del mejor tratamiento individual y monitorizar la evolución de la resistencia bacteriana con objetivo de revisar el espectro del

antimicrobiano. La sensibilidad de una bacteria in vitro predice la eficacia in vivo. Con un antibiograma se pueden obtener resultados cualitativos que indican si la bacteria es sensible o resistente a un antibiótico, o cuantitativos que determinan la concentración mínima (CMI)

Determinar la susceptibilidad de los microorganismos a una variedad de agentes antimicrobianos, bajo condiciones de laboratorio específicas y estandarizadas. La meta principal del estudio de susceptibilidad es proveer al clínico algunas recomendaciones sobre la terapia que puede ser más apropiada en pacientes con una infección específica. No obstante, la correlación exacta entre los resultados in vitro y la respuesta clínica es muchas veces difícil de predecir, ya que existen numerosos factores que influyen la interacción de los agentes antimicrobianos y los microorganismos en un determinado paciente.

Sensibilidad antimicrobiana

El antibiograma tiene como objetivo evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o a varios antimicrobianos, y traducir, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica.

Las primeras pruebas de sensibilidad se realizaron en la década de 1920 del siglo pasado ligadas al propio descubrimiento de los antimicrobianos, tal y como se conocen en la actualidad, basadas en la difusión o en el cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI), no se generalizaron hasta bien entrada la década de 1960.

Con posterioridad se identificaron las múltiples variables que afectaban a los resultados obtenidos, y comienzan a establecer durante las décadas de 1970 y de 1980 normas sobre las condiciones en las que debían realizarse los antibiogramas con el objetivo de asegurar su reproducibilidad, asimismo, durante estos años se debaten los criterios que deben regir la interpretación de los resultados. (33)

En el método de Kirby Bauer, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico, las placas se incuban por 16-18 horas a 35- 37°C.

Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco, en un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio. (35)



Resistencia bacteriana

La resistencia de las bacterias es el principal obstáculo para la eficacia terapéutica de los antibióticos, pues no sólo puede anular la acción curativa si se manifiesta en el curso del tratamiento, sino que tiene a la larga consecuencias todavía más graves para el conjunto de la población, ya que provoca la desaparición de las cepas susceptibles y la propagación de las resistentes, ese es el motivo por el cual la determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos haya adquirido tanta importancia y sea indispensable para hacer de los antibióticos un uso racional y para preservar la eficacia de este grupo tan valioso de agentes terapéuticos. (36)

Interpretación del antibiograma Kirby Bauer

La interpretación de los resultados del antibiograma (sensible, intermedio o resistente) se realiza en función de los valores establecidos por diferentes comités, como el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio en Estados Unidos, el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana en Europa y la Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos.

Los métodos fenotípicos (antibiograma) son los más utilizados y consisten en enfrentar un inóculo bacteriano estandarizado a un antibiótico.

Hay que tener en cuenta que no siempre un valor de CMI más bajo indica mayor actividad de este antimicrobiano, ya que las CMI que definen la sensibilidad o resistencia son diferentes para cada especie bacteriana y cada antimicrobiano.

Si un microorganismo es sensible indica que con las dosis habituales se espera una evolución favorable de la infección, por el contrario, si el microorganismo es intermedio o resistente, es probable que sea desfavorable.

El medio estandarizado para la realización del antibiograma es el medio Mueller Hinton, la CMI es la dilución más baja de antimicrobiano en la que no se observa crecimiento bacteriano. Las técnicas de difusión emplean discos de papel impregnados con una solución estandarizada de antibiótico que se disponen sobre la superficie de un medio sólido previamente inoculado en su superficie con una suspensión bacteriana.



BUAP

Tras un período de incubación de 24 horas a 37°C, el diámetro del halo formado está en relación con el grado de sensibilidad del microorganismo.

Halos pequeños se relacionan con valores altos de CMI (resistentes) y halos grandes con CMI bajas (sensibles). (37)

QUITOSANO

El quitosano es un poli-(b-1/4)-2-amino-2-deoxi-Dglucopiranososa, este biopolímero ha sido catalogado como el segundo más abundante en la naturaleza después de la celulosa.

El quitosano presenta una serie de características únicas tales como biodegradabilidad, biocompatibilidad y no toxicidad, lo que permite su aplicación en diferentes industrias tales como: alimentos, farmacéutica y de cosméticos, así como en la agricultura y en la remoción de metales pesados para el tratamiento de aguas residuales provenientes de industrias.

Ha sido comprobado por muchos investigadores que el quitosano y sus derivados, a diferencia de otros inductores, tienen la doble propiedad de inhibir el crecimiento de hongos, bacterias y virus fitopatógenos, así como la de activar in vivo diversos mecanismos vinculados con la resistencia sistémica adquirida, lo que ha generado diversas investigaciones científicas y tecnológicas en muchos países, para promover su aplicación con fines diversos en la industria agrícola. Actualmente, el uso de agentes químicos para el control de microorganismos fitopatógenos se encuentra muy cuestionado, los graves daños al medio ambiente debido al uso irracional de estos productos sintéticos siguen latentes lo que ha llevado a considerar otras opciones de control. El uso de otros compuestos naturales como la quitosano podría ser una solución adecuada a esta problemática. (38)

Solubilidad del quitosano

Según Singh y Ray (2000), la solubilidad del quitosano se encuentra relacionada a la cantidad de grupos amino protonados de la cadena polimérica; en cuanto mayor sea la cantidad de estos grupos mayor la solubilidad del polímero, aspecto que se encuentra relacionado al grado de desacetilación del quitosano, que es mayor para el quitosano purificado, lo que evidencia el aumento en la solubilidad.

A pesar de que el quitosano es un polisacárido de cadena lineal, presenta variabilidad en el tamaño de las cadenas como en el grado de acetilación de cada una, aspecto que influencia la solubilidad en medio ácido. (39)

Efecto antimicrobiano del quitosano

A través del tiempo, diferentes estudios han evaluado el efecto antimicrobiano de diversos materiales de origen biológico; entre estos, el quitosano ha tomado gran importancia al ser un polímero natural, biodegradable, no tóxico en concentraciones moderadas y que posee actividad antimicrobiana, el efecto antimicrobiano del quitosano se atribuye a la capacidad quelante y a la presencia de un grupo amino con carga positiva que puede interactuar con los compuestos de carga opuesta y que están presentes en la superficie de los microorganismos.

Una de las principales razones para que el quitosano posea actividad antimicrobiana es la presencia de un grupo amino con carga positiva a pH inferior a 6.3 (carbono 2) el cual interactúa con las cargas negativas de la pared celular de los microorganismos, generando un rompimiento o lisis de estas estructuras, que lleva a la pérdida de compuestos proteicos y otros constituyentes intracelulares. Además, el quitosano tiene propiedad quelante, lo que permite que este biopolímero se pueda ligar selectivamente a metales presentes en las estructuras externas de los microorganismos, inhibiendo así la producción de toxinas. También se ha reportado que el quitosano puede inhibir enzimas debido a la interacción quitosano-ADN que altera la síntesis de ARN mensajero.

En la literatura se ha reportado que el quitosano posee un amplio espectro de actividad antimicrobiana, en hongos el quitosano suprime la esporulación y posterior producción de esporas. Por otro lado, el efecto antimicrobiano en bacterias ha sido un proceso complejo que difiere entre bacterias Grampositiva y Gramnegativas. (40)

Factores que afectan la actividad antimicrobiana del quitosano

El efecto antimicrobiano del quitosano es influenciado por cuatro factores:

(1) Microorganismo: especie y fase de desarrollo; (2) factores intrínsecos del quitosano: peso molecular, solubilidad, grado de desacetilación, densidad de carga positiva y capacidad quelante; (3) estado físico del quitosano: líquido (coloide) o sólido (membrana); (4) factores ambientales: pH, temperatura y tiempo.(41)



TRICLOSÁN

El triclosán es un biocida ampliamente utilizado desde hace más de 40 años, en altas concentraciones es muy eficaz para aniquilar a un gran número de microorganismos diferentes, incluidas numerosas bacterias, en bajas concentraciones, no los mata, pero detiene su propagación.

Puede matar o inhibir a los microorganismos mediante distintos productos antimicrobianos, a saber, antibióticos que actúan contra las infecciones bacterianas en humanos o animales y biocidas, como los desinfectantes y los conservantes.

En los cosméticos, el triclosán actúa como conservante, también se emplea en jabones, desodorantes y dentífricos (para controlar la placa y mejorar la salud de las encías). En las instalaciones sanitarias, el triclosán ayuda a prevenir y controlar infecciones, se emplea en jabones de manos, antisépticos y desinfectantes, y también está presente en las superficies de los productos sanitarios, como el material de sutura quirúrgica. El triclosán se añade a muchos productos para el hogar, como jabones y detergentes, también se incluye en algunos artículos, como juguetes, alfombras y productos textiles, para evitar que se desarrollen microorganismos en ellos.

En Estados Unidos, el triclosán no puede utilizarse en alimentos o material en contacto con ellos, ni en alimentos para animales, sin embargo, sí se puede utilizar en productos biocidas para higiene veterinaria. (42)

El 6 de septiembre de 2016, la FDA publicó un reglamento final sobre el consumo de jabones antibacterianos que prohíbe el uso continuado de triclosán y otros 18 ingredientes antibacterianos, que tendrá efecto un año. La FDA concluyó que los fabricantes de jabón no habían presentado pruebas de seguridad adecuadas para su uso en estos productos; la agencia no concluyó que el triclosán en el jabón no es seguro.

Comités científicos independientes de la Comisión Europea también han evaluado varias veces el triclosán (el Comité Científico de Productos Cosméticos y Productos No Alimentarios en 2002, el Comité Científico de Productos de Consumo en 2002 y 2006, y el Comité Científico para la Seguridad de los Consumidores en 2011.) Cada uno llegó a la conclusión de que el uso de triclosán al 0,3% en la crema dental, es seguro. En consecuencia, una enmienda de abril de 2014 a la Reglamentación para Cosméticos de la UE confirmó el uso continuado de triclosán en las cremas dentales cosméticas hasta el nivel

autorizado, 0,3%. La Agencia Europea de Sustancias Químicas (ECHA) está llevando a cabo una revisión de triclosán en el marco de la Reglamentación REACH y determinó que los estudios adicionales son necesarios para completar su evaluación sobre los posibles efectos endocrinos y persistencia en el medio ambiente. Esta determinación está actualmente bajo revisión. En otra revisión en el marco de la Reglamentación sobre Biocidas, la ECHA determinó que la venta de productos para la higiene de las manos en atención sanitaria que contienen un nivel significativamente mayor de triclosán serán gradualmente eliminados a partir de enero 2018.

El triclosán es el biocida más estudiado en cuanto a la resistencia a los antimicrobianos, especialmente su efecto en las bacterias y los mecanismos de resistencia microbiana.

La capacidad del triclosán para causar resistencia a los antibióticos solo se ha observado en condiciones de laboratorio.

Existen varias razones por las que la utilización y liberación de triclosán al medio ambiente podrían constituir un peligro:

- En bajas concentraciones, el triclosán, como cualquier otro biocida, contribuye a la selección de bacterias más resistentes.
- Los genes resistentes adquiridos por estas bacterias podrían en principio transmitirse a otras bacterias.
- La resistencia al triclosán podría derivar en resistencia a otros biocidas o antibióticos.

Sin embargo, las condiciones de laboratorio difieren de las condiciones de vida real, y se ha investigado muy poco acerca de la exposición de las bacterias al triclosán en el medio ambiente. El Comité Científico de Seguridad de los Consumidores (CCSC) concluye que, hasta la fecha, no hay pruebas de que el uso del triclosán conduzca un aumento de la resistencia a los antibióticos. Sin embargo, es demasiado pronto para afirmar que la exposición al triclosán no deriva en resistencia microbiana en ningún caso, ya que aún no se dispone de información suficiente para hacer un análisis de riesgos completo. (43)

Mecanismo de acción del triclosán

A bajas concentraciones los derivados fenólicos actúan inhibiendo enzimas esenciales del metabolismo o uniéndose a metabolitos esenciales de la pared celular, provocando de este modo la muerte de las bacterias.



A concentraciones más elevadas provocan la lisis celular y la salida de constituyentes intracelulares, el triclosán inhibe también una enzima implicada en la síntesis de los ácidos grasos: enoil-ACP reductasa.

Es eficaz frente a bacterias Gram-positivas y la mayoría de bacterias Gram-negativas, pero con escasa o variable actividad frente a *Pseudomonas spp.* También es activo frente a los hongos, posee actividad razonable frente a micobacterias y *Candida spp.*, pero tiene escasa actividad frente a hongos filamentosos.

El mecanismo de resistencia es un transportador en la membrana del microorganismo capaz de expulsar al exterior triclosán y otros antibióticos. *Pseudomonas aeruginosa* es uno de los microorganismos que presenta este mecanismo de resistencia; por esta razón el triclosán no es efectivo frente a él. Como clorhexidina, la actividad de triclosán sobre la piel es persistente. (44)

Bacterias de importancia.

Escherichia coli

La familia Enterobacteriaceae está formada por más de 20 géneros bacterianos, aproximadamente 120 especies y miles de serotipos (combinación del antígeno somático y el flagelar), las bacterias de esta familia, son anaerobias facultativas. La mayor parte son de vida libre, algunas son comensales de animales vertebrados e invertebrados. Sin embargo, también pueden ser patógenos causantes de enfermedad.

Escherichia coli es la especie bacteriana más común de la microbiota intestinal; se presenta como un comensal del intestino humano pocas horas después del nacimiento. Es raro encontrar cepas comensales asociadas a enfermedad. Empero, existen varios patotipos de *E. coli* implicados en un amplio espectro de enfermedades agrupados en tres síndromes clínicos.

El tamaño promedio de los bacilos es de 0.5 μ de ancho por 3 μ de largo, cuando se utiliza la tinción de Gram se tiñen de rojo (gram-negativas). Algunas especies son móviles (por flagelos peritricos), no esporuladas, fermenta la glucosa y la lactosa son catalasa positivos, oxidasa negativos y reduce nitratos a nitritos.

Enfermedad diarreica.

La diarrea aguda es una enfermedad intestinal generalmente infecciosa y autolimitada, se caracteriza por presentar evacuaciones líquidas o de consistencia disminuida, en número mayor a tres en 24 horas y con evolución menor de dos semanas. Diarrea persistente se define como el paso de evacuaciones semilíquidas por más de dos semanas, en tanto que la diarrea crónica se establece a las cuatro semanas.

La enfermedad diarreica grave (EDA), es uno de los problemas de salud pública de mayor importancia en el mundo, de acuerdo con estudios efectuados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el fondo de las naciones unidas para la infancia (UNICEF), las EDA son un problema de salud de la población infantil, principalmente en los países en desarrollo donde se producen anualmente entre 5 a 6 millones de muertes, constituyendo la segunda causa global de mortalidad infantil.

Cada uno de los grupos patógenos de *E. coli* presenta características distintivas relacionadas con su epidemiología, patogénesis, manifestaciones clínicas y tratamiento.

En los últimos años se han reportado varios brotes en diferentes países, principalmente en guarderías y otros centros de atención a niños. En los países en desarrollo, la incidencia de diarrea producida sigue siendo alta. Diferentes estudios realizados en México, Brasil, y África del Sur refieren que entre 30 y 40% de los casos de diarrea puede ser atribuido a *E. coli*. (45)

Los seres humanos pueden contraer una infección con cepas patógenas mediante el consumo de alimentos y agua directamente contaminados con heces o contaminados como consecuencia de la contaminación cruzada con otras fuentes alimentarias. Además, existe la posibilidad de contaminación a partir del contacto humano directo durante la preparación de los alimentos.

La epidemiología de *E. coli* patógena transmitida por los alimentos varía a través del mundo. En comunidades con condiciones de higiene y saneamiento deficientes son prevalentes, sin embargo, la *E.coli* patógena transmitida por los alimentos también ha aparecido en

comunidades con sistemas de higiene y saneamiento mejor organizados, los alimentos también pueden resultar contaminados de manera directa o por contaminación cruzada durante el crecimiento y la cosecha (hortalizas), la recolección (leche) o el sacrificio de animales y el faenado de la canal (carne). También se pueden contaminar durante la manipulación posterior a la cosecha, el transporte, la elaboración y la preparación. La carne fresca y la leche cruda se consideran los vehículos comunes de la *E. coli*, como consecuencia de deficientes prácticas de higiene e inadecuadas normas higiénicas en los mataderos.

Las cepas *E. coli* son conocidas por su propensión al intercambio de material genético y su capacidad de adaptación a los cambios de su ambiente. A veces, estas características favorecen la aparición de cepas con una mayor patogenicidad y capacidad de supervivencia.

(46)

Staphylococcus aureus

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , 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 desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); el género *Staphylococcus* contiene 32 especies, de las cuales 16 de ellas se localizan en los humanos, algunas forman parte de la microbiota de piel y mucosas en humanos, algunas de estas especies son patógenas cuando existe predisposición e inmunosupresión en el huésped o en presencia de cuerpos extraños.

Entre las especies que colonizan al humano, las de mayor importancia clínica son: *S. aureus* y *Staphylococcus lugdunensis*; El *Staphylococcus epidermidis* y el *Staphylococcus saprophyticus* son comúnmente responsables de infecciones relacionadas con dispositivos e infecciones del tracto urinario, siendo estos menos infecciosos que *S. aureus*.

S. aureus es uno de los patógenos más importantes a nivel mundial, bacteria oportunista que forma parte de la microflora humana: poco después del nacimiento, los neonatos son



colonizados por *S. aureus*, los sitios de colonización incluyen el muñón del cordón umbilical, el área perineal, la piel y, a veces, el tracto gastrointestinal. También puede contaminar la vestimenta y la ropa de cama. La colonización más frecuente por *S. aureus* es la mucosa nasal, el principal reservorio lo constituye el hombre enfermo o el portador.

Es más frecuente la colonización en el hospital, especialmente en pacientes con hemodiálisis, diabéticos tipo 1, pacientes con lesiones cutáneas, sujetos infectados con VIH y adictos a las drogas, durante varias décadas se han reportado un gran número brotes epidémicos de *S. aureus* a nivel mundial, sobre todo en los hospitales, centros de atención, clínicas y recientemente ha surgido en la comunidad. (47)

S. aureus produce infecciones de dos maneras:

1. En forma directa, por invasión y posterior destrucción tisular local (proceso supurado), o luego de haberse diseminado por vía sanguínea.
2. A través de efectos de toxinas. (48)

La transmisión se produce principalmente por ingesta de alimentos contaminados con la bacteria o sus toxinas, en el ámbito laboral, la transmisión se produce por contacto con personas, animales (zoonosis) o elementos contaminados, ocurriendo principalmente por contaminación de heridas y mucosas, por la inoculación accidental a través de pinchazos o cortes con objetos contaminados y por mordeduras de animales, es responsable de muchos casos de enfermedad nosocomial. (49)

Período de incubación corto 2-4 horas, los síntomas predominantes son náusea, vómito, espasmos de estómago, arcadas y postración, diarrea, deshidratación, palidez y colapso nervioso con una curación completa en un plazo de 1-2 días. (46)

Salmonella

La salmonelosis, causada por la bacteria *Salmonella* es una de las enfermedades de transmisión alimentaria más comunes y ampliamente extendidas, se estima que afecta anualmente a decenas de millones de personas de todo el mundo y provoca más de cien mil defunciones, hasta el presente se han identificado más de 2.500 cepas diferentes (llamadas "serotipos") de *Salmonella* spp.

La *Salmonella* es una bacteria que puede sobrevivir varias semanas en un entorno seco, y varios meses en agua, si bien todos los serotipos pueden causar la enfermedad en el ser humano, unos pocos son específicos de algunos huéspedes y pueden alojarse en pocas especies animales, por ejemplo, *Salmonella Dublin* en vacunos

y *Salmonella Choleraesuis* en porcinos, cuando esos serotipos particulares provocan la enfermedad en las personas suelen ser invasivos y pueden poner en peligro la vida, sin embargo, la mayoría de los serotipos se encuentran en una gran diversidad de huéspedes, por lo general, esas cepas causan gastroenteritis, que suele ser un trastorno sin complicaciones y no requiere tratamiento, aunque puede ser grave en los niños, los ancianos y los pacientes inmunodeprimidos, a ese grupo pertenecen *Salmonella Enteritidis* y *Salmonella Typhimurium*, los dos serotipos más importantes de salmonelosis transmitida desde animales a seres humanos en la mayor parte del mundo.

La salmonelosis es una enfermedad provocada por la bacteria *Salmonella*, generalmente se caracteriza por fiebre alta, dolor abdominal, diarrea, náusea y, a veces vómito, los síntomas de la enfermedad comienzan a manifestarse entre 6 y 72 horas (generalmente 12 a 36 horas) después de la ingesta de *Salmonella*, y la enfermedad dura entre 2 y 7 días, los síntomas son relativamente leves y los pacientes se recuperan sin tratamiento específico, sin embargo, en algunos casos, particularmente en niños pequeños y en ancianos, la deshidratación causada por la enfermedad puede ser grave y poner en peligro la vida.⁽⁵⁰⁾

Se transmite por vía fecal-oral, las infecciones por serotipos no tifoideos se asocian principalmente con el contacto entre personas, el consumo de diversos alimentos contaminados y la exposición a animales; la infección por especies tifoideas se asocia con el consumo de agua o alimentos contaminados, siendo poco frecuente la transmisión directa entre personas.⁽⁵¹⁾

La *Salmonella* se puede contagiar de una persona a otra por medio de las manos de la persona infectada. Además se puede contagiar de los animales a los seres humanos. ⁽⁵²⁾

La *Salmonella* evade las defensas intracelulares de las células intestinales sin ser destruida y comienza a dividirse dentro de la célula. Posteriormente, pasa a la sangre y produce una infección sistémica, multiplicándose en macrófagos, y localizándose en hígado, bazo, médula ósea, etc. Se elimina por las heces, y se multiplica en el ambiente, donde es muy resistente. ⁽⁵³⁾



Candida

La candidosis o candidiasis es una micosis causada por diversas especies de levaduras del género *Candida*, cualquier tejido puede ser afectado por lo que se presentan diversos cuadros clínicos, cada uno de ellos asociado directamente al estado inmunológico del paciente, las candidosis de mucosas y piel son las más frecuentes, mientras que las sistémicas son de evolución aguda o crónica y generalmente severas. (51)

Candida albicans es un hongo dimórfico, es decir, se desarrolla de forma distinta en función de la temperatura de crecimiento, como levadura, normalmente a 37°C en el huésped, y como hongo de aspecto filamentoso, a 25°C en la naturaleza, pertenece al filo Ascomycota y se reproduce de forma asexual por gemación.

En forma de levadura presenta un aspecto de células redondas u ovaladas, de 3-8 x 2-7 micras de tamaño, agrupadas en pequeños grupos, mientras que, en forma de hongo filamentoso, las células se alargan y se diversifican tomando la apariencia de filamentos, pseudo-hifas o pseudo-micelio.

El dimorfismo le permite evadir los mecanismos de defensa relacionados con la inmunidad celular del huésped, en forma de levadura se comporta como saprofita, conviviendo en simbiosis con el huésped, mientras que, en forma de hongo filamentoso, se comporta como un parásito patógeno produciendo síntomas en el huésped; macroscópicamente, en agar Sabouraud crece formando colonias blancas, blandas, cremosas y lisas. (52)

Las candidosis tienen alteraciones en la hidratación y cambios en el pH de la piel, boca, faringe y otros tejidos superficiales, las formas sistémicas de candidosis son invasivas y se observan en aproximadamente el 1% de los enfermos con SIDA avanzado, pero existen otros factores predisponentes relacionados: catéteres venosos colocados por tiempo

prolongado, catéteres centrales, neutropenia o aplasias medulares (por drogas o invasión por otras infecciones), hiperalimentación parenteral, administración de antibióticos y citostáticos.

El cuadro clínico es poco característico y constituye una de las causas de fiebre de origen desconocido, las autopsias han demostrado que las localizaciones más frecuentes son los pulmones, el esófago, los riñones, el hígado, el bazo y el intestino delgado y las manifestaciones clínicas dependerán de la localización de la infección; entre otras se incluyen esofagitis, neumonitis, cistitis, pielonefritis y endocarditis. (52)

Mecanismo de propagación y transmisión

Transmisión endógena por contacto a través de la piel y las mucosas y por inoculación accidental o mordedura, es responsable de casos de enfermedad nosocomial.

Actividades laborales con riesgo son: industria de la alimentación, suministro de agua, actividades de saneamiento, gestión de residuos y limpieza urbana, hostelería y restauración, actividades sanitarias y laboratorios. (53)

Klebsiella

Los microorganismos del género *Klebsiella* son bacilos gram-negativos inmóviles que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, el género *Klebsiella* está formado por varias especies, entre las que se encuentran *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola* y *K. terrigena*.

La capa más externa de *Klebsiella spp.* está formada por una gran cápsula de polisacáridos que diferencia a estos microorganismos de otros géneros de esta familia, aproximadamente



del 60 al 80% de los microorganismos del género *Klebsiella* aislados de muestras de heces y clínicas son *K. pneumoniae* y dan positivo en la prueba de coliformes termotolerantes. *Klebsiella oxytoca* también se ha identificado como microorganismo patógeno.

Klebsiella pneumoniae es un patógeno bacteriano importante, asociado a infecciones en la comunidad y nosocomiales, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, las cepas de *K. pneumoniae* tienen el potencial para causar morbilidad y mortalidad, particularmente en las unidades de cuidados intensivos pediátricos y servicios quirúrgicos. (54)

Fermentan la lactosa, la mayoría produce colonias sumamente mucoides en placas debido a la producción de una cápsula de polisacárido abundante y todas son inmóviles, son indol-negativas y utilizan citrato como única fuente de carbono. *K. pneumoniae* forma parte de la flora habitual intestinal y de la cavidad oral y es capaz de causar ITU y neumonía en personas por lo demás sanas, aunque casi todas las infecciones por este microorganismo se adquieren en el hospital u ocurren en pacientes debilitados por enfermedades subyacentes.

Clásicamente, *Klebsiella pneumoniae* se asocia a la neumonía lobar, de carácter necrotizante, existe una importante tendencia a la formación de abscesos, cavitación, empiema y adherencias pleurales por lo que la mortalidad es alta, la presentación clásica de la neumonía por *Klebsiella* es una neumonía lobar, casi todos los pacientes con enfermedad pulmonar por *Klebsiella* presentan una bronconeumonía o una bronquitis, con frecuencia adquiridas en el hospital (Donde llega a representar el 7-8% de las neumonías nosocomiales). *Klebsiella* ocupa el segundo lugar en la incidencia, sólo después de *E. coli*, como causa de bacteriemia por gramnegativos. *Klebsiella* es característicamente resistente a múltiples antibióticos. (55)

Pseudomonas

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gram-negativa perteneciente a la rama y de las proteobacterias, misma a la que pertenecen las enterobacterias, dentro del género *Pseudomonas* se encuentran también algunas otras especies como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* y *P. alcaligenes*. *P. aeruginosa* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. Esta bacteria es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos y se encuentra en bajas cantidades en nuestros alimentos y en algunos artículos de limpieza, representa un problema importante de salud en centros hospitalarios,

especialmente cuando se trata de pacientes con cáncer o quemados. *P. aeruginosa* produce una serie de compuestos tóxicos que causan no sólo daño tisular extenso, sino adicionalmente interfieren con el funcionamiento del sistema inmune, entre las proteínas que intervienen en la infección encontramos toxinas, como las exotoxinas A y S, así como enzimas hidrolíticas que degradan las membranas y el tejido conjuntivo de diversos órganos. (56)

Las infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa* están relacionadas al ambiente hospitalario, constituyendo un grave problema clínico. Además, casi todos los casos clínicos de infección por *P. aeruginosa* existe compromiso de las defensas del hospedero. En los pacientes adultos con bronquiectasias *P. aeruginosa* es uno de los patógenos más frecuentemente aislados con efectos negativos en cuanto a la morbimortalidad y a la calidad de vida de los pacientes. La presencia de *P. aeruginosa* está asociada con una mayor producción de esputo, mayor extensión de la bronquiectasis y mayor frecuencia de hospitalizaciones. Un ensayo clínico reportó una alta tasa de mortalidad (38%).

En la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la cual está asociada con una intensa inflamación de las vías aéreas y un pobre pronóstico, *P. aeruginosa* es reconocida como un patógeno relevante y es un factor predictivo de la enfermedad, con patrones de infección y evolución. En la fibrosis quística (FQ) *P. aeruginosa* infecta hasta más de un 90% de pacientes adultos, elevando la mortalidad y el deterioro pulmonar.

En particular la cateterización favorece el ingreso de este microorganismo en las vías urinarias; en este caso, la infección ocurre en general por la colonización de la orina dentro del lumen del catéter. Probablemente, la facilidad con la que este microorganismo se presenta en el medio ambiente posibilita que un individuo sea colonizado antes de que sus heridas puedan sanar. (57)

Bacillus

El género *Bacillus*, pertenece a la familia Bacillaceae, una de las familias bacterianas con mayor actividad bioquímica, son bacilos aerobios y anaerobios facultativos, gram positivos, producen endosporas con morfología oval o cilíndrica que le permite resistir condiciones desfavorables en el ambiente, son móviles por la presencia de flagelos laterales, son catalasa positiva, presentando hemólisis variable y un crecimiento activo en un rango de pH entre 5.5 - 8.5. La propagación activa del microorganismo se produce en medios que presentan superficie húmeda, crecen bien en agar sangre, produciendo colonias



BUAP

blanquecinas, grandes, extendidas e irregulares. Dentro de las especies más representativas encontramos a *Bacillus brevis* y *Bacillus subtilis*.

B. subtilis es predominantemente respiratorio, siendo el oxígeno el aceptor terminal de electrones, por tanto en presencia de oxígeno resulta abundante crecimiento con la formación de 2,3-butanodiol, acetoina y CO₂ (gas carbónico) como productos principales.

B. brevis está caracterizado por ser amilasa negativo, caseína negativo, gelatinasa positiva, indol negativo, Voges Proskauer negativo y la mayoría utilizadores de citrato. Las esporas poseen la capacidad de diseminarse en el aire, por tanto pueden migrar grandes distancias y ser ubicuas en el medio ambiente hasta encontrar las condiciones óptimas para su crecimiento. (57)

Aunque la mayoría de las especies de *Bacillus* son inocuas, algunas son patógenas para las personas y los animales. *Bacillus cereus* causa una intoxicación alimentaria similar a la estafilocócica. Algunas cepas producen una toxina termoestable en los alimentos que se asocia con la germinación de esporas y que genera un síndrome de vómitos en un plazo de 1 a 5 horas tras la ingestión. Otras cepas producen una enterotoxina termolábil tras la ingestión que produce diarrea en 10 a 15 horas. Se ha comprobado que *Bacillus cereus* causa bacteriemia en enfermos inmunodeprimidos, además de síntomas como vómitos y diarrea. *Bacillus anthracis* produce carbunco en personas y animales. (58)



Metodología



BUAP

Material y Reactivos

Material de laboratorio:

- Balanza analítica
- Parilla de calentamiento
- Agitadores magnéticos
- Matraz Erlenmeyer de 500 mL
- Sensidiscos de papel filtro
- Cajas Petri
- Pinzas
- Hisopos estériles

Equipos:

- Equipo CARY 630 FTIR

Reactivos:

- Ácido clorhídrico
- Peróxido de hidrogeno
- Hidróxido de Sodio
- Ácido acético
- Bisulfito de sodio
- Agua destilada
- Alcohol etílico
- Carbopol
- Alcohol cetílico
- Aceite mineral
- Cutina
- Glicerina
- Eutanol g
- Trietanolamina
- Miristato de isopropilo



- Agar Muller Hilton
- Solución Salina Isotónica

Material biológico:

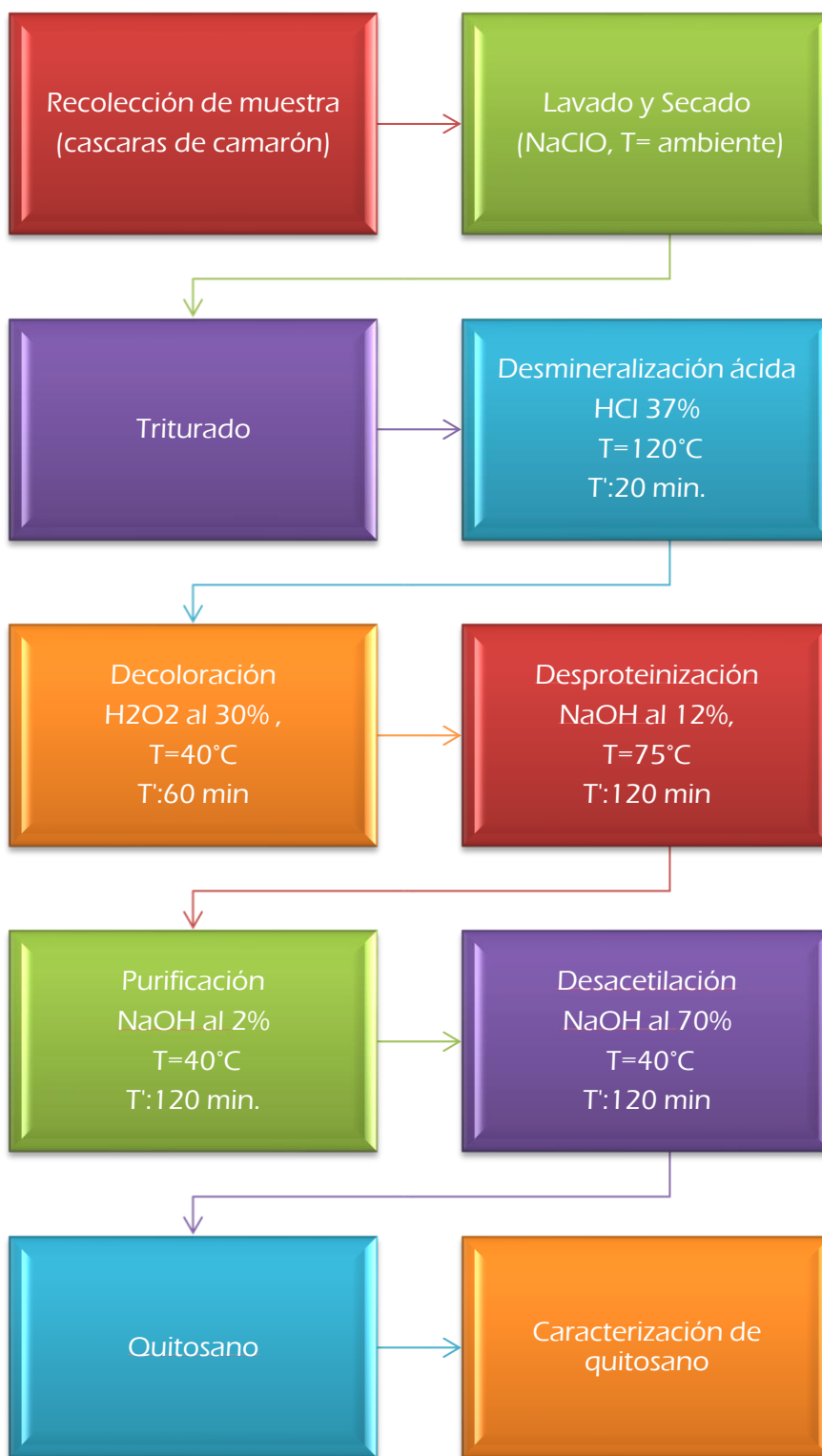
Cepas ATTC

- Bacillus
- Salmonella
- Candida
- E. coli
- Staphilococcus
- Pseudomona
- Klebsiella
-

Proceso para obtención de quitosano.



BUAP

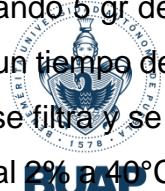


Se recolectaron las cascaras de camarón que se obtuvieron de una marisquerías de la ciudad de Puebla, y una vez recolectadas se lavaron con hipoclorito de sodio y agua poniéndose a secar a temperatura ambiente por un tiempo de 48 horas. Posteriormente las cascaras se molían en una licuadora para obtener un polvo fino y se colaron para obtener un tamaño de partícula casi uniforme, posteriormente se pesaron 50 gramos de muestra y se pusieron en un matraz Erlenmeyer de capacidad de 500ml y se le humedeció la muestra con agua destilada, agregando enseguida 100 ml de ácido clorhídrico al 37 % estos fueron agregados de 5 en 5 ml debido a que la muestra reaccionaba y se formaba espuma por lo cual se debería de tener cuidado de no derramarse la muestra, posteriormente se puso en calentamiento la muestra a 120 °C por un tiempo de 20 minutos una vez transcurrido el tiempo se hizo un lavado con agua destilada y se filtró, hasta estos momentos se ha realizado la desmineralización.

El siguiente paso es la decoloración de la muestra el cual consiste en poner la muestra tratada en peróxido de hidrogeno al 30 % a una temperatura de 40 °C por un tiempo de 60 minutos con agitación constante hasta apreciar un color amarillo-claro, como se muestra en la **Figura >>>**



Una vez terminada la decoloración se somete a un lavado de agua destilada y se filtra, en seguida se le hace la desproteínización a la muestra la cual se le agrega hidróxido de sodio a una concentración del 12% agregando 5 gr de hidrosulfito de sodio, y se pone a calentar a una temperatura de 75°C durante un tiempo de 120 minutos, hasta este momento se llega a la obtención de la quitina, la cual se filtra y se pone nuevamente a reaccionar agregando una solución de hidróxido de sodio al 2% a 40°C por un tiempo de 120 minutos, para llevar a cabo la purificación de la muestra y se filtra. **figura>>**





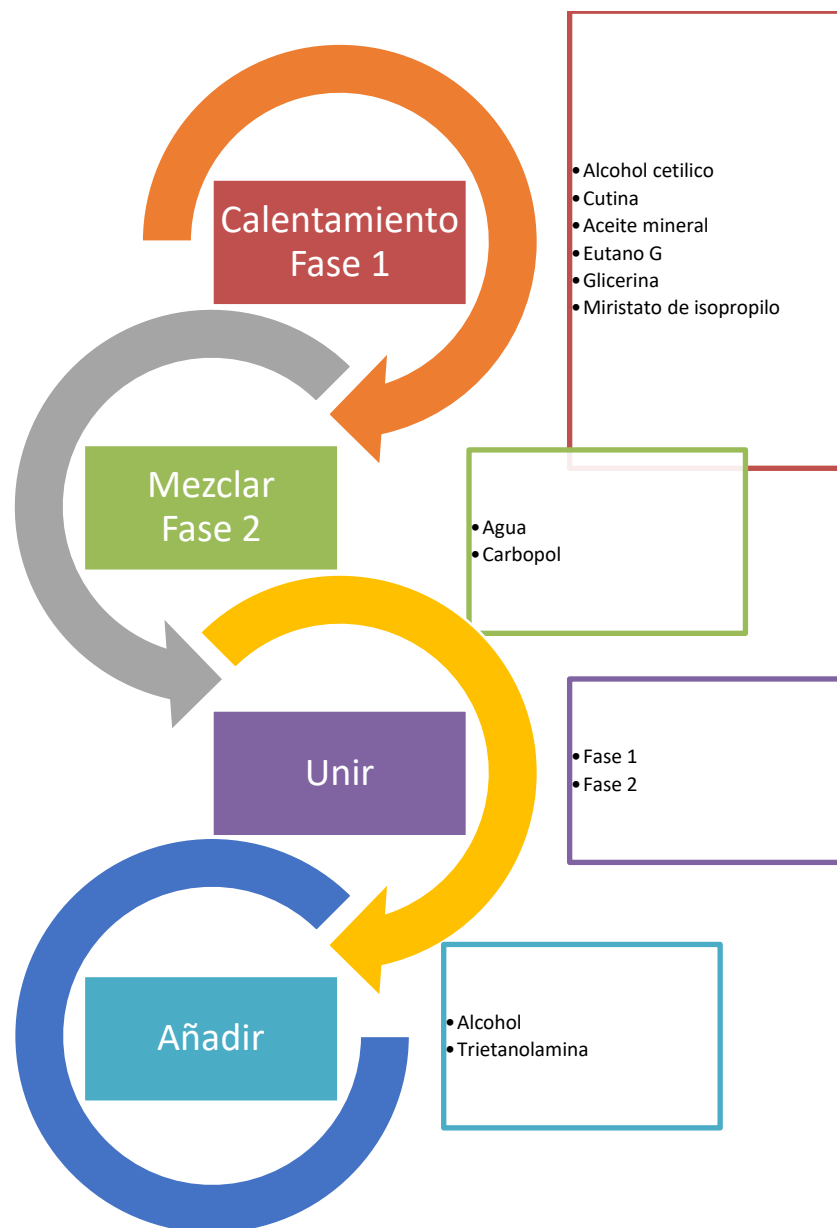
Por último se desacetilación muestra de quitina para llegar a la obtención del quitosano poniendo a reaccionar con una solución de hidróxido de sodio a una concentración del 70% a una temperatura de 40°C por un tiempo de 120 minutos, y con agitación constante una vez terminado el proceso, se somete a lavado con agua destilada hasta obtener un pH de siete y el quitosano obtenido se filtra y se pone a secar por un tiempo de 24 horas a temperatura constante como se muestra en la figura >> siguiente



ELABORACIÓN DEL GEL



BUAP



Metodología del gel

Para la elaboración del gel primero se pesa la parte oleosa de la siguiente manera alcohol cetílico 0.5 gr, Citina MO 1.5 gr, Aceite mineral 1.25 gr, Eutanol G 1.5 gr Glicerina 2 gr, Miristato de Isopropilo 1 mL y pone en calentamiento suave hasta derretir teniendo cuidado



de no sobre calienta debido a que se descompondrá la muestra poniéndose negra si se sobrecalienta.

Por otro lado se miden 30 ml de agua y se pesan 0.4 gramos de carbopol 940, y se mezcla hasta hidratarse completamente en seguida se mezcla con la parte oleosa hasta obtener un gel uniforme en seguida se le agregan 70 ml de alcohol etílico y se sigue mezclando con agitación suave hasta que se hayan integrado todos los ingredientes finalmente se le agregan gotas de trietanolamina para que tome la consistencia de gel.

Por otro lado se tomaron 0.5g de quitosano obtenido de los exoesqueletos de camarón y se disolvieron en 5 mL de ácido acético al 3%, agregándose al producto terminado con agitación constante por un tiempo de 10 minutos.



Sensibilidad antimicrobiana por método de KIRBY-BAUER





(59)

Metodología del reto antimicrobiano

Para elaborar el reto antimicrobiano se obtuvieron las cepas ATCC (American type culture collection) las cuales sirvieron como cepas de referencia y fueron recibidas en agar sangre de carnero (BHI), por un sistema básico de embalaje, las cepas fueron *E.coli*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Candida*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Pseudomonas*.

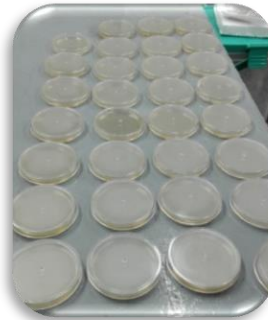
Una vez que se contó con cepas ATCC se resembraron en caldos soya tripticasa esterilizando y se dejando incubar por 24 horas a 37 °C tal como se muestra en la fig.



A continuación se preparó 800 ml de agua y 32.6 gramos del agar Muller Hilton en un matraz de 1 litro para 64 cajas petri de 25 mL. También se preparó una solución salina al

0.9% de NaCl de la cual se le agregaron 2 mL a ocho tubos de ensayo los cuales fueron tapados con torundas de algodón para evitar que se contaminaran, por separado se prepararon los discos de papel filtro en una caja petri de vidrio sellándose con cinta, a continuación se llevaron a esterilizar en un autoclave a 120°C por 15 minutos y una vez transcurrido el tiempo se deja atemperar la solución de Muller Hilton y se vertió en las cajas petri de poliestireno estériles, hasta que se solidificara, como se muestra en la siguiente figura >>

A continuación se hace la prueba de esterilidad, envolviendo en papel manila a las cajas y metiéndolas nuevamente a la estufa por 24 horas a 37°C, pasado este tiempo se revisan placa por placa para ver si no hubo contaminación y si no hay crecimiento de colonias, como se muestra en la figura →



Se tomaron cepas de caldo soya tripticaasa que se preparó previamente, y se diluyeron en 2 ml de solución salina isotónica al 0.5 del nefelómetro de Mc Farland, a partir de esta dilución se tomó una alícuota y se inoculo con un hisopo en el agar Mueller-Hilton, por estría masiva en toda la placa y se dejó reposar por 5 min, una vez pasado el tiempo se colocaron los discos de papel filtro impregnados del gel con quitosano por triplicado, metiéndose a incubar por 24 horas a 37°C como se muestra en la figura siguiente →



A las 24 horas, se sacan de la incubadora y se proceda la lectura de los resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



BUAP

Resultados

Siguiendo el método utilizado de la tesis profesional de Janet Ramirez Marquez del año 2016, se obtuvo el quitosano a partir del exoesqueleto de camarón obteniéndose lo necesario para la caracterización y elaboración del gel antibacterial.



La desmineralización es el paso más importante del proceso tal como menciona la química Janet en su tesis del 2016 ya que si no se realiza correctamente se tendrá la presencia de los minerales, los cuales interferirán en la obtención del producto final. Los factores que determinan la desmineralización en el tratamiento de las cascarras son la concentración del ácido, y la cantidad de materia prima.

La decoloración es un paso opcional ya que con este paso no se afecta a las propiedades químicas del producto final y solo nos ayuda a degradar los pigmentos que se encuentran en la materia prima. Los factores que determina este paso son la temperatura, el agente



oxidante y los tiempos de reacción. Para la decoloración se utilizó el peróxido de hidrógeno al 30% a una temperatura de 80°C por un tiempo de 30 minutos, logrando así una mayor eficacia en la degradación de los pigmentos involucrados en la materia prima.

La desproteínización es el siguiente paso donde se desnaturalizan a las proteínas que protegen a la matriz biológica y que envuelve a la quitina, si este paso no se realiza por completo, se obtendrá en menor cantidad y los factores que afectan este paso son la concentración de álcali, la temperatura y el tiempo.

Concentración de álcali: si se emplea alta concentración de álcali se debe de usar temperatura baja, sin embargo si la concentración del álcali es bajo la temperatura deberá de ser alta, esto según la literatura. Otro aspecto importante es el empleo de un agente anti oxidante como el bisulfito de sodio que evita que las cadenas poliméricas que están débiles por el uso del peróxido no se rompan.

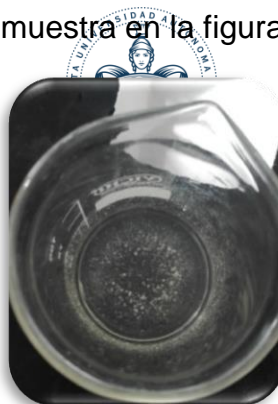
Para la purificación de la quitina obtenida de los exoesqueletos se debe de tomar en cuenta la concentración, la temperatura y el tiempo.

La desacetilación es el último paso para la obtención del quitosano y es muy importante ya que si se realiza en bajas concentraciones de hidróxido de potasio la reducción de la mayoría de los grupos amida a amina no se completará y se obtendrá en mayor proporción quitina y menor cantidad quitosano, es por ello que se emplea concentraciones al 70% de hidróxido de sodio altas a una temperatura alta por un tiempo de cuatro horas.

En este método se deben de cuidar todas las condiciones de reacción que se presentaron en los métodos por separado. Cabe destacar que en la combinación de los métodos en frío y caliente se logró observar que ambos métodos se complementaban, debido a que los desechos que producía un método el segundo podía emplearlos, reduciendo y reciclando así los residuos generados a lo largo del proceso.

Caracterización:

El quitosano obtenido fue caracterizado con una prueba de solubilidad en ácido acético al 3% ya que esta prueba confirma la presencia de éste al observar que la solución quedó transparente y viscosa como se muestra en la figura →



Para la caracterización de la muestra se empleó el de punta de diamante. En los espectros de IR se observan las bandas características de los grupos funcionales del quitosano, tales como la banda de las aminos que se encuentra en la región de los 3600 cm^{-1} y 1550 cm^{-1} ; de igual manera se observa la banda del grupo amida en la región de los 1600 cm^{-1} . Se puede observar que el espectro obtenido muestra cierta similitud con el espectro reportado por Escobar et al. 2013



En cuanto al gel obtenido se pudo observar que presentaba una buena apariencia física además de una buena consistencia ya que al aplicarse en las manos está presentaba una buena absorción y no permitía que las manos se resecaran debido a los emoliente y humectante que se le agregaron al gel, se pudo comprobar su efectividad humectante ya que se comparo con el gel comercial de la marca 3M y se pudo observar que alcanzaba una absorción semejante.



La elaboración del producto es delicada por lo que debe tenerse cuidado durante el procedimiento, para obtener un producto final con las características deseadas. Y aunque se constituyen a través de la mezcla de reactivos, ésta operación debe de hacerse metódicamente cuidando el manejo de las cantidades y secuencias de integración.



BUAP

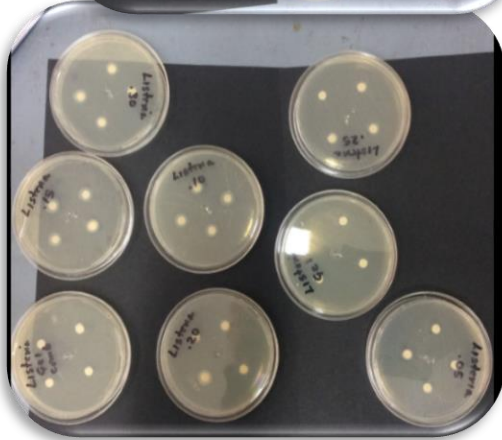
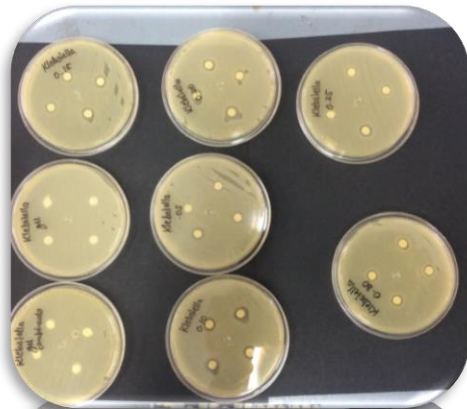
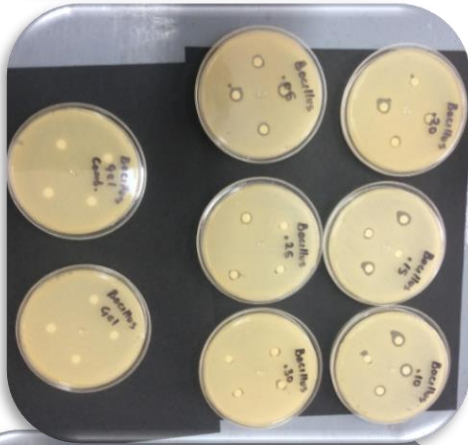
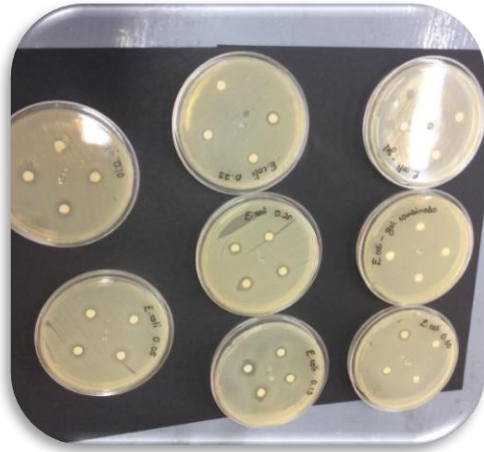
El gel que se obtuvo en el laboratorio por sí solo no proporciona la eficacia necesaria, por eso en las bibliografías consultadas mencionan que un gel debe de contener el 70% de alcohol, por lo que se ha recurrido a la inclusión de un antimicrobiano, como el triclosán, en nuestro caso se sustituyo por quitosano. Proporsionando una composición desinfectante con efectos persistentes antimicrobianos.

Se llevó a cabo la realización del reto antimicrobiano por medio de la tecnica de KIRBY-BAUER para estandarizar el diámetro del halo de inhibición y obtener una optimización de la formulación con agar Mueller Hinton. Las pruebas de sensibilidad al gel antibacterial que se realizaron, fueron con el fin de evaluar la capacidad de inhibir el desarrollo bacteriano. Se preparo una base nutritiva (Agar Soya Tripticasa) se agregaron 7 bacterias por separado para incubarlas y su concentración inoculando una serie de cepas de colección de la ATCC. Las bacterias que se trabajaron fueron: *Salmonella*, *Klebsiella*, *Candida*, *Bacillus*, *Pseudomona*, *E. Coli* y *Staphilococcus* y se sembraron uniformemente sobre el agar Mueller Hilton, posteriormente se colocaron en la superficie de éste varios discos de papel impregnados con el gel antibacterial-quitosano que se preparo en el laboratorio, siguiendo un gradiente de concentración, por otro lado se preparo una solución de quitosano marca Aldrich a diferentes concentraciones y se le realizo el reto antimicrobiano.

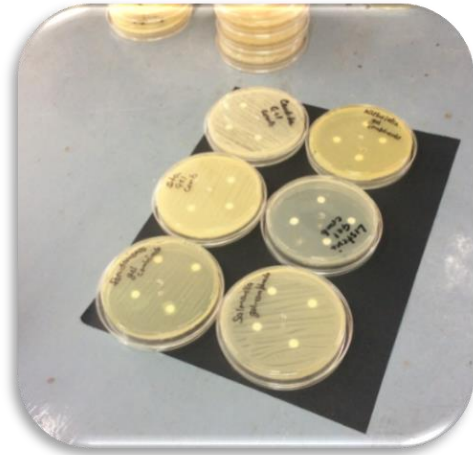
Propiedades

Related Categories	Chitosan, Chitosan and Chitin, Chitosans (Animal Origin), Materials Science, Natural Polymers and Biopolymers, Más...
biological source	from shrimp shells
grade	practical grade
mol wt	mol wt 190000-375000 Da
viscosity	>200 cP, 1 wt. % in 1% acetic acid(20 °C, Brookfield)(lit.)
solubility	1 M acetic acid: 10 mg/mL

BUAP



BUAP



Conclusiones:

- Se logro hacer un gel humectante para manos con quitosano evaluado por reto antimicrobiano.
- Se obtuvo y caracterizó el quitosano a partir de la cascara de camarón.
- Se realizó el reto antimicrobiano del gel antibacterial que se hizo con el quitosano, observándose que no tuvo la eficiencia de un buen bactericida, ya que en el proceso de impregnación del sensidisco en el gel al hacer el reto antimicrobiano no muestra inhibición en ninguna de las muestras, tomando como referencia el “chitosan grado Aldrich”, al cual también se sometió a las mismas pruebas.
- De acuerdo al artículo encontrado “Actividad antibacteriana de soluciones ácidas de quitosano obtenido de exoesqueleto de camarón” hace notar que el peso molecular del quitosano es importante para que éste funcione como bactericida



BUAP

- Se puede concluir que el gel que se obtuvo es eficiente con respecto a los emolientes y humectantes pero se tendrá que cambiar de bactericida por uno más eficiente y que no cause daños a la salud y medio ambiente.



BUAP