



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

**ANÁLISIS ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS Y
NANOPARTÍCULAS DE ORO DERIVADAS DE PLANTAS PARA
EL TRATAMIENTO DE NEUMONÍA EN TORTUGAS
(*TRACHEMYS* Y *GRAPTEMYS*).**

INFORME TÉCNICO DE LA OPCIÓN CURRICULAR
EN LA MODALIDAD DE:
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO FARMACÉUTICO**

PRESENTA
FLORES MENDOZA NALLELY

DIRECTOR INTERNO: Q.B.P. PÉREZ SÁNCHEZ REFUGIA

DIRECTOR EXTERNO: M. EN C. CHÁVEZ SANDOVAL BLANCA
ESTELA

MÉXICO, D.F. JUNIO DE 2014

SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



Instituto Politécnico Nacional
Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología



México, D.F., a 27 de mayo del 2014.
Of. No. PTIII-Farmacéutica-012/2014A
FLORES MENDOZA NALLELY
ALUMNO DEL PROYECTO TERMINAL III
DEL OCTAVO NIVEL DE LA CARRERA DE
INGENIERÍA FARMACÉUTICA
Presente

Comunico a Usted que, como resultado de la evaluación por parte de la Academia de Opción Curricular, con fecha 06 de mayo de 2014, ha quedado registrada su actividad a realizar en el Proyecto Terminal en la modalidad "PROYECTO DE INVESTIGACIÓN" en el "Departamento de Ciencias Básicas, UPIBI" desarrollando el trabajo titulado "Análisis antimicrobiano de extractos y nanopartículas de oro derivadas de plantas para el tratamiento de neumonía en tortugas (*Trachemys y Graptemys*)", bajo la dirección externa de la M. en C. Blanca Estela Chávez Sandoval e interna de la Q.B.P. Refugia Pérez Sánchez.

De cumplir con las condiciones que abajo se indican, acreditará la Opción Curricular de Titulación. Así mismo, me permito recordarle que dicha actividad deberá concluir en el octavo nivel con la entrega del informe técnico final, de conformidad con los lineamientos que para tal fin ha establecido la academia mencionada.

CONDICIONES

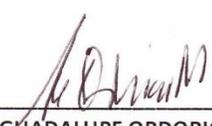
1. Permanecer en la misma modalidad en el Proyecto Terminal I, II y III.
2. Obtener una calificación igual o superior a 8.0 en Proyecto Terminal I, Proyecto terminal II y en Proyecto Terminal III.
3. Cumplir con el 90% de asistencia a las actividades asignadas y en la asignatura.
4. Cumplir con los demás requisitos que se fijan en el programa de estudios de la asignatura.

Sin otro particular por el momento, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE

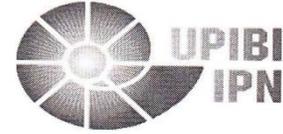
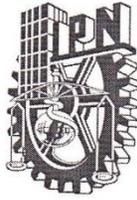


DRA. MARÍA GUADALUPE RAMÍREZ SOTELO
PROFESORA DE LA ASIGNATURA PROYECTO
TERMINAL III.



M. en C. GUADALUPE ORDORICA MORALES
JEFA DE LA CARRERA DE INGENIERÍA
FARMACÉUTICA

ccp Expediente de Proyecto Terminal



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA**

Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo
Coordinador de proyecto terminal III

Los abajo firmantes designados por el Comité de Proyecto Terminal como miembros del jurado calificador del informe final titulado **“ANÁLISIS ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS Y NANOPARTÍCULAS DE ORO DERIVADAS DE PLANTAS PARA EL TRATAMIENTO DE NEUMONÍA EN TORTUGAS (*TRACHEMYS* Y *GRAPTEMYS*)”** que presenta la **C. Nallely Flores Mendoza** de la carrera de Ingeniería Farmacéutica, informamos que después de haber revisado cuidadosamente el informe escrito consideramos que reúne las características que se requieren para su impresión y aspirar a la aprobación del Proyecto Terminal III.

Nombre	Firma
M. en C. Blanca Estela Chávez Sandoval Asesor Externo	
Q.B.P. Refugia Pérez Sánchez Asesor Interno	
Q.B.P. Martha Morales Martínez Evaluador	

Se extiende la presente a los 29 días del mes de Mayo del año 2014.

Agradecimientos

A las profesoras Refugia Pérez Sánchez, Blanca Estela Chávez Sandoval y Martha Morales Martínez por el apoyo brindado y las cosas que aprendí así como los regaños dados durante la realización de este trabajo. Sin ustedes esto no hubiera sido posible

A mis padres por los recursos tanto materiales como espirituales que me han otorgado a lo largo de mi vida y que hoy han dado su primer fruto. Los amo.

A mi único e irremplazable hermano, Jesús que me ha apoyado hasta en los momentos menos inesperados y que fue parte del trabajo que se realizó en esta investigación. Sigue adelante.

A mis abuelitas y abuelo, a mis tíos, tías y primos por las interminables palabras de aliento que siempre tiene para mí. Gracias por su amor.

A las profesoras del laboratorio de Microbiología de la Unidad Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI) por permitirme trabajar en ese espacio y por la ayuda que me otorgaron en los momentos en la que la necesite.

A mis amigos, en especial a ti Sayuri por tu apoyo incondicional. Lo logramos.

A ti Vladimir por tu amor y junto con tu familia por el apoyo incondicional que atesoro y alegra mi corazón.

*Sin la música la vida sería
un error.*

*Solo ella es capaz de
realizar el milagro de hacer
invisible lo material y
corpóreo lo espiritual*

*Solo la música descubre la
cara oculta de la realidad.*

*Solo ella nos permite viajar
a lo eterno y regresar.*

Friedrich Nietzsche

Índice

1. Introducción	1
1.1. Tortugas acuáticas.....	2
1.2. Enfermedades más comunes en tortugas.....	5
1.2.1. Enfermedades respiratorias.....	5
1.2.1.1. Proceso de respiración en una tortuga (Aspectos generales).....	5
1.2.1.2. Neumonía.....	7
1.2.1.2.1. Agente causante de la neumonía Genero <i>Pseudomonas sp</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
1.3. Tratamientos para la neumonía en tortugas.....	12
1.3.1. Terapia antibiótica. Uso de la enrofloxacin.....	12
1.3.2. Terapia por nebulización.....	16
2. Antecedentes	18
2.1. Estudios de sensibilidad por el método de difusión en agar.....	18
2.2. Propuestas de plantas utilizadas para el tratamiento de la neumonía en humanos y con posible efecto inhibitorio frente a <i>Pseudomonas sp</i>	20
2.3. Uso de nanopartículas de oro (AuNPs) sintetizadas y funcionalizadas con extractos naturales.....	27
3. Justificación	30
4. Objetivos	34
4.1.- General.....	34
4.2. Particulares.....	34
5. Metodología	35
5.1. Toma de muestra, aislamiento e identificación de <i>Pseudomonas sp</i>	35
5.2.- Obtención de extractos naturales.....	36
5.3. Biosíntesis de AuNPs.....	36
5.4. Análisis antimicrobiano (Pruebas de sensibilidad).....	37
6. Resultados	38
6.1. Aislamiento e Identificación de <i>Pseudomonas sp</i> en tortugas.....	38
6.2. Biosíntesis de AuNPs.....	41
6.2.1. Caracterización por espectrofotometría UV-Vis y por Microscopía de Transmisión de electrones (TEM) de las AuNPs obtenidas mediante biosíntesis.....	43
6.3. Pruebas de sensibilidad de <i>Pseudomonas sp</i> con los extractos de plantas y las AuNPs sintetizadas.....	46
6.4. Análisis antimicrobiano con Baytril al 5%.....	58
7. Análisis de los resultados	60
8. Conclusiones	66
9. Recomendaciones para este trabajo	67
10. Referencias	68
11. Anexos	72

Índice de figuras

Figura 1.- Concha de una tortuga.....	1
Figura 2.-Tortuga acuática.....	3
Figura 3.- Tortugas de importancia comercial.....	3
Figura 4.- Esqueleto de una tortuga.	6
Figura 5.- Aparato respiratorio de una tortuga.....	7
Figura 6.-Síntomas comunes de la neumonía que presentan las tortugas.....	8
Figura 7.- Morfología colonial de <i>Pseudomonas sp.</i>	10
Figura 8.- Estructura del genero <i>Pseudomona aeruginosa</i>	11
Figura 9.- Efecto logrado por cada radical que forma parte de la estructura de la enrofloxacin para lograr su tan exitoso efecto terapéutico.....	14
Figura 10.- Medicamento Baytril.....	15
Figura 11.- Matricaria chamomilla o manzanilla.....	17
Figura 12.- Sensidiscos y penicilindros.....	19
Figura 13.- Resultados posibles de un Antibiograma.....	19
Figura 14.- Diferentes tamaños de nanopartículas y su característico color conforme a esta propiedad.....	28
Figura 15.- Diferentes formas de las nanopartículas sintetizadas.....	28
Figura 16.- Pruebas bioquímicas realizadas a colonias sospechosas de ser <i>Pseudomonas sp</i> obtenidas de muestras bucales de tortugas.....	39
Figura 17.- Tinciones de gram realizadas a cada una de las cepas obtenidas de tortugas.....	40
Figura 18.- Nanopartículas de oro Sintetizadas.....	41
Figura 19.- Color de la reacción de nanopartículas de oro con extracto de Gordolobo y Ulmaria.....	42
Figura 20.- Fotos obtenidas del TEM de las nanopartículas de oro biosintetizadas.....	44

Figura 21.- Primeros antibiogramas con sensidiscos para discriminar aquellos extractos que no presentan inhibición.....	47
Figura 22.- Segundos antibiogramas con penicilindros que contenían extractos acuosos de ajo, cuachalalate y clavo.....	47
Figura 23.- Resultados de las pruebas de sensibilidad realizadas con los extractos de ajo, clavo y cuachalalate.....	49
Figura 24.- Resultado de las primeras pruebas de sensibilidad de las nanopartículas de oro sintetizadas con extractos naturales.....	50
Figura 25.- Nanopartículas de oro sintetizadas a mayor concentración.....	51
Figura 26.- Foto tomada por TEM de las nanopartículas de oro sintetizadas a partir del extracto de noni.....	55
Figura 27.- AuNPs sintetizadas del extracto de noni. A simple vista se observan las partículas de gran tamaño y la sedimentación.....	55
Figura 28.- Resultados de las pruebas de sensibilidad realizadas con las AuNPs de ajo, clavo, cuachalalate, pulmonaria, manzanilla, noni y hojas de olivo.....	57
Figura 29.- Resultados de las pruebas de sensibilidad realizadas con la enrofloxacina de Bayer.....	59
Figura 30.- Zona de administración por vía intramuscular en tortugas en algunos casos.....	60
Figura 31.- Peso y tamaño de una tortuga bebe <i>Trachemys scripta elegans</i>	61
Figura 32.- Jeringas de insulina. Las más pequeñas existentes en el mercado con capacidad de 1 mL.....	62

Índice de Tablas

Tabla 1.- Plantas medicinales propuestas para estudiar el posible Efecto antibiótico de estas en <i>Pseudomonas sp</i>	21
Tabla 2.- Presentaciones de Baytril encontradas en el mercado.....	32
Tabla 3.- Pruebas bioquímicas para <i>Pseudomonas sp</i> según lo reportado en la NOM 089	35
Tabla 4.- Origen de las cepas obtenidas de <i>Pseudomonas sp</i> aisladas de tortugas.....	38
Tabla 5.- Valor de pH, parte fundamental en la biosíntesis de nanopartículas.....	42
Tabla 6.- Longitud de onda máximo, diámetro y morfología de las nanopartículas obtenidas	43
Tabla 7.- Resultados cualitativos de las pruebas de sensibilidad discriminatorias de los extractos de las plantas anteriormente propuestas.....	46
Tabla 8.- Diámetro de los halos de inhibición generados por los extractos frente a cada una de las cepas aisladas de <i>Pseudomonas sp</i>	48
Tabla 9.- Longitud de onda máxima obtenida (método de UV-Vis) y posibles tamaños de las nanopartículas sintetizadas en un volumen de 10 mL.....	52
Tabla 10.- Resultados de las pruebas de sensibilidad con AuNPs biosintetizadas por segunda vez.....	56
Tabla 11.- Diámetro de los halos de inhibición generados por el Baytril 5% frente a cada una de las cepas aisladas de <i>Pseudomonas sp</i>	58
Tabla 12.- Comparación de los resultados obtenidos de las dos biosíntesis de AuNPS realizadas.....	64

Índice de Graficas

Grafica 1.- Principales causas y número de especies de reptiles en Europa que se encuentran amenazadas.....	31
Grafica 2.- Espectro de absorción UV-Vis de AuNPs biosintetizadas en un volumen menor de agua (10 mL).....	53
Grafica 3.- Espectro de absorción UV-Vis de AuNPs de noni biosintetizadas en un volumen menor de agua (10 mL).....	54

“ANÁLISIS ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS Y NANOPARTÍCULAS DE ORO DERIVADAS DE PLANTAS PARA EL TRATAMIENTO DE NEUMONÍA EN TORTUGAS”

Nallely Flores Mendoza¹. Q.B.P. Refugia Pérez Sánchez¹. M en C. Blanca Estela Chávez Sandoval².

¹ Departamento de Ciencias Básicas. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Instituto Politécnico Nacional (UPIBI-IPN). Av. Acueducto s/n Colonia Barrio La Laguna Ticomán Delegación Gustavo A. Madero C.P. 07340

² Departamento de Ciencias Básicas. Laboratorio de Microbiología Ambiental. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Azcapotzalco (UAM-A). Av. San Pablo no. 180 Colonia Reynosa Tamaulipas Delegación Azcapotzalco C.P. 02200.

nallely_142004@hotmail.com, blanchavez29@gmail.com

Introducción

Las tortugas son animales que se compran para ser mascotas de niños por sus colores y formas del caparazón atractivas. Sin embargo los niños no cuentan con la suficiente madurez para hacerse cargo de éstas por lo que generalmente presentan problemas como la neumonía. Esta enfermedad resulta en la inflamación de los pulmones principalmente por infecciones de bacterias patógenas como la *Pseudomonas aeruginosa*.

Metodología

El trabajo incluye cinco etapas. La primera consistió en el aislamiento y la identificación de *Pseudomonas sp* obtenidas de muestras bucales de 30 tortugas del género *Graptemys* y *Trachemys* con pruebas bioquímicas reportadas en la bibliografía. La segunda etapa fue obtener los extractos naturales de las plantas que se propusieron para el tratamiento de la neumonía para ser usados en análisis de sensibilidad. La tercera etapa fue la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) con la técnica de *Turkevich* modificada (1951) y *Rico Moctezuma* (2010) en base a una reacción de oxidación de las sales de oro con extractos naturales de *Syzygium Aromaticum* (clavo), *Matricaria Chamomilla* (Manzanilla), *Morinda Citrifolia* (Noni), *Lobaria Pulmonaria* (Pulmonaria), *Filipendula ulmaria* (ulmaria), *Adstringens amphiptyerygium* (Cuachalalate), *Gnaphalium viscosum* (Gordolobo), *Olea europea* (hojas de olivo) y *Allium sativum* (Ajo) como agentes reductores. La cuarta etapa consistió en la caracterización de las AuNPs por Microscopía Electrónica de Transmisión y Espectroscopia UV-Vis para la identificación del diámetro de partícula y la morfología. La quinta etapa se trabajó a la par con la cuarta y fue el análisis antimicrobiano de las *Pseudomonas sp* aislado de tortugas con los extractos naturales y las AuNPs para observar si existía sensibilidad o no. A esta etapa se le agregó el con la enrofloxacina como punto de comparación.

Resultados y discusión

De las 9 plantas propuestas para el tratamiento de la neumonía únicamente los extractos de ajo, cuachalalate y clavo así como las AuNPs sintetizadas con estos mismos extractos presentaron efecto inhibitorio positivo pero no en todas las cepas aisladas. A estos resultados se incluyen las AuNPs de manzanilla atribuyendo esto a la concentración del extracto de manzanilla que fue menor a comparación del extracto puro. El tamaño de los halos de inhibición que se presentaron en ambos

casos oscila en diámetros de entre uno y dos centímetros que se consideran pequeños en comparación con los obtenidos con la enrofloxacina que se encuentran en diámetros superiores a los cuatro centímetros. Pese a lo anterior no se debe descartar el uso de estas plantas y esta técnica nanotecnológica debido a que la enrofloxacina es un fármaco de alto espectro que incluye bacterias Gram negativas, Gram positivas y micoplasmas que pueden generar otros problemas en las tortugas por efecto de la inhibición de la flora normal de estas. Con respecto a la síntesis y caracterización de las AuNPs de las nueve plantas propuestas se presentó una síntesis negativa con los extractos de gordolobo y ulmaria atribuyendo esto a la baja concentración de metabolitos secundarios que funjan como agentes reductores. De las otras nanopartículas sintetizadas estos tamaños oscilan de entre los 20 y 100 nm de diámetro con formas irregulares, esféricas y triangulares.

Conclusiones

El extracto acuoso de ajo, cuachalalate y clavo y sus AuNPs son agentes que inhiben algunas cepas aisladas de *Pseudomonas sp* pertenecientes a la flora bacteriana normal de las tortugas de la familia *Trachemys* y *Graptemys* muestreadas. También presentaron inhibición las AuNPs de manzanilla frente a una única cepa de *Pseudomonas sp* atribuyéndolo a la concentración menor del extracto de manzanilla. También no todas las plantas son capaces de proveer agentes reductores y agentes dispersantes para sintetizar AuNPs como es el caso de la *Filipendula ulmaria* (ulmaria) y *Gnaphalium viscosum* (gordolobo) atribuyendo esto a que los metabolitos secundarios que se encuentran en las plantas no actúan como agentes reductores o en su defecto como agentes dispersantes que son aquellos que evitan su aglomeración.

Agradecimientos

A las profesoras Blanca Estela Chávez Sánchez, Refugia Pérez Sánchez y Martha Morales Martínez por su apoyo durante la realización de este trabajo. Al Laboratorio de Microbiología de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI) por permitirme usar sus instalaciones.

Bibliografía

Turkevich, P., S. Cooper, y J. Hillier. «A Study of the Nucleation and Growth Process in the Synthesis of Colloidal Gold.» *J. Discuss. Faraday Soc.*, nº 11 (1951): 55-75.
Rico-Moctezuma, A., A.R. Vilchis-Nestor, V. Sanchez-Mendieta, Avalos-Borja M., y M.A. Camacho-López. «Biosíntesis de nanopartículas de oro mediante el extracto de *Opuntia ficus indica*.» *Superficies y Vacío*, nº 23 (2010): 94-97.

1. Introducción

Las tortugas son animales poiquiloterms (Boylan, 2003), es decir, animales de sangre fría que no son capaces de producir calor por sí mismo y dependen de otros medios para calentarse cuando se encuentran en cautiverio o simplemente de la temperatura ambiente típica de su hábitat cuando se encuentran en estado libre, por ello pertenecen a la clase *Reptilia* (del latín *reperere* que significa arrastrarse) o a los reptiles (animales que se encuentran desde hace miles de años en el planeta) entrando por clasificación en el orden de los Quelonios u orden *Chelonia* distinguiéndose de otros vertebrados por tener una estructura exterior de protección llamada concha por la cual se dan entrada y salida las extremidades (patas), cabeza y cloaca (cola) aportando principalmente la protección a los órganos y estructuras internas de la misma (Figura 1). Esta concha está dividida en dos partes superior e inferior llamadas caparazón y plastrón respectivamente como se puede apreciar en la figura 1.

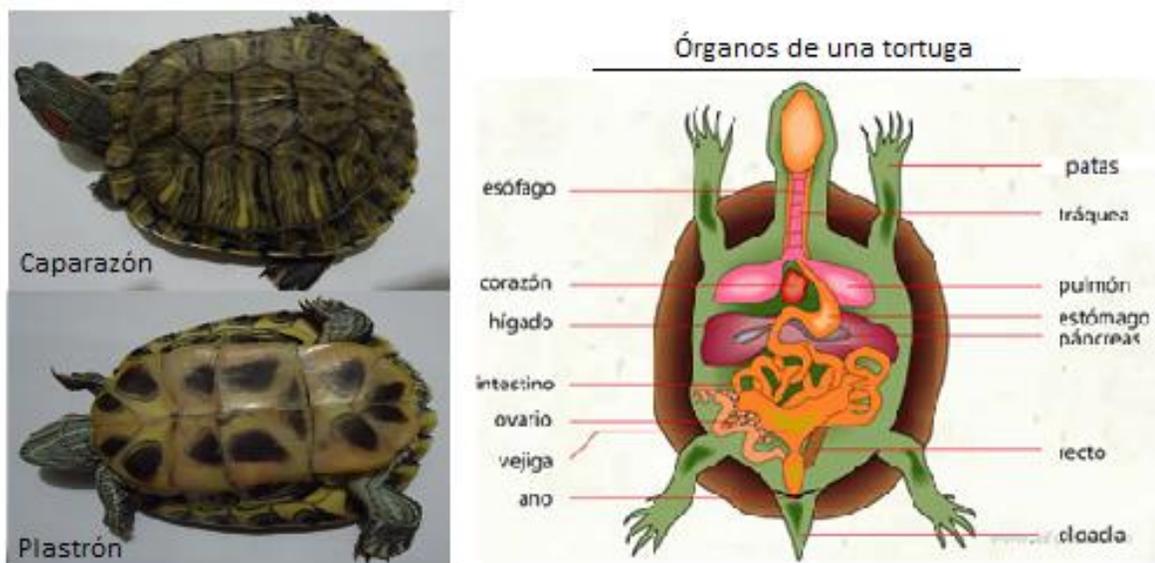


Figura 1.- Concha de una tortuga. Esta estructura sirve de protección a los órganos internos del ejemplar y da salida a las extremidades y colas.

Se les distingue, también, de otro tipo de animales por características particulares del género como el que tienen una larga longevidad, pues una tortuga puede llegar a vivir alrededor de 100 años dependiendo principalmente del modo de vida que lleve, a que no emiten sonido, tienen memoria, un buen sentido de la vista y olfato, su tamaño es variado, el cual puede ser desde centímetros hasta metros como es el caso de las Tortugas terrestres de la isla Galápagos y su forma de respiración, que es diferente a otros animales e incluso variada dentro de este grupo puesto que como sus costillas se encuentran fijadas al caparazón los procesos de inspiración de oxígeno y expiración de bióxido de carbono no son lo que comúnmente conocemos (más adelante se describirá ese proceso).

El orden *Chelonia* cuenta con alrededor de 250 especies diferentes de tortugas con tamaños, colores, condiciones de vida y formas variadas. Se clasifican de manera general en tortugas terrestres, marinas y acuáticas en base al tipo de hábitat donde se encuentra. La diferencia entre las tortugas marinas y las acuáticas es la zona acuosa, las primeras se encuentran en lugares de agua salada como los mares mientras las segundas se encuentran en zonas de agua dulce como ríos, lagos y lagunas. Estas últimas son las que tienen una mayor importancia comercial por su amplia distribución en el mercado de mascotas.

1.1.- Tortugas acuáticas

Se les conoce también como tortugas semi acuáticas, acuícolas o de estanque porque son tortugas en cuyo hábitat se pueden encontrar a una porción de agua dulce mucho mayor que la de tierra porque estas gustan de nadar y solo salir a tierra a descansar. La característica principal de esta especie radica en la forma de las patas. Las patas traseras están en forma de pala y muy planas por tener una membrana que les sirve como impulsores al momento de desplazarse dentro del agua. Las patas delanteras, sin embargo, se caracterizan por tener garras que tienen la función de desgarrar el alimento cuando es necesario (Wilke & Anders, 1999).



Figura 2.-Tortuga acuática. Foto tomada de www.mundomascota.net

Dentro de esta clasificación existe ordenamiento de género por las características morfológicas que pueden compartir las tortugas de este tipo, de los cuales destacan principalmente en el ámbito comercial las tortugas del género *Trachemys* y *Graptemys*, que a su vez se vuelven a clasificar en especies, las cuales reciben su nombre específico y único que las distingue de otras pertenecientes al género. De las especies antes mencionadas *Trachemys scripta elegans* y *Trachemys scripta venusta* del género *Trachemys* y *Graptemys köhni* y *Graptemys pseudogeographica* del género *Graptemys* son las más importantes y conocidas comercialmente, también objetos de este trabajo (Figura 3). Más información de estas especies en el anexo A.

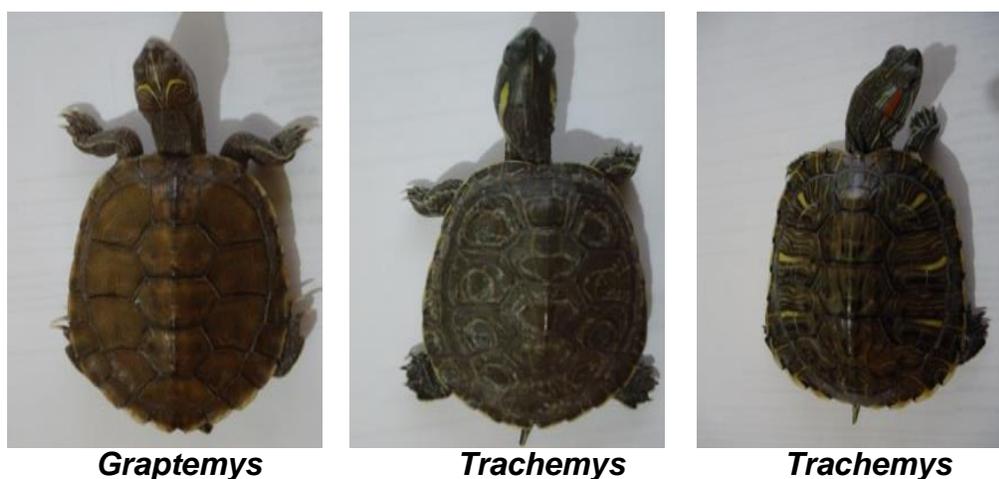


Figura 3.- Tortugas de importancia comercial.

Reciben el nombre común de tortuga japonesa o de orejas rojas (*Trachemys scripta elegans*), tortuga pavorreal (*Trachemys scripta venusta*), tortuga mapa (*Graptemys köhni*) y tortuga falsa mapa o simplemente mapa (*Graptemys pseudogreographica*). Son bien recibidas tanto en los mercados legales como ilegales por la gente que desea hacerse de una tortuga. De estas tres la que se conoce que tiene una mayor venta es la tortuga japonesa por sus altos niveles de reproducción y porque es la más común en dichos mercados, pero no significa que por ello sea apta del todo para ser la mascota ideal. Lo anterior debido a que aunque estos ejemplares son capaces de sobrevivir bien al cautiverio, se ha visto que su adquisición se lleva a cabo de manera inconsciente y deliberada sin importar al comprador si los ejemplares provienen de un criadero en cautiverio o han sido capturadas de sus hábitats naturales provocando que algunas especies se encuentren en peligro de extinción. Al no saber su procedencia no pueden proporcionarles los cuidados adecuados para su supervivencia. Este problema se agudiza ya que los padres de familia consideran comprarlas antes que un perro o un gato por su bajo costo, su abundante presencia en varios puntos de venta, y la idea errónea de que tienen un fácil manejo y no requieren muchos cuidados. Adquieren pues el ejemplar y después lo olvidan en un traste con agua fría y sucia en algún rincón de la casa, provocando que desarrolle enfermedades que si no son tratadas a tiempo y adecuadamente pueden ser mortales para el animal e incluso en ocasiones, ser transmitidas al humano.

Por lo anterior es importante fomentar el cuidado de la especie de manera consciente y comprometida.

1.2. Enfermedades más comunes en tortugas

Dentro de las enfermedades que son más comunes en el mundo de las tortugas provocadas principalmente por descuidos cuando estas se encuentran en cautiverio tenemos las enfermedades óseas metabólicas, el edema de ojos o conjuntivitis, abscesos auriculares u otitis, la distocia (problemas con la liberación de los huevos) y algunas enfermedades respiratorias importantes como la neumonía, las cuales de no ser tratadas de manera adecuada e inmediata pueden ser mortales. Esta última es la que causa mayores números en cuanto al descenso de ejemplares acuáticos y terrestres principalmente.

1.2.1. Enfermedades respiratorias

Estas enfermedades son de las más comunes en la práctica clínica veterinaria. Se deben principalmente a que las tortugas no cuentan con un diafragma como los humanos y no pueden realizar algunos movimientos como el toser para poder descargar sus pulmones por lo que algunos materiales como las flemas no pueden ser expulsados, si no con ayuda de otros mecanismos descritos a continuación.

1.2.1.1. Proceso de respiración en una Tortuga (Aspectos generales)

Una tortuga cuenta con un caparazón que le sirve de protección a sus órganos. Esta estructura no es flexible y tiene fijada la columna vertebral y las costillas (Figura 4), por lo cual el proceso de inspiración y expiración no se realiza con apoyo de estas, como en el caso de algunos otros animales como los humanos, sino con otros métodos como el movimiento de entrada y salida de las extremidades y los músculos que forman los pulmones.

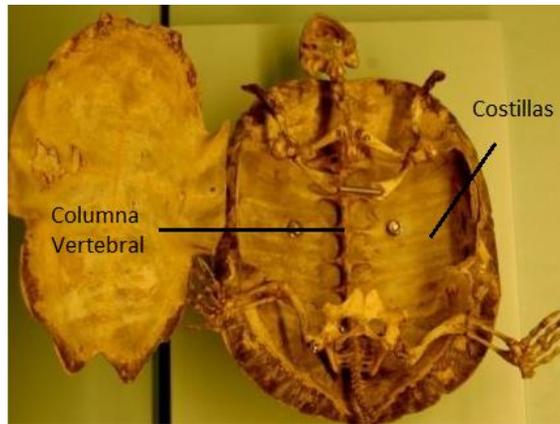


Figura 4.- Esqueleto de una tortuga. Las costillas y la columna vertebral se encuentran fijas al caparazón de una tortuga por lo cual no intervienen en el proceso de respiración.

Para entender un poco más lo anterior necesitamos conocer a detalle el proceso de respiración. Este se lleva a cabo a través de las fosas nasales de la Tortuga de manera casi exclusiva. Al inspirar oxígeno, este penetra por la cavidad bucal hasta la tráquea a través de la glotis (músculo que funciona como punto de acceso del aire). Este grupo de estructuras en la tortuga forman un canal que tiene su inicio en la base de la lengua y se conecta hasta en sus más últimos niveles con los bronquios y alveolos pulmonares (Figura5), por lo cual el oxígeno entra casi de manera directa llevándose a cabo el proceso de respiración. Pese a que es casi directa la entrada de oxígeno a los pulmones de la tortuga, está en algunos casos suele utilizar las extremidades superiores e inferiores como fuerza de expulsión, metiéndolas y sacándolas para lograr la contracción de los mimos. Pero también existe otro mecanismo natural que apoya a realizar este proceso de manera bioquímica ya que los pulmones están constituidos por capas de varios grupos musculares, como el musculo liso y tejido conectivo con una superficie de aspecto reticulado que al recibir las señales correctas dichos músculos, generan la compresión de los pulmones permitiendo así la salida del oxígeno (Meneghel, 2006) como si se estuviera tratando de un globo que se aprieta para desinflarlo .

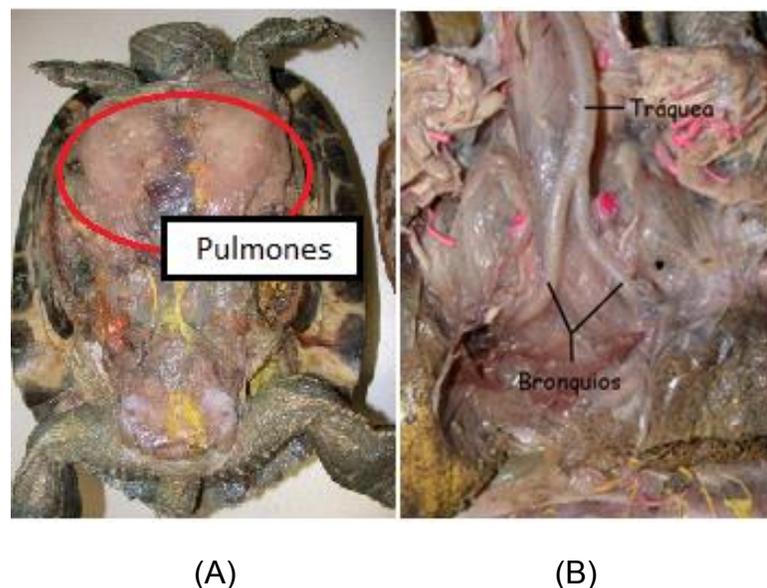


Figura 5.- Aparato respiratorio de una tortuga. A) Pulmones de una tortuga. B) Tráquea y bronquios de una tortuga. Fotos tomadas de www.forotortuga.com

Estas flemas, por ejemplo, se pueden presentar por una dieta deficiente del animal, condiciones antihigiénicas del hábitat, un inapropiado sustrato en el caso de las tortugas terrestres y una inadecuada temperatura del agua para tortugas acuáticas (Ballard & Cheek , 2003) que al acumularse van mermando su salud y propiciando distintos problemas al ejemplar.

Dentro de estos problemas de salud antes mencionados, uno de los más graves es la neumonía que las tortugas presentan ya que si no es tratada a tiempo puede complicarse con otro tipo de enfermedades y causar la muerte del ejemplar.

1.2.1.2. Neumonía

La neumonía se debe a la inflamación de uno de los pulmones, favorecida principalmente por cambios bruscos de temperatura o una temperatura inadecuada del hábitat, estrés, malnutrición (Martinez & Soler , 2008) e infecciones causadas por microorganismos. Los síntomas son el nado de lado en el caso de las tortugas acuáticas debido a la inflamación del pulmón, presencia de moquillo en las cavidades nasales (en ambos tipos), problemas evidentes de respiración

como la inspiración forzada y falta de apetito (Ballard & Cheek , 2003) como se puede observar en la figura 6.



Figura 6.-Síntomas comunes de la neumonía que presentan las tortugas. La foto de la izquierda muestra a una tortuga tratando de jalar aire, la foto del centro muestra una tortuga que nada de lado y la foto de la derecha muestra una tortuga con mucosidad.

La causa de la enfermedad puede ser de origen bacteriano (causada por bacterias oportunistas) o viral (causado por herpes virus), considerada como grave cuando se contrae porque la tortuga puede morir en horas por lo que es vital aplicar un tratamiento efectivo de manera inmediata. Dentro de los principales tratamientos está comprobada como eficaz la antibioterapia sistémica a base de bactericidas de amplio espectro administrados por vía oral, vía intramuscular o vía inhalatoria. Estos antibióticos de amplio espectro deben ser seleccionados conforme el o los agentes patógenos que está produciendo dicha enfermedad, los cuáles pueden ser identificados en base a la interpretación de los síntomas visibles y el cultivo microbiológico de exudados o lavados y aspirados bronquiales (Martinez & Soler , 2008). También para el diagnóstico de la enfermedad se recomienda tomar radiografías de la zona pulmonar para ver el grado de afectación de estos y tomar otro tipo de medidas (Ballard & Cheek , 2003).

De lo anterior podemos decir que los agentes que comúnmente causan la neumonía en las tortugas son patógenos oportunistas, parte de la flora normal de la especie, como lo son la *Escherichia coli*, *Aeromonas*, *Pasteurella*, *Proteus*, *pneumococos*, *micoplasma*, *virus* (Martinez & Soler , 2008), *Pseudomonas sp* (Ruiz, 2007), *Klebsiella pneumoniae* (Martinez, et al., 2011), entre otros, que

afectan tanto las vías respiratoria altas y bajas. Esto no es específico de tortugas, estos agentes patógenos pueden afectar a otro tipo de animales de origen vacuno, bovino, porcino, aves, perros y gatos.

Dentro de los microorganismos antes mencionados las *Pseudomonas* son el género con mayor interés en este trabajo especialmente la *Pseudomona aeruginosa* ya que es la principal sospechosa de ser la causante de dicha enfermedad puesto que también en humanos puede producir neumonía.

1.2.1.2.1. Agente causante de la neumonía. Genero *Pseudomonas sp* y *Pseudomona aeruginosa*

El género *Pseudomonas* pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*. Este género es bien conocido por su capacidad rápida de crecimiento (temperaturas óptimas para la mayoría de estas de entre 30°C-37°C) así como la habilidad de metabolizar una amplia variedad de sustratos como hidrocarburos alifáticos y aromáticos. También se le conoce por su capacidad de producir morfologías coloniales variadas, distintivas y pigmentadas debido a que algunas subespecies (como la *Pseudomona aeruginosa*, *Pseudomona chlororaphis* y la *Pseudomona fluorescens*) son capaces de producir una clase de pigmentos que pueden ser o no fluorescentes. El pigmento fluorescente es de color amarillo-verdoso que al ser expuesto a la luz ultravioleta de longitud baja causa un brillo fluorescente mientras que el que no fluorescente es de color azul verdoso como se puede observar en la figura 7 (Ruiz, 2007).

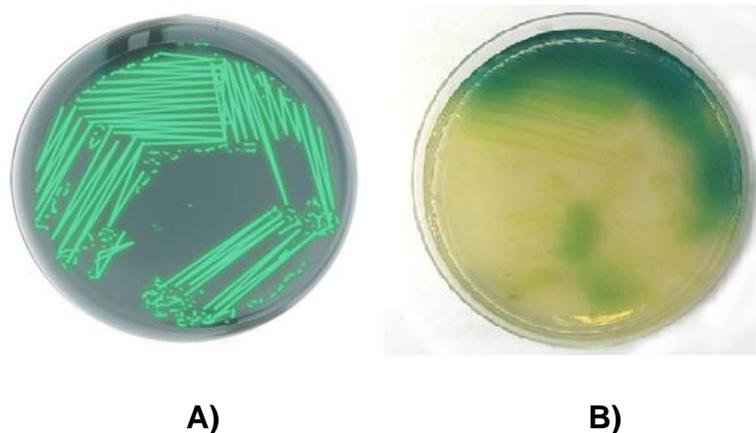


Figura 7.- Morfología colonial de *Pseudomonas* sp. A) Colonias de *Pseudomonas* productoras de pigmentos fluorescentes (*Pseudomonas fluorescens*) en base agar cetrimida. B) Colonias de *Pseudomonas* productoras de pigmentos no fluorescentes en base agar *Pseudomonas* (*Pseudomonas aeruginosa*).

También dentro de este género a parte de la producción de pigmentos, se encuentran características morfologías variadas en cuanto a la “agresividad” de la cepa debido a la presencia de una capsula de polisacáridos, especialmente formada de alginato, protectora que hace que las colonias sean mucosas (las cuales son aisladas principalmente de pacientes con fibrosis quística, una enfermedad por defecto genético que es heredada y provoca la acumulación de moco en algunos órganos como el páncreas, hígado e intestino, pero principalmente en pulmones y que es altamente mortal) y brillosas que pueden ser confundidas con otros géneros como la *Klebsiella* sp . Esta capa de polisacáridos les confiere la cualidad de ser resistente a algunos antibióticos, ya que por su tamaño estos pueden no atravesar la membrana, haciendo difícil el acceso al interior celular, lo que provoca que cada vez sea más difícil su erradicación y recuperación del paciente portador. También dicho polisacárido permite la adherencia de las colonias a las células epiteliales formando parte del biofilm (complejo bacteriano) que forma esta especie (Ruiz, 2007).

De este género se sabe que la bacteria con mayor importancia es la *Pseudomonas aeruginosa*. Fue aislada por primera vez en 1872 por Schroeter y su nombre proviene de la palabra aeruginoso que significa “el color del cobre oxidado” debido a que estas tienen un característico color azul-verdoso (Ruiz, 2007).

Morfológicamente es un bacilo Gram negativo, recto o ligeramente curvados con una longitud de 0.5 a 1 μm por 1.5 a 5 μm , que se desplazan mediante uno o varios flagelos polares (Figura 8) con metabolismo quimio heterótrofo de origen aerobio que utilizan el oxígeno y a veces el nitrato como receptores de electrones para llevar a cabo su metabolismo respiratorio.

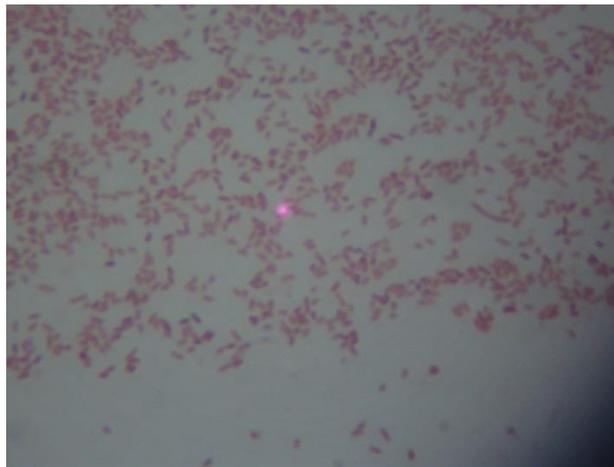


Figura 8.- Estructura del genero *Pseudomonas sp.* Aumento 100X

Es oxidasa y catalasa positiva y no crece en condiciones ácidas donde el pH es de 4.5 o menor. Crece en medios ricos pero se ha encontrado que es capaz de sobrevivir en ambientes acuosos con los nutrientes mínimos requeridos por lo que se ha aislado de lugares menos esperados como los hospitales. Dentro de estos las zonas donde se ha encontrado dicho patógeno son las superficies de equipos e instrumentos, materiales y pacientes con heridas expuestas causando una serie de problemas que se han vuelto un tema de salud de gran interés e importancia. También se sabe que es un patógeno en plantas y animales y que le gusta causar infecciones en las corneas, piel, tracto urinario y respiratorio principalmente de estos últimos.

Lo anterior referente a que causa infecciones en el tracto respiratorio nos hace retomar el tema de la neumonía en tortugas, con un sistema inmune deprimido. El proceso de infección y producción de la enfermedad por parte de esta bacteria, por un lado se debe a que las cepas con baja patogenicidad invaden de manera rápida los tejidos debido a la inmunosupresión que sufre el huésped y por otro a la alta resistencia a los antibióticos que de manera natural presenta el género *Pseudomonas* (tengan capa de polisacárido o no) , haciendo así difícil el tratamiento de las infecciones causadas por patógenos, convirtiéndolo en un reto tanto para médicos como para veterinarios (Ruiz, 2007).

El reto para los veterinarios en el tratamiento contra *Pseudomonas sp* consiste en encontrar una serie de antibióticos que tengan efecto inhibitorio contra esta que no sean tóxicos para los animales. Los antibióticos hoy existentes son antibióticos de amplio espectro, los cuales serán la primera opción de uso de los tratamientos alopáticos en todos los casos cuando se presentan problemas del tracto respiratorio en animales causada por bacterias patógenas oportunistas como la antes mencionada.

1.3. Tratamientos para la Neumonía en tortugas.

Para tratar la neumonía que suelen contraer las tortugas por efecto de la proliferación de *Pseudomonas* (o de alguno otro microorganismo oportunista ya mencionado anteriormente) en las vías respiratorias de estas se utiliza comúnmente un solo fármaco, la enrofloxacin.

1.3.1. Terapia antibiótica. Uso de la Enrofloxacin

Es un fármaco perteneciente a la familia de las quinolonas y subfamilia de las Fluoroquinolonas (quinolonas que se encuentran sustituidas en la posición 6 del anillo bencénico base por un átomo de flúor). El átomo de flúor presente en la molécula aporta la modificación de la potencia del efecto antibiótico contra una amplia gama de microorganismos). Este tipo de agentes antimicrobianos es un grupo de fármacos sintéticos derivados de la cloroquina, desarrollada por primera

vez por Leshner en 1960. Este grupo de antibióticos recibe su nombre genérico debido a que ya se estableció como referencia para poder favorecer su comparación puesto que todas comparten un mismo mecanismo de acción basado en la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos interrumpiendo la replicación, la transcripción, la reparación, recombinación y transposición del DNA de los microorganismos independientemente de la variación de las estructuras.

Este fármaco fue el primer compuesto que se logró obtener (de manera sintética) de la familia de las Fluoroquinolona. Tiene acción bactericida de amplio espectro que actúan inhibiendo la DNA girasa bacteriana o topoisomerasa II impidiendo la replicación y transcripción del DNA así como la separación del cromosoma bacteriano durante la división bacteriana inhibiendo la topoisomerasa IV, utilizada para el tratamiento de las infecciones de los órganos respiratorios y digestivos, del aparato urinario, del oído y de la piel en varias especies de animales como gatos, perros, aves, ganado y especies exóticas.

Su amplia efectividad ante muchos microorganismos (más información acerca de esta gama de microorganismos que inhibe se encuentra en el anexo C) se basa en el hecho de que es de 600 a 5000 veces más potente que otros inhibidores de la DNA girasa que se conocen actualmente porque posee dos sitios de unión al ADN bacteriano interrumpiendo así la acción de las Topoisomerasa II y IV (la primera encargada de la apertura de la cadena para los procesos de replicación y transcripción mientras que la segunda permite la separación de las cadenas hermanas para la formación de una nueva bacteria) así que si se presenta la inhibición de un mecanismo existe el otro para lograr el efecto antibiótico y así eliminar problemas de antagonismo que se puedan presentar con el uso de otro tipo de medicamentos o situaciones de resistencia de las bacterias (Grupo Bayer , 2014).

Químicamente recibe el nombre de ácido 1-ciclopropil-7- (4-etil-piperacilil)-6-Fluoro-1, 4-dihidro-4-oxoquinolin-3-carboxílico pero es mejor conocido por Enrofloxacin. Le debe su éxito a cada uno de los sustituyentes que poseen su

estructura como se puede ver en la figura 9. Cada uno de estos sustituyentes cumple una función dentro de la metabolización de este fármaco.

Cuenta con un grupo ciclopropil en la posición uno de la estructura básica (piperidina) unida al nitrógeno que le da un aumento en general de la eficacia. En la posición 6 del anillo benzoico cuenta con el Flúor que presenta eficacia frente microorganismos gram positivos, gram negativos y micoplasmas. El grupo carboxilo unido a la estructura principal es el que permite la unión con la DNA girasa. El grupo 4-etil- 1- piperacínil le confiere a la molécula una eficacia extra contra *Pseudomonas*. La estructura central es considerada una oxiquinolona con diferentes sustituyentes.

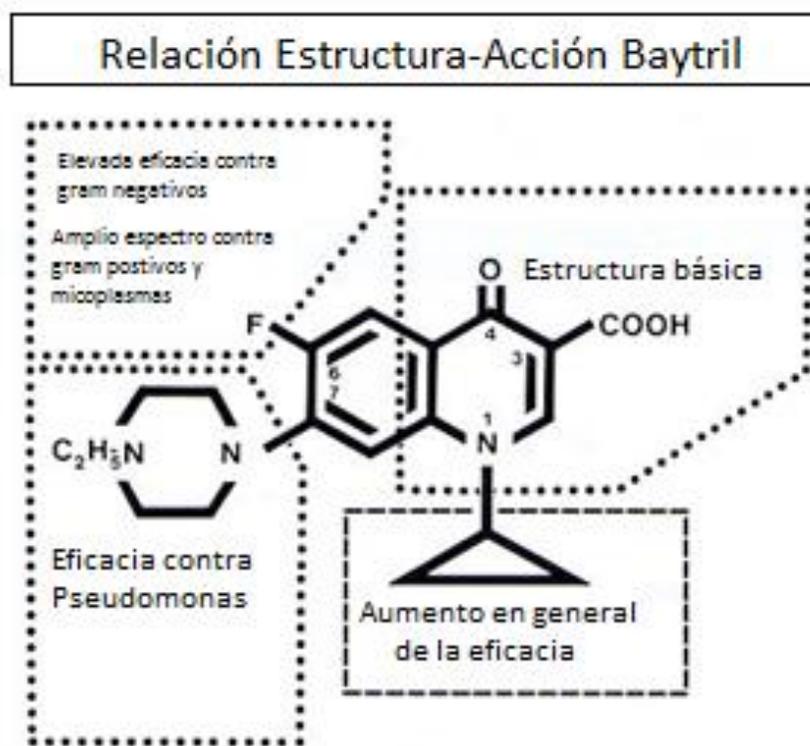


Figura 9.- Efecto logrado por cada radical que forma parte de la estructura de la enrofloxacin para lograr su tan exitoso efecto terapéutico. Imagen tomada de www.bayersanidadanimal.com.mx

Es fabricado por algunas empresas farmacéuticas, pero la industria de interés de este trabajo es Bayer debido a las diferentes presentaciones que este le

dio al medicamento conforme el uso que va a tener. Comercialmente se conoce como Baytril y en la mayoría de sus presentaciones este principio activo se encuentra para administrarse vía subcutánea aunque también lo hay para vía oral (Figura 10).



**Figura 10.- Medicamento Baytril. Propiedad de Bayer.
Principio activo enrofloxacin.**

Cada una de las presentaciones cuenta con las indicaciones para administrar el medicamento al animal al que va dirigido (ganado, perros, gatos y aves) con las dosis y tiempos pero para aquellos animales para los que no va dirigido se han hecho experimentos que permitieron deducir la concentración y la dosis necesaria. Un ejemplo de lo anterior es el uso de este medicamento en reptiles, donde la dosis que se recomienda administrar de enrofloxacin va de 5 a 10 mg/kg de peso del ejemplar a menos que se indique otra, con intervalos de tiempo desde 12 horas hasta 120 horas dependiendo del ejemplar que se esté tratando (Gobel, 2002). La información anterior hace referencia a tortugas de origen terrestre, pero de manera común se recomienda administrar de 5 a 10 mg/kg de peso pero cada 24 o 48 horas tomando en cuenta mucho el peso de ejemplar incluyendo el caparazón (Pérez, et al., 2005).

Pese a que se conocen en teoría las concentraciones que se debe administrar en tortugas para el tratamiento de la neumonía, esto es un panorama

incierto ya que no se garantiza que el tratamiento sea efectivo y que no resulte contra productivo pues puede ser agresivo para la flora normal de microorganismos presentes en las tortugas y causar otro tipo de problemas, sobre todo cuando se tratan de tortugas de tamaños de caparazón menores a 5 cm y cuyo peso son escasamente algunos gramos.

Lo anterior, la falta de información y de estudios de cada una de las 260 especies de tortugas y junto con lo relacionado a la dificultad de encontrar personas expertas en este tipo de animales y que determinen la terapia más efectiva para tratar a los ejemplares las personas han desarrollado alternativas que ayudan a las tortugas a luchar contra la enfermedad.

Estas otras alternativas que se pueden acompañar con el tratamiento con antibiótico aplicado por vía intramuscular son principalmente cuestiones de la nebulización con medicamentos y algunas plantas. Esta última se considera un tratamiento homeopático o naturista. Se utiliza en caso de no tener acceso a la terapia con antibióticos.

1.3.2. Terapia por Nebulización

La nebulización es considerada por los expertos como una técnica de tratamiento alopático debido a que sobre esta se puede presentar la administración de algunos fármacos disueltos o inmersos en suero fisiológico (vía aérea) como es el caso de la tetramicina, amikacina o gentamicina pero desafortunadamente por falta de y de experiencia del uso de esta técnica en reptiles que nos den seguridad de que este proceso sea efectivo (Martinez & Soler , 2008) algunos criadores, a base de experimentaciones y de técnicas naturistas han logrado proveer mecanismos que aporten la lucha del animal contra la enfermedad.

Esta técnica naturista de nebulización en tortugas consiste en generar partículas de pequeño tamaño de distintos materiales que nos ayuden a tener un efecto mucolítico al pasar estas por las vías respiratorias para así poder retirar

materiales contaminantes mucolíticos (como flemas y moco) del ejemplar afectado (Martinez & Soler , 2008).

Estos materiales son principalmente vapor de agua y plantas medicinales con dicho efecto siendo principalmente utilizados los vapores del té de la manzanilla o *Matricaria Chamomilla* (Figura 11).



Figura 11.- *Matricaria chamomilla* o manzanilla utilizada para la nebulización de una tortuga

Esta última forma de tratamiento es prometedora y es la única opción que tienen aquellas personas que poseen una tortuga enferma y no pueden tener acceso al tratamiento con antibióticos.

Por ello aunque la manzanilla es una buena opción para proporcionarle una ayuda adicional a la tortuga para luchar contra la enfermedad este trabajo pretende buscar nuevas alternativas de plantas de uso medicinal que tengan un efecto inhibitorio contra *Pseudomonas sp* (agente acusante de la neumonía) y que aporte a diferencia de esta planta una ayuda directa en la lucha contra la neumonía inhibiendo o ayudando a disminuir la población de *Pseudomonas sp* que causan la infección.

2.- Antecedentes

La medicina naturista es una práctica que viene desde miles de años. El uso de plantas para el área de medicina ha sido muy amplio en muchas partes del mundo y hoy en día existen numerosos estudios que relacionan algunos compuestos de estas con el tratamiento y prevención de enfermedades. Dentro de estos estudios (y que son de nuestro interés) se encuentran los relacionados con los efectos antibióticos que algunas de estas plantas suelen tener frente a algunos microorganismos. A este tipo de estudios se les conoce como estudios de sensibilidad o análisis antimicrobiano que consta de diferentes métodos que exponen al antibiótico frente al microorganismo para ver si este es capaz de inhibirlo o no.

Existen varios métodos para realizar la exposición de los antibióticos a bacterias siendo el análisis por difusión en agar el más usado.

2.1. Estudios de sensibilidad por el método de difusión en agar.

Esta técnica es también conocida como antibiograma y consiste en ensayar la sensibilidad de una cepa haciéndola crecer en placas de agar donde se depositan discos de papel impregnados con antibióticos (sensidiscos) o penicilindros que contienen el antibiótico a ensayar (Figura 12), estas cajas se dejan en incubación por un día y posterior a este tiempo se verifica si la bacteria es sensible a estos antibióticos, lo anterior se ve revelado cuando alrededor del disco o penicilindro aparece una zona libre de crecimiento bacteriano conocido como halo de inhibición. Un resultado negativo se observara cuando hay crecimiento incluso en la zona del sensidisco o penicilindro. El resultado es positivo cuando se presenta un halo de inhibición como se observa en la figura 13.



(A)

(B)

Figura 12.- Sensidiscos (A) y penicilindros (B) usados en las pruebas de sensibilidad por difusión. Los sensidiscos están impregnados de antibióticos de interés o pueden ser impregnados del antibiótico de estudio. Los penicilindros son recipientes que contendrán al antibiótico. Fotos tomadas de <http://emarinsda.wix.com> y google imágenes.

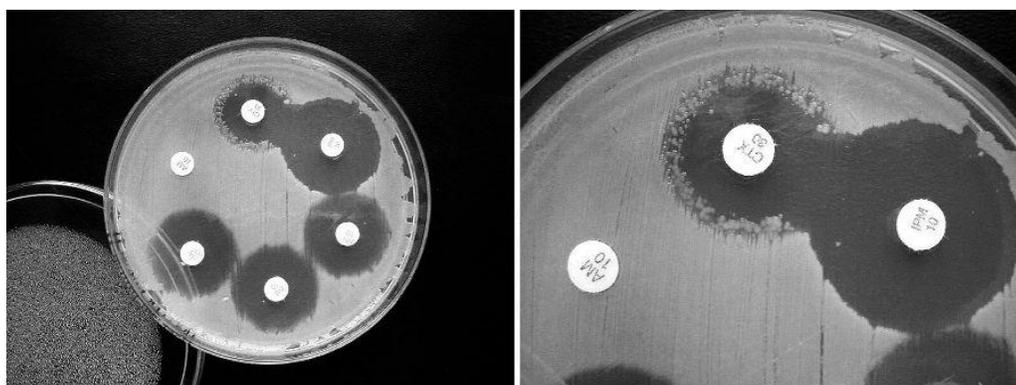


Figura 13.- Resultados posibles de un Antibiograma. Se pueden observar los halos de inhibición alrededor de la mayoría de los sensidiscos. Aquel sensidisco que se muestra del lado izquierdo no presenta acción inhibitoria. Foto tomada de <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar>

Hoy en día el uso del antibiograma no solo se ha aplicado para el área de la medicina alopática en la identificación de la sensibilidad de las bacterias a los

antibióticos que se proveerán en un medicamento sino también para la identificación de nuevos productos con potencial para volverse parte de los tratamientos que se ofrecen contra las infecciones bacterianas.

Estos nuevos productos están basados principalmente en el uso de plantas medicinales que se sospecha pueden ser agentes antibióticos. Para este trabajo se han planeado en base a información y estudios obtenidos recientemente el estudio y uso de plantas que se han utilizado contra neumonía con el fin de identificar si son capaces o no de inhibir a las bacterias causantes de la enfermedad en tortugas como la *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2. Propuesta de extractos de plantas con efecto inhibitorio frente a *Pseudomonas sp*

Planta medicinal es el nombre que recibe aquel material que proviene del reino vegetal solo o en conjunto como lo son hojas, corteza, semillas o flores de plantas y árboles que desde los inicios de la humanidad ha demostrado su capacidad para el tratamiento de algunas afecciones. Este conocimiento que ha traspasado generaciones ha interesado a muchos investigadores que desean descubrir cuál es aquella o aquellas sustancias que brindan el efecto terapéutico para cierta enfermedad que ya ha sido descrito con anterioridad.

Este trabajo no es la excepción y pretende estudiar si las plantas medicinales que se usan en el tratamiento de la neumonía en humanos propuestas son capaces de inhibir *Pseudomonas aeruginosa* un patógeno importante en las enfermedades respiratorias presentes en tortugas y cuyo tratamiento con antibióticos no es siempre efectivo y accesible. En caso de no tener efecto inhibitorio contra *Pseudomonas* poder proponer su aporte al tratamiento de la afección como mucolítico (ayuda a disolver el moco) o expectorante (ayuda a expulsar el moco en forma de flemas), por mencionar ejemplos. Las plantas propuestas son las siguientes:

Tabla 1.- Plantas medicinales propuestas para estudiar el posible efecto inhibitorio de estas en *Pseudomonas sp.*

Planta o árbol Nombre científico. Familia. Imagen	Descripción	Usos y propiedades	Observaciones
<p data-bbox="289 451 520 521">Nombre común : Clavo</p> <p data-bbox="247 565 562 634">Nombre científico: <i>Syzygium Aromaticum</i></p> <p data-bbox="331 678 478 743">Familia <i>Mirtaceae</i></p> 	<p data-bbox="617 451 1037 813">Son los botones de las flores del árbol de procedencia, los cuales son retirados y secados al sol o en cámaras de aire caliente hasta que estos hayan perdido dos tercios de su peso original y hayan obtenido su color característico marrón oscuro (Celis, 2010).</p> <p data-bbox="617 857 1037 1138">Este recibió su nombre debido a la forma que simula igual a la de un clavo (del latín <i>clavus</i>) o de una forma de cáliz cuando las hojas de la flor se encuentran plegadas, justo antes de florecer.</p>	<p data-bbox="1079 451 1436 889">Es una especia muy aromática y que acompaña por su sabor picante ácido y amargo muy bien a diversos platillos. Se ha descubierto que tiene propiedades antisépticas, cicatrizantes, analgésicas y estimulantes del apetito y la digestión (Celis, 2010).</p>	<p data-bbox="1478 451 1835 889">Se ha reportado que es rico en aceites esenciales y estudios recientes han demostrado que tras combinarlo con los aceites esenciales de la canela tiene una inhibición del crecimiento de bacterias gram negativas como la <i>Pseudomona aeruginosa</i>(Aglauglu, et al., 2007).</p>

<p>Nombre común: Cuachalalate</p> <p>Nombre científico <i>Amphipterygium adstringens</i></p> <p>Familia <i>Anacardiáceas</i></p> 	<p>Corteza obtenida del árbol del mismo nombre que proviene del náhuatl “Cuauchachalatl” que significa árbol de la chachalaca. Esta corteza es dura y gruesa, de apariencia lisa con algunas protuberancias</p> <p>Si no se realiza de manera adecuada la extracción de la corteza del árbol este muere por no poder regenerar la misma (Martínez, 2013).</p>	<p>Su principal uso es para el tratamiento de la gastritis pues ha demostrado tener actividad contra la bacteria <i>Helicobacter pylori</i> la cual es la principal causa de la gastritis crónica, así como también de úlceras pépticas.</p> <p>También se le han encontrado más de 30 usos medicinales como agente antitumoral, hipocolesterolemiante, malaria, fiebres intermitentes, astringentes, desinflamatorio, colitis, antibacteriano, varices, entre otros (Martínez, 2013)</p>	<p>Estudios recientes han demostrado que el extracto hexánico del Cuachalalate tiene efecto inhibitorio contra <i>Pseudomona aeruginosa</i> (Muñoz, 2013)</p>
--	---	---	---

<p>Nombre común Noni</p> <p>Nombre científico <i>Morinda citrifolia</i></p> <p>Familia De las <i>Rubiáceas</i></p> 	<p>Fruto de forma irregular, ovoide y grande de pulpa transparente, gelatinosa y de olor desagradable y característico cuyas semillas se encuentran en dicha pulpa y son pequeñas y lustrosas de color café oscuro (Rojas, 2007). Proviene de un árbol pequeño de hasta 4 metros de altura, muy ramificado con corteza lisa, delgada y verdosa, presenta hojas opuestas, grandes y lustrosas en tonos amarillentos al madurar, las flores se presentan en grupos y son de color blanco (Rojas, 2007).</p>	<p>Se han reportado muchos usos para el fruto, hojas, flores, semillas y raíz. Se encuentra hoy en día en muchos productos naturistas para el tratamiento de diferentes padecimientos como las alergias, artritis, asma, cataratas, diabetes, dolores de cabeza, colitis, estrés, úlceras gástricas, varices, problemas cardiacos, presión, entre otros. Tiene uso antibiótico, regenerativo, antihistamínico, fortalecedor de huesos y sistema digestivo, antibiótico entre otros (Rojas, 2007).</p>	<p>En artículos se ha reportado que algunos compuestos provenientes del fruto y la raíz han demostrado tener efecto en cepas de <i>Pseudomona aeruginosa</i> y otras bacterias como <i>Proteus morganii</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Escherichia coli</i> y <i>Helicobacter pylori</i> (Torres & Toranzo Reyes , 2004).</p>
--	---	---	--

<p>Nombre común Gordolobo</p> <p>Nombre científico <i>Gnaphalium viscosum</i></p> <p>Familia <i>Scrophulariaceae</i></p> 	<p>La planta de gordolobo es una milpa con numerosas especies debido a que se encuentra en diferentes tipos de suelos.</p> <p>Es ramificada, aromática, lanosa o glandulosa, de unos 30 a 80 cm de altura; tallos grisáceos sedosos, lanosos; las hojas alternas, largas y angostas; flores de color amarillo y brillante se agrupan en cabezuelas.</p>	<p>Sirve para aliviar el dolor de estómago y erupciones de la piel, para curar tos resfriados, gripas, bronquitis, congestiones pulmonares, ronqueras, gargantas irritadas, problemas respiratorios y cólicos estomacales e intestinales (Gioanetto, et al., 2010)</p>	<p>-----</p>
<p>Nombre común Ulmaria</p> <p>Nombre científico <i>Filipéndula ulmaria</i></p> <p>Familia <u>De las Rosáceas</u></p> 	<p>Planta con tallos de 1 a 2 metros de altura con hojas de color verde oscuro en el lado superior y blanquecino y suave por debajo. Tiene flores de color blanco crema y estas están agrupadas en racimos. Estas tienen un fuerte olor dulce (Boziaris, et al., 2009).</p>	<p>Por su sabor dulce se utilizan las flores como saborizante en algunos alimentos. En medicina es utilizada para el tratamiento contra el ardo del estómago y la hiperacidez. También para dolores en las articulaciones, diarrea en los niños y específicamente para la profilaxis y el tratamiento de úlceras pépticas.</p>	<p>Se ha reportado que los extractos de las flores de esta planta tienen inhibición frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> (Hintz, 1983)</p>

<p>Nombre común: Pulmonaria</p> <p>Nombre científico: <i>Lobaria Pulmonaria</i></p> <p>Familia De las <i>Estictáceas</i></p> 	<p>Es un liquen foliáceo que se extiende por el suelo, en general al pie de los árboles o en el tronco, formando láminas. Forma grandes hojas lobuladas, que en tiempo húmedo son blanquecinas y en el tiempo seco se vuelven marrón.</p> <p>En la cara superior forma alvéolos grandes que van decreciendo hacia la periferia. La cara inferior es de color muy oscuro.</p>	<p>Tiene sabor amargo astringente debido al ácido estictínico lo que hace útil en medicina y también sustancias colorantes usadas en la preparación de solución de tornasol.</p> <p>Se utiliza para el tratamiento de la tos y el catarro por su efecto expectorante y mucolítico (Lerchundi, 2006).</p>	<p>-----</p>
<p>Nombre común Ajo</p> <p>Nombre científico <i>Allium sativum</i></p> <p>Familia <i>Liliáceas</i></p> 	<p>Es un bulbo característico por sus múltiples partes conocidas como dientes, de olor característico muy fuerte y de sabor desagradable.</p>	<p>Es un ingrediente habitual en la cocina pero también se le han atribuido propiedades antisépticas, antimicrobianas, antipiréticas y analgésicas así como traer beneficios sobre la longevidad, el vigor y la fuerza física (Navarro , 2007).</p>	<p>Se ha reportado que el extracto etanólico de ajo presenta inhibición frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> (Mercado & Arévalo , 2013)</p>

<p>Nombre común: Manzanilla</p> <p>Nombre científico: <i>Matricaria chamomilla</i></p> <p>Familia De las <i>Compositae</i> o de las compuestas</p> 	<p>Es también conocida como <i>Manzanilla recutita</i> y es una planta que llega a medir 40 cm de altura, anual, ramificada, de olor característico y muy aromática, de tallo recto. Es característica por su flor que consta de un centro color amarillo y pétalos rodeándola de color blanco.</p>	<p>Tiene efectos inflamatorios, antiespasmódicos, coleréticos así como sedantes y relajantes, además de antisépticos por su contenido en aceites esenciales, flavonoides y otros principios activos.</p> <p>También es anticatarral, tratamiento para infecciones oculares, ayuda contra el mal aliento, entre otros (Morales & Pardo de Santayana, 2006).</p>	<p>-----</p>
<p>Nombre común: Hojas de olivo</p> <p>Nombre científico: <i>Olea europea leaf</i></p> <p>Familia <i>Oleaceae</i></p> 	<p>Estas hojas provienen del árbol del olivo o aceitunas y son de un tamaño de entre 3 y 4 cm. Son de color verde y en la cara inferior son de un tono más claro. Están conectadas por pequeñas ramas a la rama central que conecta con el tronco del árbol.</p>	<p>Efecto antioxidante, actividad anti esclerótica, antimicrobiana, inductora de apoptosis por efecto de la presencia de hidroxitirosol (De la Fuente , et al., 2004)</p>	<p>Se ha demostrado que el hidroxitirosol se presenta como un buen candidato para ser empleado como agente antimicrobiano contra bacterias patógenas como <i>Haemophilus influenzae</i>, <i>Salmonella sp</i>, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Staphilococcus aureus</i> en seres humanos (De la Fuente , et al., 2004)</p>

A su vez, en este trabajo se pretende implementar el uso de una nueva tecnología para verificar si esta es viable o no para utilizarla como tratamiento contra la neumonía. Esta tecnología es la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) funcionalizadas con algunos metabolitos secundarios de plantas ya antes mencionadas en la Tabla.

2.3. Uso de nanopartículas de oro (AuNPs) biosintetizadas con extractos naturales

El oro es un metal noble que desde la antigüedad se ha utilizado en el campo de la medicina para el tratamiento de algunas afecciones. Un claro ejemplo de esto fue la implementación de la terapia en base al efecto bacteriostático del cianuro de oro frente al bacilo generador de la tuberculosis descubierta por Robert Koch en 1920(Higby, 1982), quedando así marcado el uso del oro en medicina.

En particular el oro coloidal, ha demostrado su elevada estabilidad química y que por ello se espera que presente una baja toxicidad y elevada biocompatibilidad. Lo anterior está de acuerdo a lo dicho por Connor y sus colaboradores, de que las nanopartículas son inertes y no tóxicas (Connor , et al., 2005) pero numerosos estudios realizados en los últimos años han creado una clara controversia en cuanto a si estas presentan toxicidad o no adjudicando lo anterior a los diferentes tamaños y formas de las AuNPS investigadas (Figuras 14 y 15) así como a los distintos agentes empleados para su funcionalización, los cuales son los encargados de darles características superficiales distintas (Al-Qadi & Remuñán López, 2009).

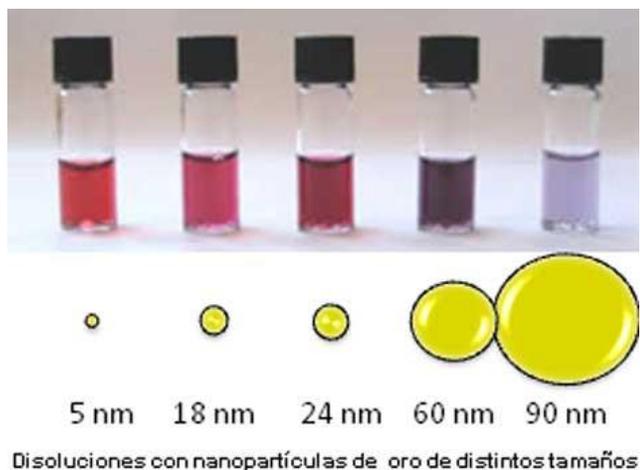


Figura 14.- Diferentes tamaños de nanopartículas y su característico color conforme a esta propiedad.

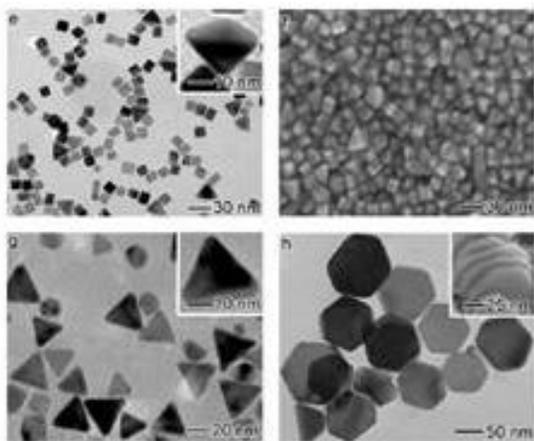


Figura 15.- Diferentes formas de las nanopartículas sintetizadas.

Estos agentes de funcionalización son una amplia gama de ligandos y campos de estudios dentro de los cuales podemos encontrar anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico; material genético y fármacos (Upadhyayula, 2012), que hoy en día tienen múltiples aplicaciones destacando la de su uso en la detección temprana, diagnóstico y combate contra el cáncer por sus excelentes aplicaciones en fototerapia térmica y vectorización selectiva del cáncer así como a su utilización en el desarrollo de sistemas de liberación específica de fármacos (Al-Qadi & Remuñán López, 2009).

Por ello se recomienda obtener información adicional a la toxicidad in-vivo del uso de las nanopartículas que se están obteniendo por la vía de síntesis que se está trabajando. La primera síntesis que se obtuvo de las nanopartículas de oro (AuNPs) u oro coloidal fue realizada por Faraday en 1857 por reducción del cloruro de oro con fosforo y obteniendo un color rojizo de la solución. Más adelante se dedujo que el color entre tonos rojizos y morados es característico del tamaño de las nanopartículas que se están obteniendo de la síntesis, lo que a su vez trajo la búsqueda de nuevos métodos de obtención de las AUNPS.

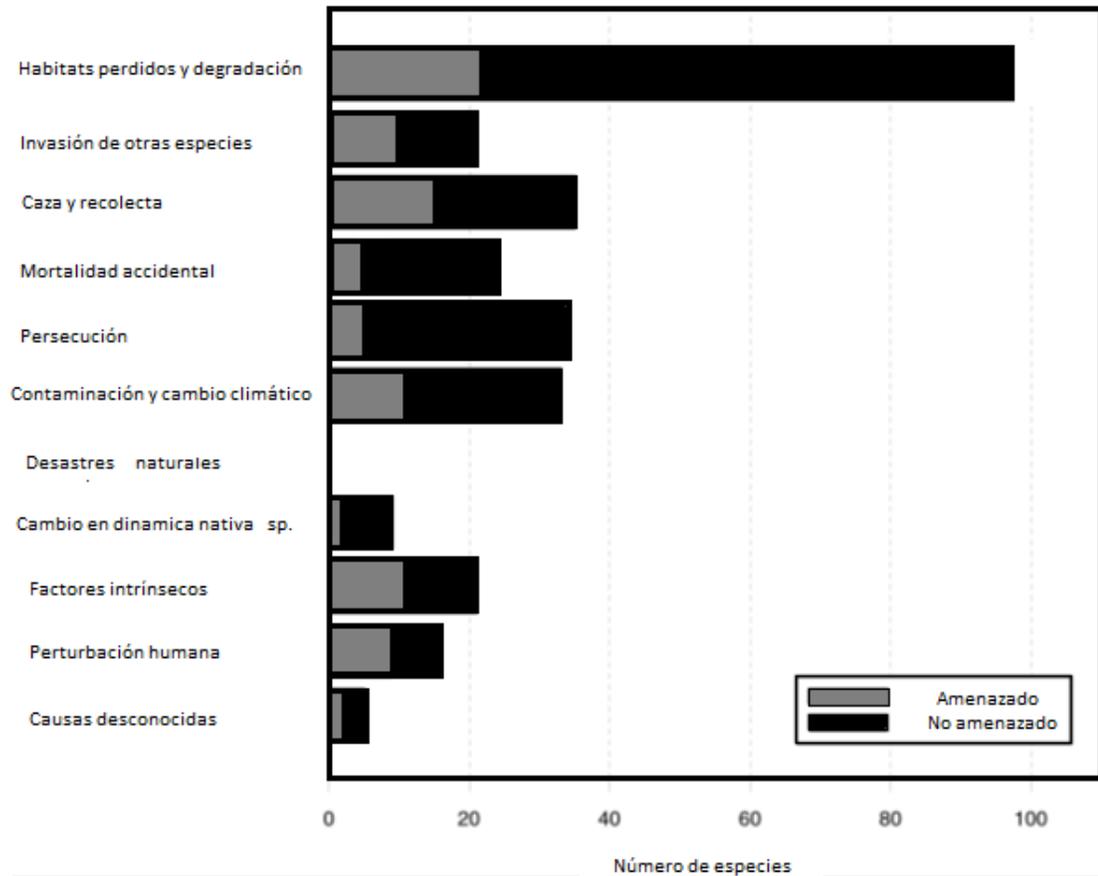
El método estándar más utilizado para la síntesis de las nanopartículas de oro (AuNPs) se logra principalmente por vía química con la técnica de Turkevich que diseñó este en 1951 (Turkevich, et al., 1951). En esta se logran tamaños de partícula de 2 a 200 nm de diámetro, estables y de forma redonda por efecto de la reducción de cloruro de oro bajo condiciones de pH controlado (Chavez-Sandoval, et al., 2013), ya que el pH es el principal factor para obtener nanopartículas de tamaño y forma estable así como también de agentes estabilizantes (evitan la aglomeración de las nanopartículas) y utilizando como agente reductor al citrato de sodio, pero no ha quedado allí la manera de sintetizarlas ya que tras el aumento de la demanda de estudio de este campo en los últimos 15 años se han desarrollado otros procedimientos de síntesis y que algunas de ellas aplican tecnologías amigables con el medio ambiente y sustentables para obtener AuNPs.

Uno de esos métodos sustentables es la síntesis biológica de nanopartículas de oro en base a la reducción de sal de oro con ayuda de extractos acuosos de plantas que funcionan como agente reductor formando así nanopartículas estables y de diferentes tamaños (Chavez-Sandoval, et al., 2013). El proceso es económico y noble con el ambiente y trae la ventaja de funcionalizar de manera coordinada con la síntesis las nanopartículas con algunos metabolitos secundarios propios de las plantas propuestas para realizar a la par el análisis antimicrobiano frente a *Pseudomonas sp* sospechosas de la generación de neumonía en tortugas.

3.- Justificación

Los reptiles son un grupo muy amplio de animales que va desde iguanas, camaleones, cocodrilos, pasando por serpientes y llegando hasta tortugas. Este último grupo de reptiles es uno de los más comercializados, especialmente las tortugas de origen acuático y terrestre. Esta amplia comercialización se debe a que son animales inofensivos y que llaman la atención de los niños pues su caparazón las hace únicas entre los animales superiores. De hecho por este motivo rara vez los padres tienen razones en contra para que los niños jueguen con tortugas y tengan estos animales como mascota (Dampier).

Estas características que las hacen interesantes a su vez son su principal enemigo junto a su lentitud característica al caminar ya que en algunas partes del mundo han sido cazadas para servir de alimento, de adorno y de mascotas cuando son sustraídas de manera ilegal de su hábitat natural. También la reproducción de algunos ejemplares es inconsciente y en masa para fines de lucro, especialmente en el mercado de mascotas. Lo anterior aunado a la destrucción de sus hábitats ha puesto en peligro de extinción a la tortuga. Esto está reportado en un estudio realizado por la *Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza* (UICN) en el 2008 en Europa. Dicho estudio hace referencia a las principales causas de pérdida de reptiles en este continente y a cuantas de estas se encuentran amenazadas y no amenazadas. Esto se resume en la Grafica 1. En esta grafica la pérdida, la fragmentación y la degradación de hábitats son la principal amenaza para los reptiles, seguida de la caza y colecta deliberada, la contaminación (se incluye el cambio climático global) y factores intrínsecos.



Grafica 1.- Principales causas y número de especies de reptiles en Europa que se encuentran amenazadas.

Dentro de los factores intrínsecos podemos incluir la pérdida de los reptiles, o en este caso de tortugas, por la aparición de enfermedades como neumonía, edema de ojos, mala dieta, daño en piel y caparazón presentes principalmente en ejemplares que se encuentran en cautiverio. Esta es la principal causa de porque las tortugas que se encuentran en cautiverio no alcanzan a vivir entre 20 y 30 años, algunas hasta los 40 (Cardells, 2012), Estas enfermedades en la mayoría de los casos se presentan por la ignorancia persistente de sus dueños en base a sus cuidados y a la falta de tratamientos accesibles y específicos para estos animales.

Recordemos que estos tratamientos están basados en el uso de medicamentos veterinarios como la Enrofloxacin producida por Bayer para el tratamiento de algunas infecciones. Esta tiene su principal desventaja en su diseño puesto que la concentración del principio activo en el medicamento está dirigido a otro tipo de especies diferentes a los reptiles como lo son animales domésticos y de importancia alimenticia como el ganado vacuno, porcino, ovino, las aves, perros y gatos.

Bayer lanzo al mercado diferentes presentaciones con diferentes concentraciones de principio activo (enrofloxacin) Estas presentaciones se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2.- Presentaciones de Baytril encontradas en el mercado.

Nombre	Dosis	Vía de administración	Especie a la que va dirigido
Baytril Max	7.5mg/kg en peso. Dosis única	Vía subcutánea	Bovinos, Porcinos y Ovinos
Baytril 10%	50 mL por cada 100 litros de agua. Dosis de 3-5 días	Vía oral en el agua del animal	Avícola
Baytril 5% (pequeños)	5 mg/kg de peso Dosis de 5-10 días	Vía subcutánea o intramuscular	Caninos y Felinos
Baytril tabletas	50mg por tableta una tableta por 10 kg de peso	Vía oral	Caninos Felinos

De las presentaciones anteriores, la que se conoce que se utiliza para el tratamiento de la neumonía en tortugas es la de Baytril 5% (pequeños), dirigido a perros y gatos considerados especies domésticas pequeñas. Esto por el tipo de presentación farmacéutica que puede ser administrada por vía intramuscular y de esta se puede obtener la dosis deseada y/o requerida para el tratamiento de neumonía en reptiles como tortugas, pero no se asegura que siempre funcione ya que el metabolismo de las tortugas es muy variado y depende mucho de las condiciones ambientales bajo las que se encuentre.

Pero no todo es desalentador ya que entre las personas que se encuentran interesadas en este tipo de reptiles tras la carencia de medicamentos disponibles para el tratamiento de las afecciones de sus ejemplares estos se han visto en la necesidad de desarrollado a través de la prueba y error tratamientos que apoyen a la tortuga al combate de la neumonía basándose algunos de estos en la medicina antigua proveniente del ámbito naturista combinada con técnicas, modernas y sustentables.

Al hablar de esta necesidad, en este trabajo se ha propuesto el análisis antimicrobiano de algunas cepas aisladas de *Pseudomonas sp.* en tortugas con extractos de plantas utilizadas para el tratamiento de la neumonía generada por esta bacteria patógena. A este análisis antimicrobiano se le incluye exponer a la bacteria a la presencia de nanopartículas de oro funcionalizadas (con base en la biosíntesis) con estos mismos extractos y comprobar si tienen efecto inhibitorio

Esto a su vez traería muchas ventajas para el cuidado, resguardo y salvamento de las tortugas pues habría disponibilidad de los materiales ya que en su mayoría son hierbas que se consiguen en muchos lugares y los tratamientos llegarían a tiempo de salvar la vida del ejemplar.

4.- Objetivos

4.1. General

Aislar y estudiar la sensibilidad que pueda presentar *Pseudomona sp* productora de neumonía en tortugas de la Familia Trachemys y Graptemys con extractos de plantas y técnicas nanotecnológicas.

4.2. Particulares

- Obtener muestras orales de tortugas sanas y enfermas de neumonía, para el aislamiento de *Pseudomonas sp* e identificar la cepa por medio de técnicas microbiológicas y bioquímicas.
- Obtener los extractos naturales de las plantas propuestas para poder estudiar un posible efecto inhibitorio contra *Pseudomonas sp*.
- Sintetizar nanopartículas de oro (AuNPs) por la técnica de Turkevich modificada y Rico Moctezuma con extractos de plantas naturales.
- Caracterizar AuNPs por medio del Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) y Espectroscopia de UV-Vis
- Realizar pruebas de sensibilidad de *Pseudomonas sp* contra los extractos obtenidos de las plantas y las AuNPs.
- Comparar los efectos inhibitorios de las plantas naturales contra el antibiótico más común utilizado para el tratamiento de la enfermedad.

5.- Metodología

5.1. Toma de muestra, aislamiento e Identificación de *Pseudomonas sp*

La toma de muestra bucal de tortugas se realizó con un hisopo impregnado con caldo nutritivo y se colocó dentro de la boca de la tortuga. Después el hisopo fue colocado en un tubo con caldo nutritivo y de este se sembraron cajas de Agar selectivo de *Pseudomonas* (Agar Cetrimida o Agar *Pseudomonas*) y Agar Soya tripticasa (TSA). De estas cajas se eligieron las colonias sospechosas de *Pseudomonas sp* por su descripción morfológica y se les realizaron pruebas bioquímicas conforme lo reportado en la NOM 089-SSA1-1994, Bienes y servicios. Métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza y algunos libros de microbiología. Estas pruebas se reportan en la siguiente tabla extraída de la norma antes mencionada.

Tabla 3.- Pruebas bioquímicas para *Pseudomona sp* según lo reportado en la NOM 089

Pruebas bioquímicas	Resultado
H ₂ S (formación)	-
Movilidad	+
Indol	-
Urea	d
Lisina descarboxilasa	-
Lactosa	-
VP	d
Citrato de Simmons	+
Manitol	d
Glucosa (gas)	d
Sorbitol	-
Inositol	-
OF/F	-
OF/O	+

+= Positivo
 -= Negativo
 d= Variable

Una vez obtenidas las colonias sospechosas de *Pseudomonas sp* estas fueron colocadas en tubos de TSA para su mantenimiento y conservación.

5.2. Obtención de los extractos naturales

Del material de origen vegetal que se eligió para el estudio del análisis antimicrobiano se obtuvieron extractos acuosos. Se pesaron de entre 3 y 5 gramos del material y se puso a hervir en 10 mL de agua una primera vez. El extracto resultante se volvió a hervir junto con otros 10 mL de agua y de entre 3 y 5 gramos de planta de nuevo para favorecer a la concentración. Estos fueron preparados el mismo día en que se realizaron las pruebas de sensibilidad microbiana para evitar interferencias en el resultado por efectos de la oxidación y transformación de los metabolitos secundarios presentes en dichos extractos.

A excepción de lo anterior el extracto de ajo se realizó en crudo colocando entre 1-3 gramos de ajo en 10 mL de agua y se macero con ayuda de un mortero con pistilo. Eso se debió a que el extracto de ajo crudo es más rico en metabolitos secundarios a diferencia del extracto hervido porque al momento de presentarse la maceración y el rompimiento celular se libera una gran cantidad de compuestos presentes dentro de las células vegetales del ajo.

5.3. Biosíntesis de AuNPs

La biosíntesis de las AuNPs se realizó con la técnica de Turkevich modificada. Se usó material de vidrio que se lavó con agua regia (dejando este reposar toda una noche antes de la biosíntesis) y lavando con agua destilada 3 veces para así retirar cualquier traza de sales y restos de agua regia, principalmente porque puede afectar al proceso de síntesis. Una vez terminado el anterior proceso se tomó del material un matraz Erlenmeyer de 250 mL, al cual se le agregaron 500 μ L de una solución de tetracloroaurato de hidrogeno (HAuCl_4) al 1% (o concentración de 25 mM) en 50 mL de agua destilada estéril, la cual se sometió a calentamiento y a agitación con ayuda de un agitador magnético (que también fue tratado con agua regia) así como tapado con un vidrio de reloj. Se esperó hasta que la solución llego al punto de ebullición para posteriormente colocar de manera rápida 1.25 mL del extracto del que se desea sintetizar las AuNPs, el cual funciona dentro

de la reacción como agente reductor. Una vez agregado el extracto se dejó la solución en calentamiento y agitación todavía por otros 15 minutos. Finalmente se dejó enfriar la solución a temperatura ambiente con ayuda de agitación y se procedió a envasar en frascos estériles para después guardarse a 4°C para su conservación y uso en las pruebas de determinación de tamaño y forma por Espectroscopia UV-Vis y Microscopia Electrónica de Transmisión así como la utilización en las pruebas de sensibilidad.

5.4. Análisis antimicrobiano (Pruebas de sensibilidad)

El análisis antimicrobiano se realizó en base a pruebas de sensibilidad por la técnica de difusión en agar o gel. Primeramente se cultivaron suspensiones bacteriana de 18 a 20 horas de crecimiento de las bacterias problema en tubos de caldo nutritivo, después se colocaron en tubos de solución salina gotas de suspensión bacteriana y con ayuda del ajuste de turbidez con el nefelómetro número 2 ajustamos a la turbidez, de esta forma se obtiene una densidad microbiana aproximada de 600 células por mL. De esta suspensión bacteriana se impregno un hisopo y se sembró por estría masiva en toda la caja Petri que tiene como medio TSA.

Una vez sembrada la caja Petri se procedió a colocar según fue requerido en la prueba círculos de 0.5 centímetros de diámetro de papel filtro impregnados con el extracto correspondiente y las AuNPs, también se utilizaron penicilindros con 0.2 mililitros de cada uno de los extractos y AuNPs para evidenciar el efecto inhibitorio. Los cultivos se incubaron a 37°C por 24 horas, pasado este tiempo se registraron resultados midiendo el diámetro de los halos de inhibición obtenidos.

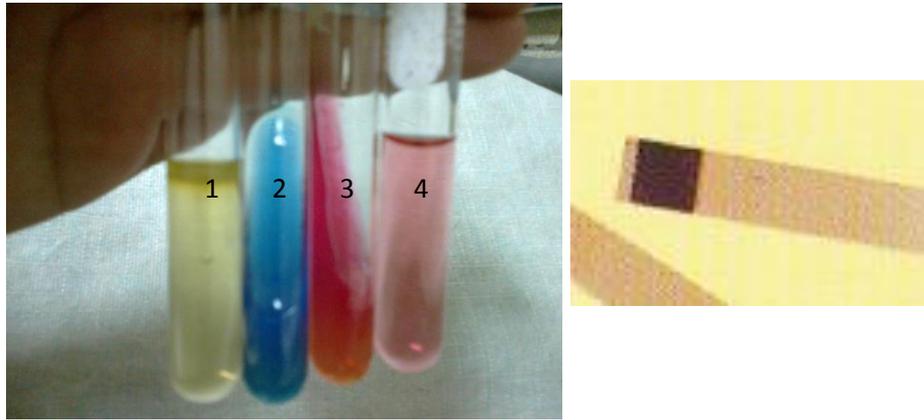
6.- Resultados

6.1. Aislamiento e identificación de *Pseudomonas sp* en Tortugas.

De las muestras bucales obtenidas de tortugas sanas y enfermas, siendo en total 19 tortugas de la Familia Trachemys y 1 de la Familia Graptemys, se lograron aislar cinco cepas de *Pseudomonas sp*, las cuales se identificaron con ayuda de siete pruebas bioquímicas (Figura 16) en base a lo reportado en la NOM 089. La sexta cepa reportada en el trabajo corresponde a una cepa caracterizada y comprobada que es *Pseudomonas sp* obtenida de laboratorio con el fin de tener un punto de comparación. La descripción de la procedencia de las cepas obtenidas de *Pseudomonas sp* se presenta en la siguiente tabla.

Tabla 4.- Origen de las cepas obtenidas de *Pseudomonas sp* aisladas de tortugas

Numero de cepa	Familia y nombre de la tortuga de la que fue aislada	Estado de salud del ejemplar
1	Graptemys Pseudogreographica	Tortuga sana
2	Trachemys scripta venusta	Tortuga con antecedentes de neumonía
3	Trachemys scripta elegans	Tortuga sana
4	Trachemys scripta elegans	Tortuga con problemas evidentes de neumonía
5	Trachemys scripta elegans	Tortuga sana
6	-	Cepa de laboratorio



(A)

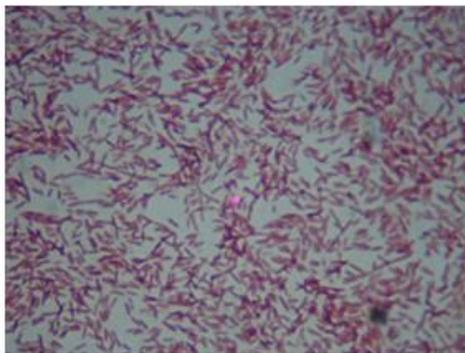
(B)

Figura 16.- Pruebas bioquímicas realizadas a colonias sospechosas de ser *Pseudomonas* obtenidas de muestras bucales de tortugas.

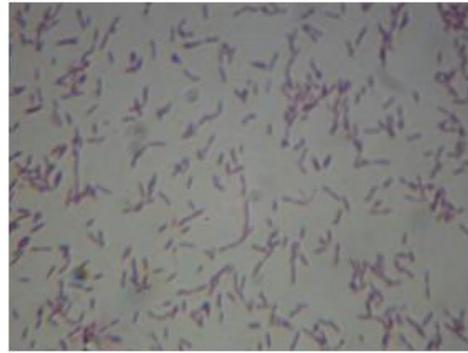
1 A) Prueba de Movilidad en medio SIM donde se puede apreciar poco la difusión de la bacteria. La parte superior del Tubo de movilidad corresponde a la Prueba del indol con el reactivo de Kovacs donde claramente se nota un anillo de color amarillo intenso, dando a conocer que la prueba es negativa.

2 A) Prueba de Citrato de Simmons positiva. 3 A) Prueba de TSI o Fermentación de Azucres presentando fermentación alcalina aunque la prueba es variable. 4 A) Prueba de Caldo Urea negativo. B) Prueba de la oxidasa. Se muestra un color morado en la esquina de la tira reactiva mostrando que la prueba es positiva.

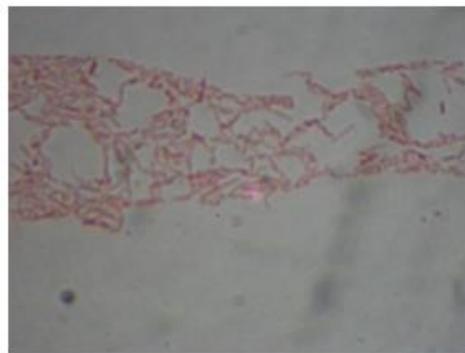
Como parte de la identificación de la *Pseudomonas* se realizaron tinciones de Gram y se observaron a microscopio con un aumento real de 1250 veces como se puede ver la siguiente Figura.



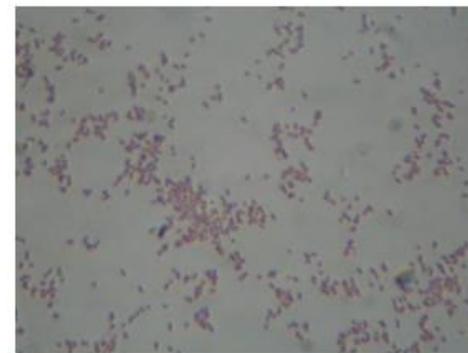
Ceba 1



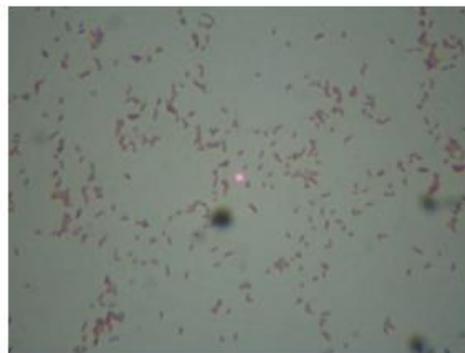
Ceba 2



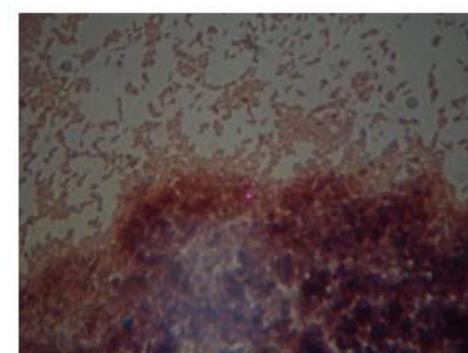
Ceba 3



Ceba 4



Ceba 5



Ceba 6

Figura 17.- Tinciones de Gram realizadas a cada una de las cepas obtenidas de tortugas

6.2. Biosíntesis de AuNPs.

Esta síntesis biológica de AuNPs se realizó con una combinación de las técnicas de Turkevich et al 1951 y Rico-Moctezuma et al 2010 utilizando extractos de *Syzygium aromaticum* (clavo), *Matricaria chamomilla* (Manzanilla), *Morinda citrifolia* (Noni), *Lobaria pulmonaria* (Pulmonaria), *Filipendula ulmaria* (ulmaria), *Adstringens amphipterygium* (Cuachalalate), *Gnaphalium viscosum* (Gordolobo) y *Olea europea* (hojas de olivo) como agentes reductores, las cuales una vez sintetizadas fueron guardadas a una temperatura de 4°C para su conservación (Figura 18) y futura utilización. En dicha síntesis uno de los factores más importantes es el valor del pH del extracto el cual fue reportado en la tabla 5 como futuras referencias.



Figura 18.- Nanopartículas de oro Sintetizadas. A la izquierda se encuentra la solución de nanopartículas sintetizadas y a la derecha el extracto.

Tabla 5.- Valor de pH, parte fundamental en la biosíntesis de nanopartículas

Extracto	pH del extracto
Clavo	4.12
Manzanilla	7.3
Noni	4
Pulmonaria	4.4
Ulmaria	4
Cuachalalate	4
Gordolobo	4.3
Hojas de olivo	4.5

Los extractos de Ulmaria (*Filipendula ulmaria*) y Gordolobo (*Gnaphalium viscosum*) no fueron capaces de sintetizar nanopartículas de oro por lo que la coloración del medio donde estaba reaccionando quedo del mismo color que el extracto como se puede ver en la siguiente figura, esto nos permite notar que no todas las plantas son capaces de formar nanopartículas debido a que muy probablemente no son ricos en los metabolitos secundarios que participan como agentes reductores en la reacción. Esta información puede ayudarnos en un futuro para descartar aquellos metabolitos presentes en estas plantas como agentes reductores y disminuir la gama de posibilidades.

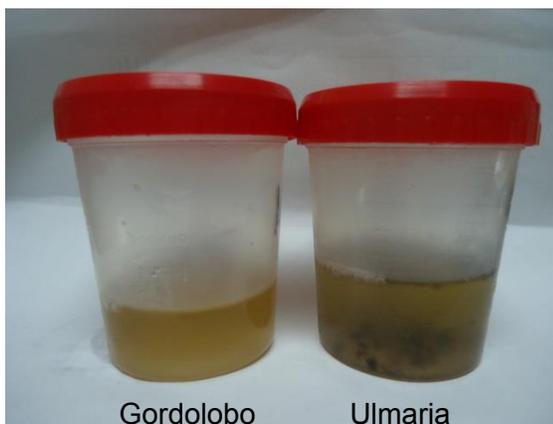


Figura 19.- Color de la reacción de formación de nanopartículas de oro con extracto de Gordolobo y Ulmaria. Se conservaron los colores originales.

6.2.1.- Caracterización por Espectroscopia UV-Vis y por Microscopia Electrónica de Barrido de las AuNPs obtenidas mediante biosíntesis.

Como parte de los trabajos que se requieren hacer cuando se sintetizan nanopartículas de oro es la caracterización de estas, para así conocer la efectividad y viabilidad del uso de los materiales de síntesis y de los resultados obtenidos. Recordemos que es muy importante el tamaño y la forma de la nanopartícula de oro, pues según algunos autores esto es un punto clave para verificar si las AuNPs son tóxicas o no.

Para ello como primer paso se realizaron estudios de Espectroscopia UV-Vis, realizando un barrido de entre 400 y 700 nm para determinar la longitud de onda máxima a donde estos absorbían. Cada valor de longitud de onda nos hace referencia a cierto tamaño y forma de partícula.

Como segundo paso y continuando con la caracterización de las AuNPs se realizaron toma de imágenes con ayuda del Microscopio Electrónico de Transmisión de las muestras de AuNPs para determinar su tamaño de manera más precisa así como su forma. La información correspondiente a la caracterización se resume en la siguiente tabla y figura (la gráfica de las longitudes de onda de las nanopartículas se encuentra en el anexo B):

Tabla 6.- Longitud de onda máximo, diámetro y morfología de las nanopartículas obtenidas.

Extracto	Longitud de onda máxima (λ)	Diámetro (\emptyset)	Morfología
Clavo	550	20	Esféricas y amorfas
Manzanilla	528	20	Esféricas
Noni	546	Menor a 20	Esféricas y Amorfas
Pulmonaria	554	50-100	Amorfas
Ulmaria	-	-	-
Cuachalalate	534	20	Amorfas
Gordolobo	-	-	-
Hojas de olivo	552	100	Triangulares Amorfas y hexagonales

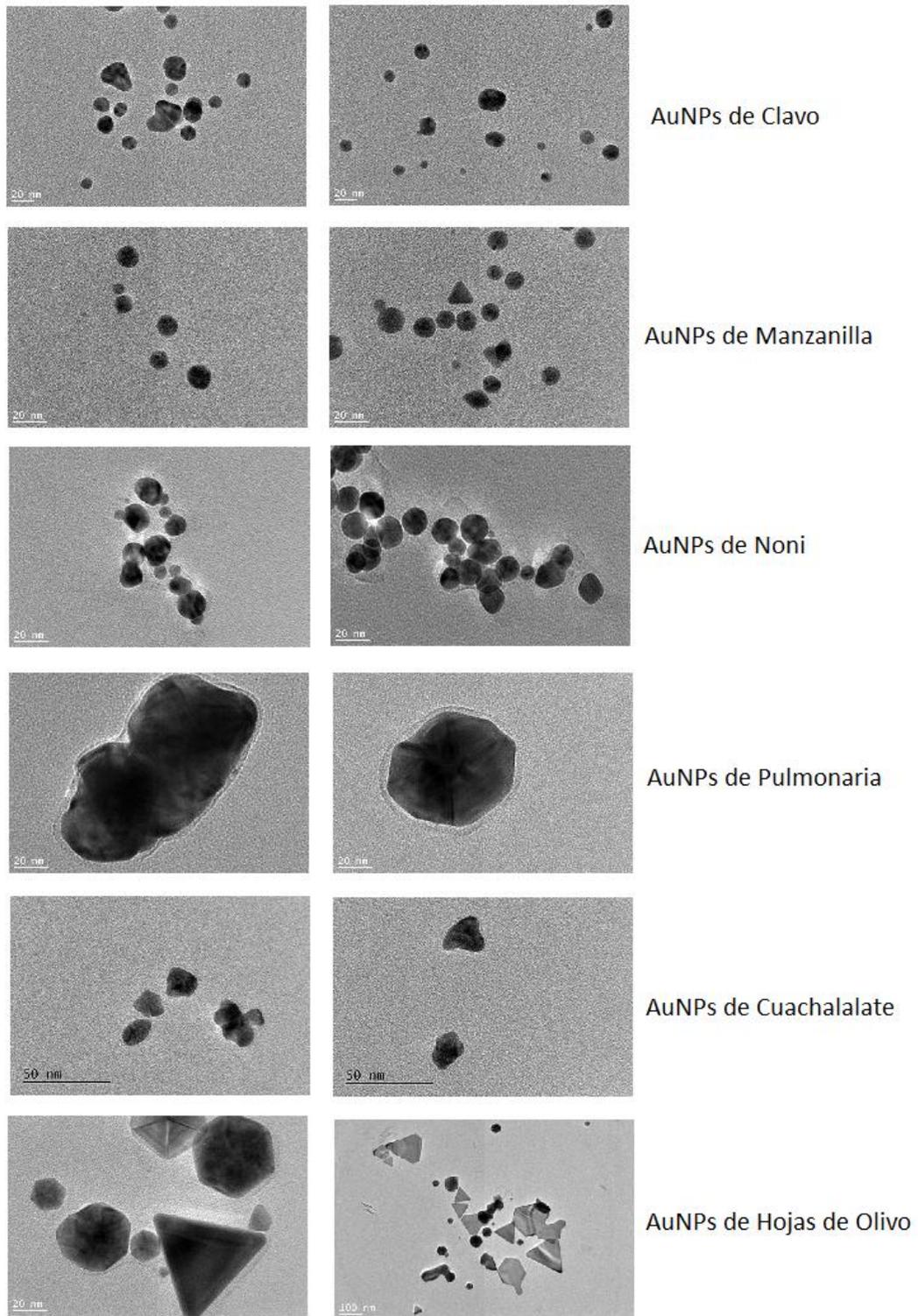


Figura 20.- Fotos obtenidas del TEM de las nanopartículas de oro biosintetizadas.

Este tipo de síntesis de las nanopartículas se cree que quedan funcionalizadas con los metabolitos secundarios de las plantas, es decir con los compuestos químicos presentes en estas, lo que es una ventaja más en este método pues se cree que quedan ya impregnadas del metabolito que puede tener efecto inhibitorio contra *Pseudomonas sp.*

En general podemos decir que en su mayoría estas AuNPs sintetizadas son de pequeño tamaño (20 nm) con forma esférica parecido a lo que se obtiene de la síntesis por vía química con la reducción de sales de oro con citrato y en presencia de agentes estabilizantes que tienen la función de evitar aglomeraciones. Lo anterior nos hace darnos cuenta de que este tipo de síntesis puede ser viable y traer muchas ventajas en cuanto a este tema debido a que como las plantas son ricas en metabolitos secundarios estos no solo a su vez pueden funcionar como agentes reductores si no como agentes estabilizantes.

Estos resultados, a su vez nos permiten conocer cuáles son las plantas capaces de formar nanopartículas con buena dispersión y forma y cuáles no, como es el caso del Noni que pese a tener partículas de buen tamaño, estas son amorfas y muestran aglomeraciones que no son deseadas o las AuNPs de pulmonaria que son partículas de gran tamaño o las AuNPS de las hojas de olivo que son de forma triangular y amorfas.

6.3. Pruebas de sensibilidad de *Pseudomonas* con los extractos de plantas y las AuNPs sintetizadas por biosíntesis.

Las pruebas de sensibilidad se realizaron en dos etapas tanto para los extractos como para las AuNPs. Esto con el fin de determinar si el extracto solo y las nanopartículas de oro funcionalizadas por separado fueron capaces de tener efecto inhibitorio contra las cepas de *Pseudomonas sp* aisladas anteriormente.

- **Primera etapa de análisis antimicrobiano de extractos acuosos**

Esta etapa fue discriminatoria y consistió en verificar de manera cualitativa los extractos que tenían una inhibición frente a *Pseudomonas sp* con ayuda de sensidiscos de papel filtro impregnados con los extractos acuosos de las plantas anteriormente descritas (Figura 21). Los resultados se reportan en la siguiente tabla:

Tabla 7.- Resultados cualitativos de las pruebas de sensibilidad discriminatorias de los extractos de las plantas anteriormente propuestas

Extracto	Resultado de la inhibición
Clavo	+
Manzanilla	-
Cuachalalate	+
Noni	-
Pulmonaria	-
Hojas de olivo	-
Gordolobo	-
Ulmaria	-
Ajo	+
Ruda	-

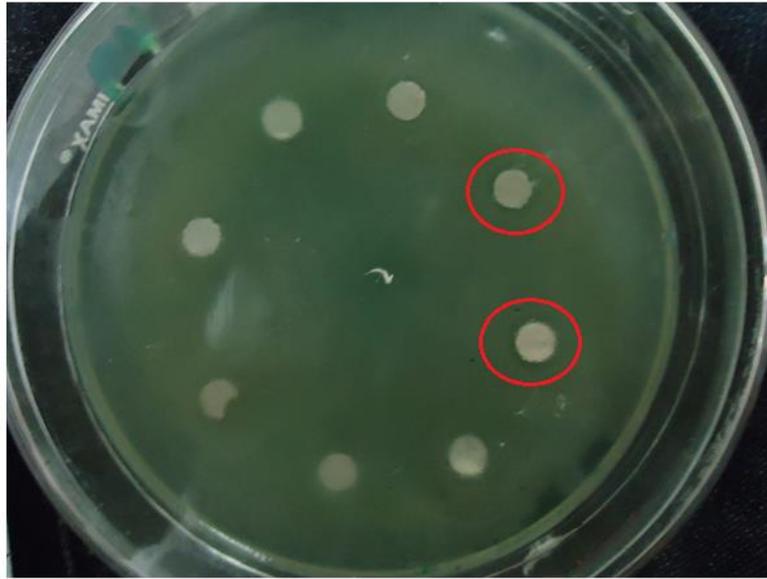


Figura 21.- Primeros antibiogramas con sensibilizadores para discriminar aquellos extractos que no presentan inhibición

- **Segunda etapa de análisis antimicrobiano con extractos acuosos**

Una vez discriminados aquellos extractos con los que las diferentes cepas de *Pseudomonas sp* no presentaron inhibición el siguiente paso consistió en realizar más antibiogramas pero esta vez con un aumento en la cantidad de extracto con ayuda de penicilindros con una capacidad de 0.2 mL como se puede observar en la figura 22.

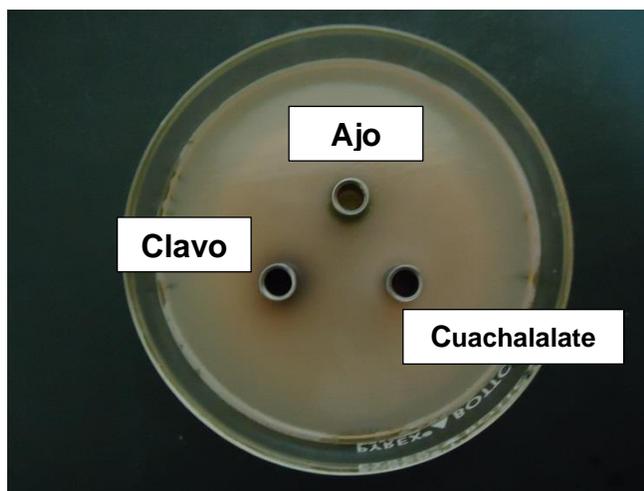


Figura 22.- Segunda serie de antibiogramas con penicilindros que contenían extractos acuosos de ajo, cuachalalate y clavo.

Únicamente en este paso se utilizaron los extractos acuosos del ajo, el clavo y el cuachalalate, que en la primera prueba dieron inhibición positiva. Pasadas las 24 horas de incubación se tomó el diámetro de los halos obtenidos. Los datos se agrupan en la siguiente tabla:

Tabla 8.- Diámetro de los halos de inhibición generados por los extractos frente a cada una de las cepas aisladas de *Pseudomonas sp*

Cepa	Valores del diámetro (cm)		
	Extracto de ajo	Extracto de clavo	Extracto de cuachalalate
1	2	2	1.5
2	2.3	1.5	1.4
3	-	-	-
4	-	-	-
5	1.3	-	-
6	1.1	-	-

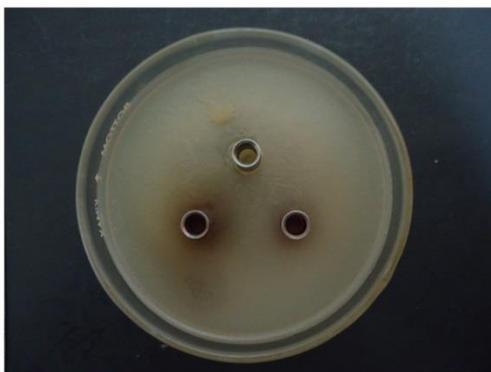
Claramente los resultados de la tabla anterior muestran que algunas cepas que fueron aisladas de tortugas (una del género *Trachemys* y una del género *Graptemys*) presentan inhibición frente a estos extractos acuosos siendo más sensibles al extracto acuoso en crudo al ajo. Las imágenes de las pruebas de sensibilidad se muestran en la figura 23



Cepa 1



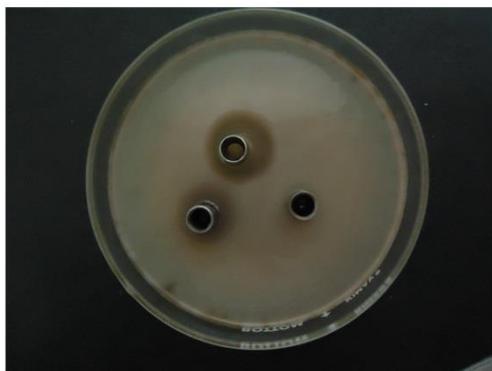
Cepa 2



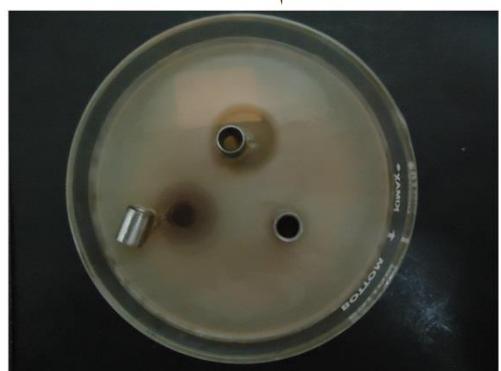
Cepa 3



Cepa 4



Cepa 5



Cepa 6

Figura 23.- Resultados de las pruebas de sensibilidad realizadas con los extractos de ajo, clavo y cuachalalate. La referencia de las posiciones de los extractos se muestra en la Figura anterior

- **Primera etapa del análisis antimicrobiano con nanopartículas de oro**

Al igual que en las pruebas de sensibilidad realizadas con los extractos el primer paso fue hacer una discriminación de las nanopartículas de oro sintetizadas con los extractos (excepto el del ajo). En esta primera prueba los resultados fueron confusos al presentarse falta de crecimiento a las orillas del papel filtro impregnado y negativos en algunos casos como se puede observar en la figura 24

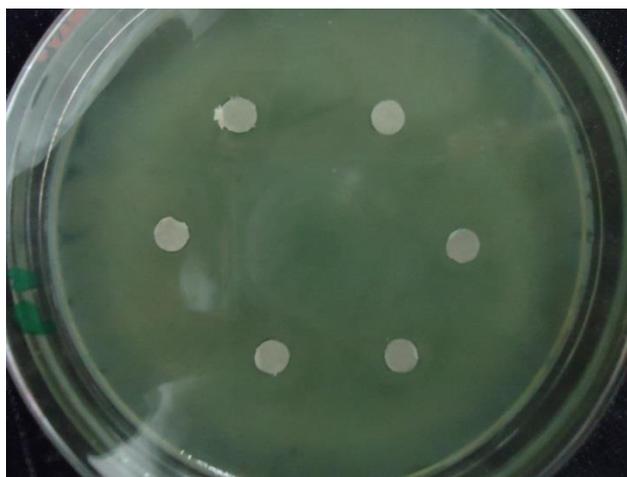


Figura 24.- Resultado de las primeras pruebas de sensibilidad de las nanopartículas de oro sintetizadas con extractos naturales.

Lo anterior se atribuye a la baja concentración de oro que se tiene en el volumen de agua en el que se realizó la síntesis. Este volumen es de 50 mL y la cantidad de oro presente en total es de 0.00000128 gramos dispersos, teniendo una concentración de 0.00000002 g/mL, por lo que no se asegura que en dichos papeles filtro se encuentren nanopartículas de oro suficientes para aportar y/o demostrar el efecto inhibitorio.

Por lo anterior se propuso una nueva síntesis de nanopartículas en un volumen más bajo para así tener una concentración mayor de nanopartículas por mL. Este es el segundo paso en el estudio del análisis de sensibilidad con AuNPs.

.-

- **Segunda etapa del análisis antimicrobiano con nanopartículas de oro.**

La nueva síntesis propuesta de las nanopartículas de oro siguió la misma técnica de Turkevich et al 1951 y Rico-Moctezuma et al 2010 utilizando de nuevo extractos de clavo, manzanilla, noni, pulmonaria, ulmaria, cuachalalate, gordolobo, hojas de olivo y se agregó el ajo (*Allium sativum*) como agentes reductores, las cuales una vez sintetizadas fueron de igual manera que las primeras guardadas a una temperatura de 4°C para su conservación y futura utilización. Estos extractos fueron agregados a un volumen de 10 mL de agua que contenía una solución de oro de concentración 0.025 M. Esta solución al igual que la primera contenía un total de 0.00000128 gramos de oro, pero su concentración es de 0.00000012 g/mL.

Estas nuevas nanopartículas debido a la disminución de la cantidad de volumen del medio que tienen disponible para formarse tuvieron otro tamaño y por lo tanto otro color de la solución (Figura 25) al ya obtenido primeramente por lo que se prosiguió en este proyecto a la caracterización más rápida de estas por el método de Espectrofotometría por UV-Vis.

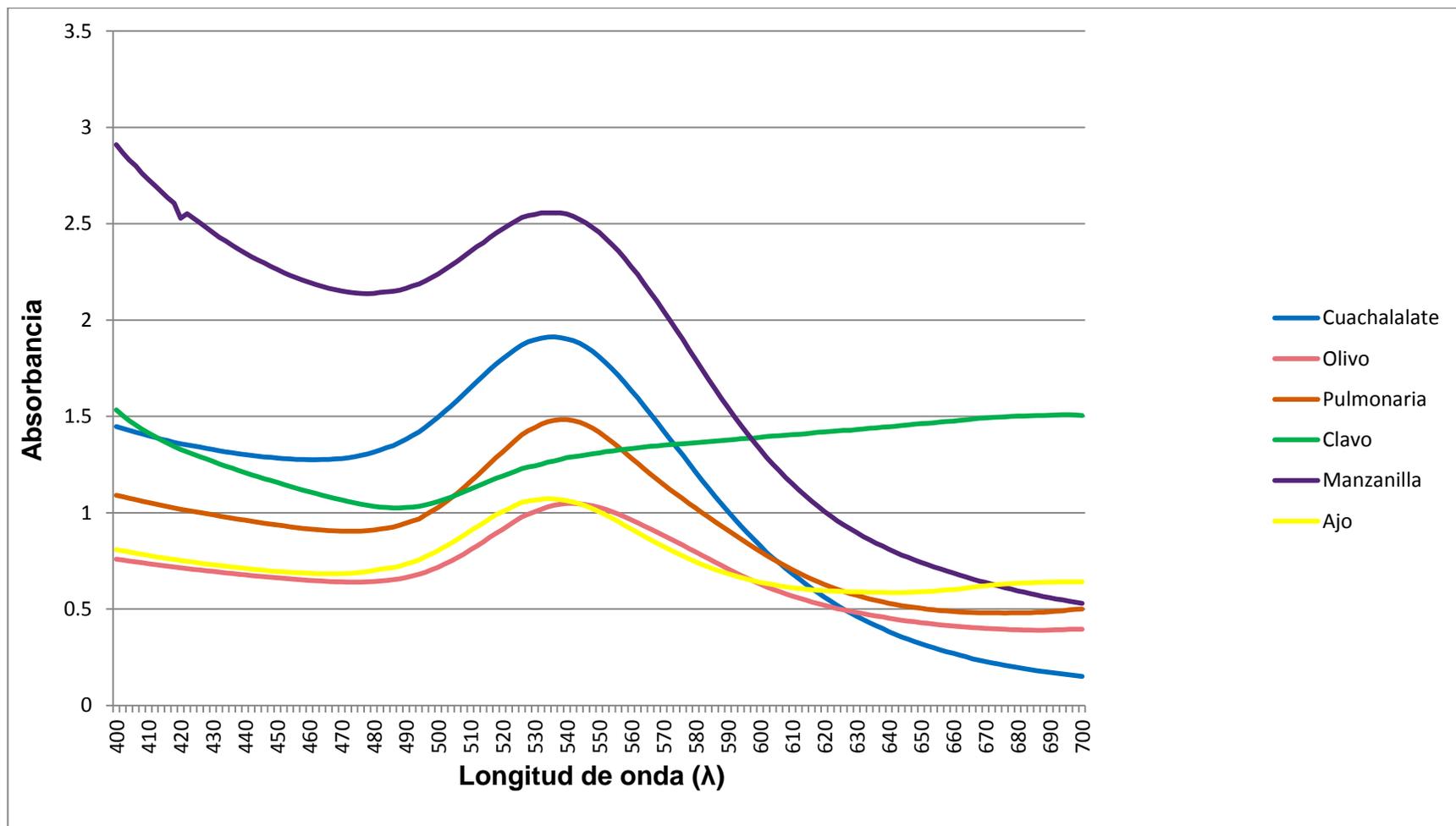


Figura 25.- Nanopartículas de oro sintetizadas a mayor concentración.

Los resultados de estas lecturas (en UV-Vis) se muestran en la tabla 8 y gráfica 2. Tras estos se propondrán los posibles tamaños de las nanopartículas en base a lo obtenido anteriormente y en lo reportado en la bibliografía.

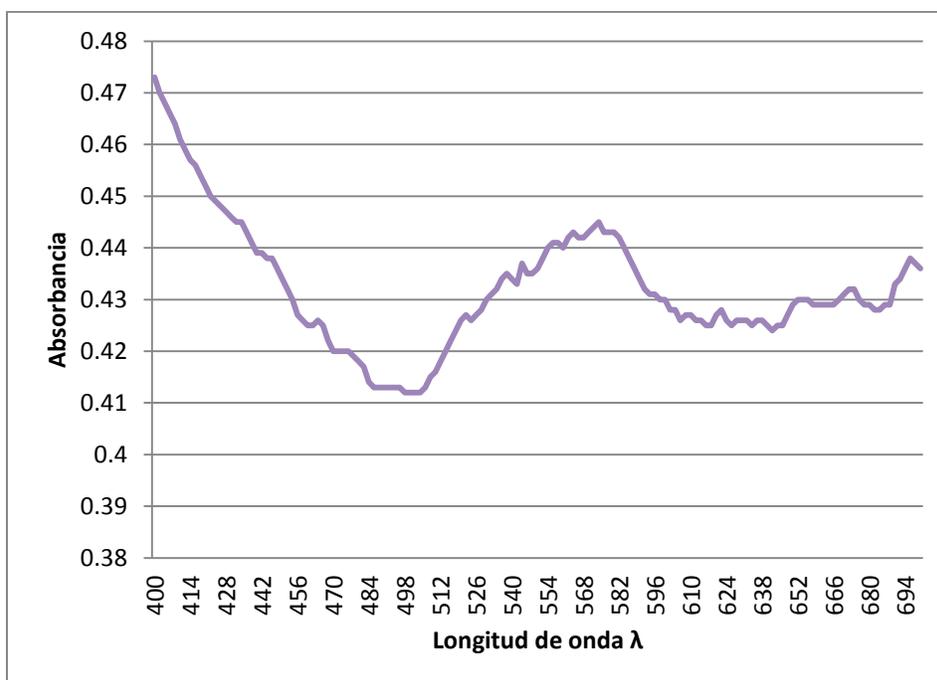
Tabla 9.- Longitud de onda máxima obtenida (método de UV-Vis) y posibles tamaños de las nanopartículas sintetizadas en un volumen de 10 mL.

AuNPs del extracto de	Longitud de onda máxima (λ)	Color de solución	Diámetro propuesto (\emptyset)
Manzanilla	536	Rojo vino	20 \pm 5
Noni	538	Morado	40 \pm 5
Cuachalalate	536	Rojo vino	20 \pm 5
Olivo	540	Morado	40 \pm 5
Pulmonaria	540	Morado	40 \pm 5
Ajo	534	Morado	40 \pm 5
Clavo	694	Azul	90 \pm 5



Grafica 2.- Espectro de absorción UV-Vis de AuNPs biosintetizadas en un volumen menor de agua (10 mL)

Nótese que no se reportan en la Grafica anterior las lecturas de la absorbancia de las AuNPs biosintetizadas de noni debido a que se encuentra en valores de absorbancia muy pequeñas y no se alcanza a apreciar el punto máximo. Por lo anterior se reportan los valores en la siguiente Grafica.



Grafica 3.- Espectro de absorción UV-Vis de AuNPs de noni biosintetizadas en un volumen menor de agua (10 mL)

Claramente esta grafica muestra una irregularidad. Esta irregularidad se atribuye a la sedimentación que sufren las AuNPs. A cada momento que se realizaba la lectura de la absorbancia, esta medición no se realizaba para las mismas nanopartículas de la solución pues se estaban sedimentando, pero pese a ello si se alcanza a observar el pico más alto de absorción. Esta sedimentación únicamente se observa en las AuNPs sintetizadas a partir del fruto del noni que es una planta que generan nanopartículas de oro de tamaños de alrededor de entre 20 y 40 nm pero con la particularidad de formar conglomerados como se puede observar en

la figura 26, la cual pertenece a las fotos tomadas por Microscopía electrónica de Transmisión (TEM) de la primera biosíntesis.

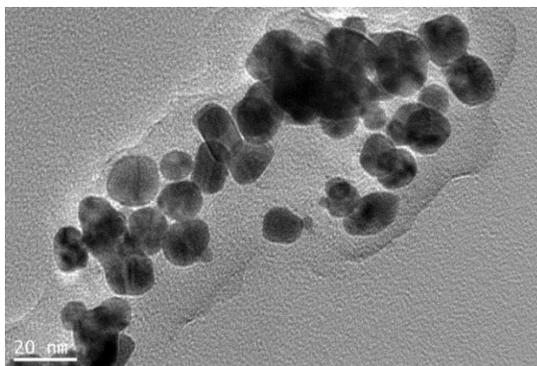


Figura 26.- Foto tomada por TEM de las nanopartículas de oro sintetizadas a partir del extracto de noni.

Con respecto a la segunda biosíntesis estos conglomerados se muestran de manera visible en el tubo que contiene las AuNPS, ya que se observan grandes partículas que se sedimentan (Figura 27), las cuales se puede llegar a ser tomadas como partículas de un tamaño mayor al esperado. Esto se rectifica al momento de realizar la caracterización de estas por UV-Vis donde se observó que la máxima longitud de absorción es de 538 nm que es un valor reportado para nanopartículas de tamaños de entre 20 y 30 nm.

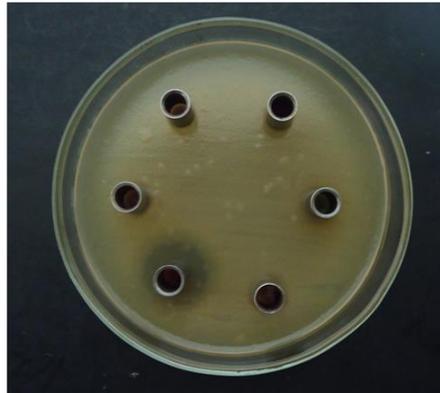


Figura 27.- AuNPs sintetizadas del extracto de noni. A simple vista se observan las partículas de gran tamaño y la sedimentación.

Una vez sintetizadas y caracterizadas las AuNPs estas se utilizaron para realizar un segundo juego de pruebas de sensibilidad. Estas pruebas de sensibilidad fueron realizadas con penicilindros de una capacidad de 0.2 mL igualmente inoculadas por 24 horas. Los resultados se reportan en la siguiente tabla y figura

Tabla 10.- Resultados de las pruebas de sensibilidad con AuNPs biosintetizadas por segunda vez.

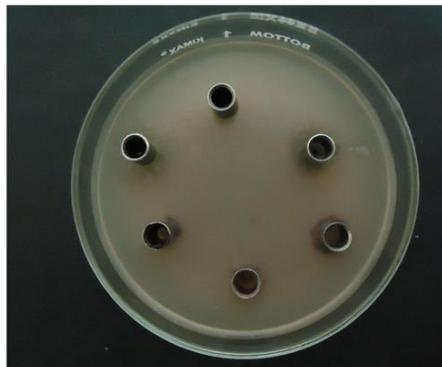
Cepa	AuNPs de						
	Clavo	Cuachalalate	Pulmonaria	Ajo	Manzanilla	Olivo	Noni
1	-	-	-	-	1.6	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	1.2	1.1	-	1.4	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-



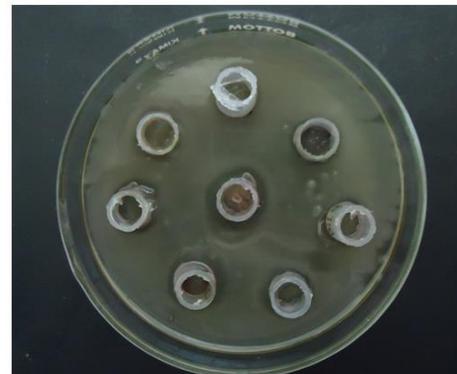
Ceba 1



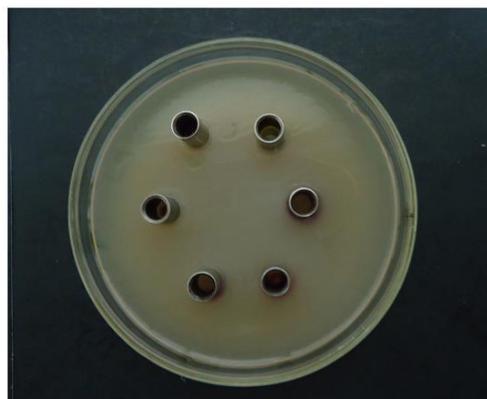
Ceba 2



Ceba 3



Ceba 4



Ceba 5

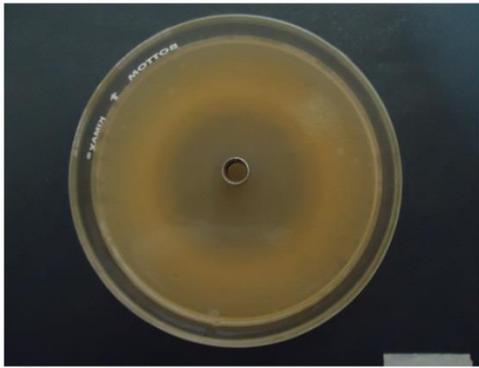
Figura 28.- Resultados de las pruebas de sensibilidad realizadas con las AuNPs de ajo, clavo, cuachalalate, pulmonaria, manzanilla, noni y hojas de olivo.

- **Análisis antimicrobiano con Baytril al 5%**

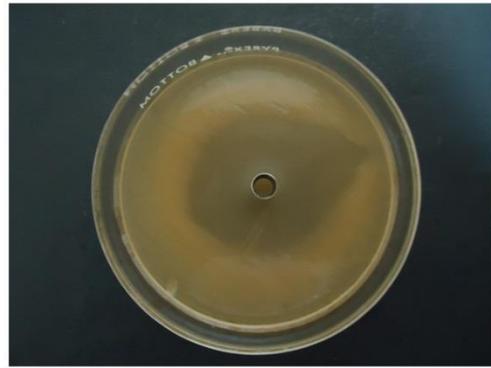
Para tener una referencia con la cual comparar los resultados obtenidos se utilizó la enrofloxacin de Bayer, realizando pruebas de sensibilidad con esta en penicilindros con 0.2 mL del medicamento, Los resultados de estas pruebas se muestran en la siguiente tabla y figura.

Tabla 11.- Diámetro de los halos de inhibición generados por el Baytril 5% frente a cada una de las cepas aisladas de *Pseudomonas sp*

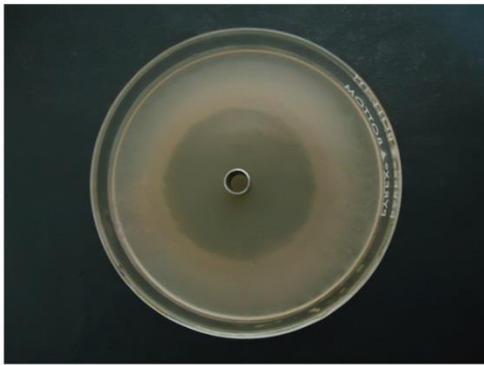
Cepa	Valores del diámetro (cm)
1	4.3
2	4.2
3	4.6
4	4.5
5	5.8
6	4



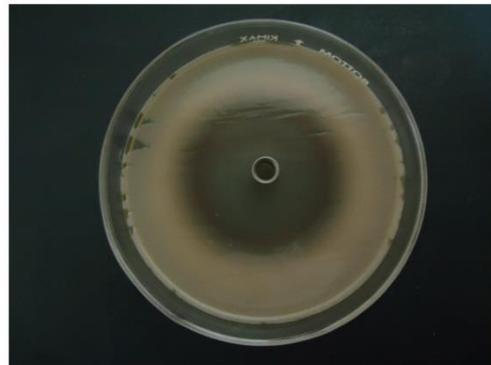
Ceba 1



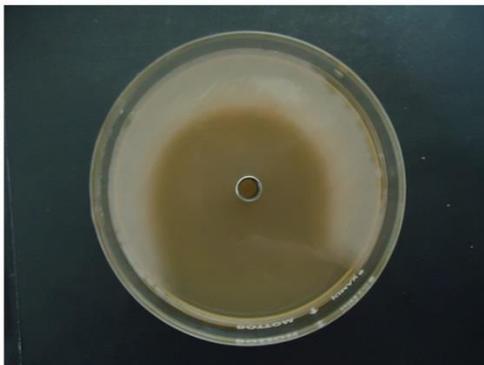
Ceba 2



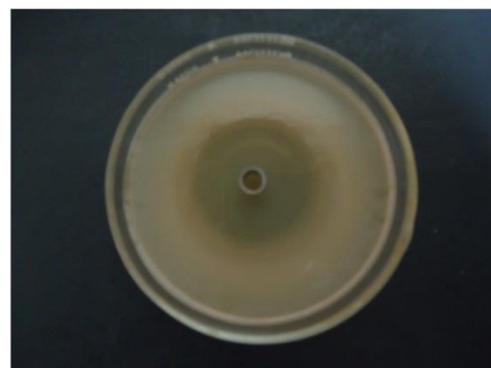
Ceba 3



Ceba 4



Ceba 5



Ceba 6

Figura 29.- Resultados de las pruebas de sensibilidad realizadas con la enrofloxacin de Bayer.

7.- Análisis de los resultados

7.1.- Con respecto al efecto inhibitorio contra *Pseudomonas sp* aisladas.

Claramente los resultados de la inhibición de las *Pseudomonas sp* con la enrofloxacin según lo obtenido en las pruebas de sensibilidad y en los halos de inhibición es mayor al de los extractos naturales y de las AuNPs, demostrando así su éxito en cuanto al tratamiento de infecciones causadas por microorganismos patógenos como la ya anteriormente mencionada. Pero cabe hacer notar que el objetivo de este trabajo es encontrar terapias alternativas al uso de este medicamento pues pese a que es un medicamento de venta libre muy efectivo (que no requiere receta médica para ser adquirido) no es fácil encontrarlo, más que en tiendas especializadas sin contar con el precio que es elevado (el precio al que se adquirió fue de \$260.00) y su vía de administración es intramuscular.

En tortugas la forma de administrar este tipo de medicamentos es inyectando sobre una de las patas traseras como se puede observar en la figura 30. Esta acción la puede hacer cualquier persona pero se recomienda que sea una que calificada y que conozca acerca de la fisiología de las tortugas para no ponerlas en peligro con la administración de este medicamento así como con la cantidad que se necesita administrar. Esta cantidad a su vez también representa otra desventaja con respecto al tamaño de la tortuga y la dosis requerida.



Figura 30.- Zona de administración por vía intramuscular en tortugas en algunos casos. La foto es solo ilustrativa.

Las tortugas que son más comerciales son las tortugas japonesas (*Trachemys scripta elegans*) que al momento de nacer no miden más haya de 3 a 5 centímetros de longitud de caparazón y pesan escasamente algunos gramos (Figura 31). Esto al igual que un bebe humano las hace susceptibles a enfermedades como la neumonía y la mayoría de estas tortugas por los malos cuidados se enferman y mueren. Estos escasos gramos que pesan las tortugas bebes deben ser considerados para la administración del medicamento cuya dosis es muy pequeña y en algunos casos imposible de administrar.



Figura 31.- Peso y tamaño de una tortuga bebe *Trachemys scripta elegans*.

Para justificar lo anterior tomemos un caso de neumonía en una tortuga *Trachemys scripta elegans* que pesa escasamente 8 gramos. Según la bibliografía la dosis recomendada de enrofloxacin para una tortuga es de 5 a 10 miligramos por kilogramo de peso. Si calculamos la dosis requerida para esta tortuga tomando (por ser la dosis mas alta) la dosis de 10 mg por kilogramo de peso, la cantidad de enrofloxacin requerida para administrar seria de 0.08 mg por los 8 gramos en total de peso. Esto equivalente a mL según la presentación de Baytril que se está trabajando del 5% (o de 50 mg por mL) será de 0.0016 mL.

En el mercado la jeringa más pequeña es para insulina (Figura 32) con una capacidad de administración de 1 mL con escalas de 10 en 10 por lo que se concluye que no existe jeringa útil para la administración de esta dosis haciendo inefectiva la terapia para tortugas.



Figura 32.- Jeringas de insulina. Las más pequeñas existentes en el mercado con capacidad de 1 mL

Por lo anterior la necesidad de diseñar terapias alternativas que no dependan tanto de la dosis nos llevó a realizar pruebas de sensibilidad con plantas cuya toxicidad es baja e independiente en la mayoría de los casos de la cantidad de veces que sea consumida. Para ello se tomó en cuenta únicamente a aquellas que son utilizadas para el tratamiento de la neumonía y así verificar el efecto que tenían contra *Pseudomonas sp.* Los resultados arrojaron que únicamente las pruebas realizadas con los extractos que el ajo, el clavo y el cuachalalate son alternativas junto con la nebulización de la manzanilla para el tratamiento de dicha enfermedad pero no tan efectivas como lo esperado, debido a que algunas cepas aisladas mostraron resistencia.

Con respecto a los resultados obtenidos con la biosíntesis de AuNPs al igual que lo anterior las cepas en su mayoría no fueron sensibles a estas, mas sin embargo se observaron resultados positivos en las AuNPs de ajo, clavo y cuachalalate igual que los extractos confirmando así su efecto inhibitorio de estos. Como caso especial en estos resultados cabe hacer notar también que las AuNPs sintetizadas con extracto de manzanilla tuvieron efecto inhibitorio, lo que podemos atribuir principalmente a la concentración del extracto de manzanilla que para la síntesis fue de 15 gramos por cada 50 mL y para la obtención del extracto para las pruebas de sensibilidad fue de alrededor de 6 gramos en 10 mL.

El extracto de manzanilla para las pruebas de sensibilidad dio negativo y para las pruebas de sensibilidad con AuNPs fue positivo por lo que probablemente esta diferencia de concentraciones (menor en el segundo caso) puede ser la causante de la supresión del efecto inhibitorio o puede ser también atribuible a la forma de la AuNPs obtenida, debido a que está fungiendo como vehículo

No se le atribuye el efecto inhibitorio al oro debido a que si este lo tuviera se hubiera presentado inhibición en todas las cepas a las que se le realizó dicho estudio de sensibilidad.

Es importante hacer notar que los halos de inhibición obtenidos de las plantas y de las AuNPS fueron menores a los de la enrofloxacin, pero sin embargo no se retira el mérito de estas plantas a la inhibición puesto que estas pruebas solo se realizaron con una concentración de la misma lo cual no es prueba suficiente de que estas plantas no sean mejores a este medicamento.

7.2.- Con respecto a la biosíntesis de AuNPs.

Otro aporte de los resultados de este trabajo está relacionado con la biosíntesis de AuNPs. De las nueve plantas trabajadas (Ajo, manzanilla, clavo, cuachalalate, pulmonaria, ulmaria, gordolobo, hojas de olivo y noni) únicamente siete presentaron la capacidad de síntesis de las nanopartículas. El extracto de gordolobo y el extracto de ulmaria no lograron sintetizar gran cantidad de AuNPs.

La síntesis de las nanopartículas por esta vía se debe a la presencia de metabolitos secundario de las plantas que fungen como agentes reductores y aunque no se han identificado hasta el momento cuales de esos metabolitos funcionan agentes reductores el conocer que no todas las plantas son capaces de realizar dicha síntesis nos permite discriminar aquellos metabolitos que tienen esta planta en la búsqueda de aquellos que si lo son o en su defecto darnos una idea de a que concentraciones se requieren.

También se observa que dependiendo del volumen de agua para que se lleve a cabo la reacción se obtiene un aumento de concentración de las AuNPs y por lo tanto del extracto. Esta diferenciad de concentración permite tener AuNPs de diferente tamaño como se puede notar en la tabla 11.

Tabla 12.- Comparación de los resultados obtenidos de las dos biosíntesis de AuNPS realizadas.

AuNPS de	Primera síntesis (50 mL)		Segunda síntesis (10 mL)	
	Tamaño	Color	Tamaño	color
Clavo	20 nm		90 ± 5 nm	
Ajo	-	-	40 ± 5 nm	
Cuachalalate	20		20 ± 5 nm	
Pulmonaria	50-100 nm		40 ± 5 nm	
Noni	Menores a 20 nm		40 ± 5 nm	
Manzanilla	20 nm		20 ± 5 nm	
Hojas de olivo	100		40 ± 5 nm	

Otro punto importante en las biosíntesis realizadas es que muchas veces se le agregan a la reacción de reducción agente dispersantes que eviten la aglomeración de las AuNPs. Este tema se vio reflejado en este trabajo debido a los resultados obtenidos en las nanopartículas sintetizadas con extracto de noni. En las dos veces que se sintetizaron las AuNPs independientemente del volumen utilizado estas presentaron aglomeración y en su defecto sedimentación, permitiéndonos así concluir que esta planta no posee metabolitos secundarios (o en su defecto en las concentraciones requeridas de estos) para que se lleve a cabo el efecto de dispersión permitiendo así al igual que en los agentes reductores discriminar y/o conocer aquellos metabolitos secundarios que están teniendo ese papel.

Para llegar a esta conclusión falta mucho trabajo por hacer, por lo que se recomiendan realizar pruebas de separación, identificación y síntesis de AuNPs con las distintas plantas existentes para esclarecer las múltiples dudas que se tienen de este método de síntesis.

8.- Conclusiones

Este trabajo aportó conocimientos para el cuidado y manejo de las tortugas y el tratamiento de una enfermedad mortal como lo es la neumonía así como para la aplicación de la síntesis de nanopartículas de oro con extractos naturales como agentes reductores. Aún falta mucho por hacer para obtener una terapia de fácil acceso y efectiva pero por el momento en base a los resultados y análisis de los mismos se concluye lo siguiente.

- El extracto acuoso de ajo, cuachalalate y clavo son agentes que inhiben algunas cepas aisladas de *Pseudomonas sp* pertenecientes a la flora bacteriana normal de las tortugas de la familia Trachemys y Graptemys muestreadas.
- Las AuNPs sintetizadas de ajo, cuachalalate y clavo presentaron el mismo efecto inhibitorio positivo de sus extractos puros aunque en menor proporción que estos.
- Las AuNPs de manzanilla presentaron también inhibición frente a una única cepa de *Pseudomonas sp* atribuyéndolo a la concentración menor del extracto de manzanilla.
- El volumen de medio dispersante o de agua donde se esté llevando a cabo la reacción de reducción del oro para la formación de las nanopartículas es un punto crítico para la obtención de AuNPs de ciertos tamaños pues se disminuye dicho volumen provocando el aumento de la concentración del oro y del extracto.
- No todas las plantas son capaces de proveer agentes reductores y agentes dispersantes para sintetizar AuNPs como es el caso de la *Filipendula ulmaria* (ulmaria) y *Gnaphalium verbascum* (gordolobo) o la *Morinda citrifolia* (noni).
- Los metabolitos secundarios que se encuentran en las plantas actúan también como agentes dispersantes evitando así la aglomeración de estas.

9.- Recomendaciones para este trabajo

Este trabajo aporta información importante tanto para el tratamiento de la neumonía en tortugas como para la biosíntesis de AuNPs por lo que se recomiendan las siguientes líneas de investigación para aportar más información a estos campos:

- Pruebas de sensibilidad con diferentes concentraciones de ajo, cuachalalate, clavo y manzanilla.
- Calcular la concentración mínima inhibitoria de las sustancias trabajadas (CMI)
- Diseñar y verificar si los extractos de las plantas y las AuNPs se prestan para ser aplicados por vía oral o vía aérea para el tratamiento de la neumonía en tortugas.
- Diseñar un producto de uso veterinario específico contra *Pseudomonas sp*
- Pruebas de sensibilidad con una mayor concentración de oro y de extracto en la síntesis de estas.

10. -Referencias

- Aglauglu, S., Dostbil, N. & Alemdar, S., 2007. *Antimicrobial activity of some spices used in the meat industry.*, Pulawy : s.n.
- Al-Qadi, S. & Remuñán López, C., 2009. *Nanopartículas metálicas: oro*, Santiago de Compostela : s.n.
- Anonimo, 2004. *Conservacion Interamericana para la Protección y Conservación de las Tortugas Marinas.* [En línea]
Available at: <http://www.iacseaturtle.org/docs/publicaciones/5-EspeciesTortugasMarinasMundoesp.pdf>
[Último acceso: 17 Marzo 2014].
- Anonimo, 2013. *Orden Chelonia.* [En línea]
Available at: <http://www.webs.ulpgc.es/reptilia/quelon.htm>
[Último acceso: 2 Agosto 2013].
- Ballard, B. & Cheek , R., 2003. En: *Exotic Animals Medicine For the veterinary Technician.* s.l.:Blackwell Publishing, pp. 129-143.
- Boylan, E., 2003. En: *Las Tortugas.* Ciudad de Mexico: Editorial Antartida.
- Boziaris, I. S., Proestos , C., Kapsokefalou, M. & Komaitis , M., 2009. *Angtimicrobial effect of Filipendula ulmaria plant extract against selected foofborne pathogenic and spoilage bacteria in laboratory media, dish flesh and fish roe product*, Grecia: s.n.
- Cardells, J., 2012. *Estado Sanitario de Trachemys scripta elegans y Testudo hermanni hermanni en la Comunidad Valenciana* , Valencia : Universidad CEU Cardenal Herrera.
- Celis, L. Y., 2010. *Usos medicinales del clavo de olor*, Cuernavaca, Morelos: TlahuiEdu AC.
- Chavez-Sandoval, B. E. y otros, 2013. *Funcion del pH en la reducción de iones de oro para la formación de nanopartículas (NPs)*, Ciudad de México : s.n.
- Connor , E. y otros, 2005. *Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute citotoxicity.*, Alemania: Wiley- VCH.
- De la Fuente , P., Chamorro , P., Moreno , M. & Poza , M., 2004. Propiedades antioxidantes del hidroxitirosol procedente de la hoja de olivo (olea europea L.). *Revista de Fitoterapia*, pp. 139-147.

- Ernst, C. H. & Barbour, R. W., 1994. *Turtles of the world*. Washington: Smithsonian Institution Press.
- Frank, N. & Ramus, E., 1995. *A complete guide to scientific and common names of reptiles and amphibians of the world..* Pottsville : Ramus/NG Publishing .
- Gioanetto, F., Díaz Vilchis, J. T. & Quintero Sánchez, R., 2010. *Manual de utilización de las malezas silvestres de Michoacán. Usos allelopáticos, agroecológicos, medicinales, alimentarios, veterinarios y rituales de las adventicias silvestres y arvenses..* Morelia: Grafopolis S.A de C.V. .
- Gobel, T., 2002. Uso clínico de las fluoroquinolonas en animales exóticos y mamíferos pequeños.. *Bayvet, Bayer...ayer, hoy y mañana*, Mayo, 6(2), p. 52.
- Grupo Bayer, 2014. *Manual Técnico Baytil Cerdos II*. [En línea] Available at: <http://www.bayersanidadanimal.com.mx/es/animales-productivos/porcinos/manuales-bayer/manual-tecnico-baytril-cerdos-ii.php> [Último acceso: 30 Abril 2014].
- Hartmut, W., 2010. Tortugas. En: s.l.:Editorial Hispano Europea, p. 64.
- Higby, G. J., 1982. *Gold in medicine: A review of its use in the west before 1900.*, s.l.: Gold Bull.
- Hintz, C., 1983. *Action of some plant extracts on the bacteria involved in urinary infections*, s.l.: Clujud Med.
- Hyde, D., 1999. *Tortugas Marinas. Guía Educativa*. [En línea] Available at: <http://www.conserveturtles.org/pdf/education/SeaTurtleEducatorsGuide-Spanish.pdf> [Último acceso: 17 Marzo 2014].
- Johnson, T. R. & Briggler, J. T., 2012. *Turtles of the upper Mississippi river system*, Jefferson city, MO: s.n.
- Lerchundi, A. M., 2006. *Liquenes Medicamentosos*. [En línea] Available at: <http://www.acfah.org/privado/apuntes/1-liq-med.pdf> [Último acceso: 27 Mayo 2014].
- Martínez, A., Hidalgo, J., Pérez, N. & Díaz, C., 2011. *Galápagos de Florida. Trachemys Scripta*, Madrid: s.n.
- Martínez, A. & Soler, J., 2008. Enfermedades infecciosas y parasitarias en tortugas. *CONSULTAVET: Consulta de difusión veterinaria*, Issue 150, pp. 43-54.

- Martínez, E., 2013. *Cuachalalate (Juliana Adstringens)*. [En línea] Available at: www.microdosismartinez.blogspot.com [Último acceso: 5 Mayo 2014].
- Meneghel, M., 2006. *Curso: Biología Animal 20006 (Practico). Reptilia.*, Uruguay: Desconocido.
- Mercado, P. & Arévalo, L., 2013. Sensibilidad de cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomona aeruginosa* frente a la acción antibacterial del extracto de *Allium sativum* "Ajo". *REBIOL*, Issue 33, pp. 1-13.
- Morales, R. & Pardo de Santayana, M., 2006. Manzanillas ibéricas: historia y usos tradicionales. *Revista de Fitoterapia*, 6(2), pp. 143-153.
- Muñoz, N. R., 2013. *Estudio Fitoquímico y Evaluación de la actividad inhibidora del sistema de censado quórum bacteriano, de las cortezas de Aphipterygium Adstringens y Ceiba spp.*, Montecillo, Texcoco: s.n.
- Navarro, M. C., 2007. Posibilidades terapéuticas del bulbo de ajo. *Revista de Fitoterapia*, Noviembre, 7(2), pp. 131-151.
- Norred, K., s.f. *Map Turtle Care-sheet*. [En línea] Available at: http://www.tortoisehome.org/files/MAP_TURTLE_CARESHEET.pdf [Último acceso: 25 Abril 2014].
- Online, B., 2014. *Botanical Online*. [En línea] Available at: www.botanical_online.com/animales/tortugas.htm [Último acceso: 13 Marzo 2014].
- Pérez, G., Barbona, M. R., Vercellese, V. & Araki Nishikori, W., 2005. *Actualización Bibliográfica de tratamientos en Tortugas*, Buenos Aires : s.n.
- Rico-Moctezuma, A. y otros, 2010. Biosíntesis de nanopartículas de oro mediante el extracto de *Opuntia ficus indica*. *Superficies y Vacío*, Issue 23, pp. 94-97.
- Rojas, F., 2007. Árboles que curan: el noni.. *Kurú: Revista Forestal*, p. 4.
- Roy, C. & Tirado, M., s.f. *Métodos para el estudio de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos*, s.l.: s.n.
- Rubio, S., 2011. *Comportamiento Farmacocinético de la Marbofloxacin y de la Enrofloxacin en llamas ("Lama Glama")*, Madrid: s.n.
- Rueda-Almonacid, J. V. y otros, 2007. *Las tortugas y los cocodrilianos de los países andinos del trópico. Serie de guías tropicales de campo*. Bogotá: Panamericana.

- Ruiz, L., 2007. *Pseudomonas aeruginosa: aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos.*, Barcelona: s.n.
 - Seidel, M. E., 2002. Taxonomic observations on extant species and subspecies of slider turtles. Genus Trachemys.. *Journal of Herpetology*, Junio, 36(2), pp. 285-292.
 - Senneke, D., 2003. *World Chelonian Trust*, Owatonna, MN: s.n.
 - Torres, A. & Toranzo Reyes , A., 2004. *Antecedentes y estado actual de investigaciones sobre la utilidad médica de la Morinda Citrifolia*, Holguín: s.n.
 - Turkevich , P., Cooper, S. & Hilier, J., 1951. A study of the nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold. *J. Discuss. Faraday Soc.* , Issue 11, pp. 55-75.
 - Upadhyayula, V. K. K., 2012. *Functionalized gold nanoparticle supported sensory mechanisms applied in* , s.l.: s.n.
 - Wilke, H. & Anders, U., 1999. El nuevo libro de las Tortugas. En: s.l.:Ediciones Susaeta, p. 30.
-

Anexo A
Descripción de las Tortugas
Trachemys y Graptemys

Trachemys scripta elegans

Esta tortuga pertenece al género *Trachemys* y es una de las nueve subespecies que conforman a la especie *Trachemys scripta*. Anteriormente eran conocidas como *Chrysemys scripta elegans*(Frank & Ramus , 1995).

Se les ubica de manera natural y principalmente en el área que rodea al río Mississippi en Estados Unidos, llegando hasta el golfo de México, especialmente en zonas donde se encuentran las aguas tranquilas de algún estanque, pantano o laguna donde el clima es cálido, el cual les es muy necesario ya que con el llevan a cabo la digestión y la defecación de manera natural. Durante los meses de frío esta especie entra en un periodo de hibernación localizándose en el fondo del área donde vive, es decir en el fondo de un estanque o lagos de poca profundidad (Cardells, 2012). Cabe mencionar que esta tortuga ya no es exclusiva de esta región puesto que por su alta comercialización ya se encuentra en forma silvestre (debido a que la gente las libera cuando ya no son deseadas en espacios naturales cercanos a donde habita, llevándose a cabo una adaptación y reproducción exitosa por parte de esta especie) o en cautiverio como mascota en muchos otros países del mundo donde haya alguien a quien le interese.

Por su principal localización en los Estados Unidos, principalmente en los estados de Colorado, Virginia y Florida se le conoce también como galápagos de Florida o tortuga de orejas rojas, pero existe otro nombre que es más común, llamando a estas tortugas japonesas, pese a que no son originarias de esta región. La hipótesis del porque recibe este nombre es porque este tipo de tortugas tienden a tener una línea horizontal que puede simular a la forma rasgada de los ojos de las culturas asiáticas como lo es Japón (Figura 1).

Físicamente *Trachemys scripta elegans* es de color verde, en tonos olivo con líneas amarillas en la piel y se le caracteriza principalmente por tener dos líneas de color anaranjado que posee en los lados de la cabeza justo detrás de los ojos. Por dichas pares de líneas esta especie recibe el nombre de tortuga de orejas rojas (Figura 1). También se les reconoce por tener en el cuello una serie

de líneas amarillas que a la altura del hocico se unen formando una Y como se ve en la figura 2 (Ernst & Barbour, 1994).

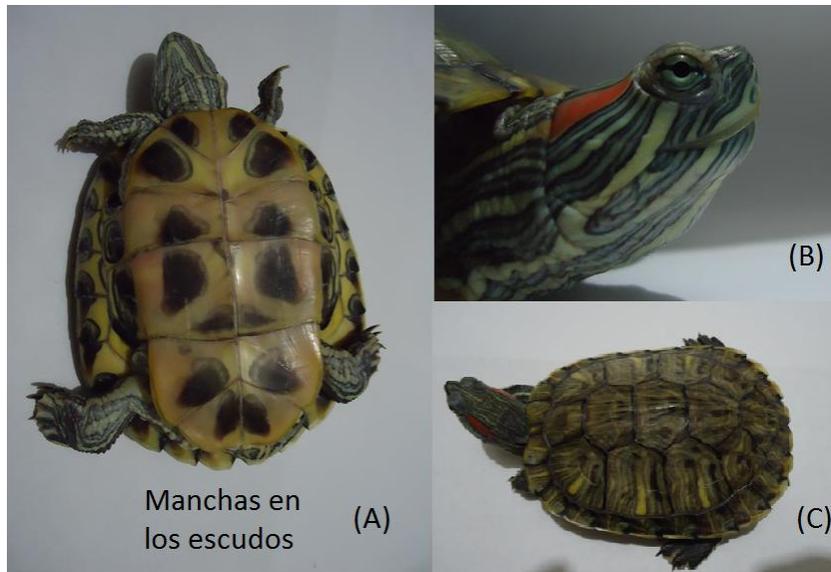


Figura 1.- Trachemys Scripta elegans. A) Vista inferior. Plastrón de color amarillo con manchas en cada uno de los escudos. B) Vista de perfil. En la cabeza se observa la franja color naranja que caracteriza a la especie y la línea horizontal en el ojo por la que se cree se les da el nombre de Tortugas Japonesas, así como franjas de color verde y amarillas presentes en la piel.

C) Vista superior. Caparazón de color verde donde en cada uno de los escudos que lo conforman se presentan líneas de color amarillo y manchas negras.



Figura 2.- El cuello de una Trachemys Scripta Elegans. El cuello de este tipo de tortugas tiene la particularidad de formar una Y invertida que se prolonga hasta la base del cuello pegada al plastrón.

Con respecto a la forma del plastrón esta tiene manchas de forma ovalada en cada uno de los escudos que lo conforman (Figura 1) y llegan a vivir entre 20 y 30 años, algunas hasta los 40 años, pero esto mucho depende de su calidad de vida, la dieta (en jóvenes es dieta carnívora principalmente y en adultos la dieta es prioritariamente herbívora) y si se encuentran o no en cautiverio, ya que las que están criadas en cautiverio suelen morir antes de que lleguen a esa edad (Cardells, 2012).

Con lo referente a su madurez sexual los machos alcanzan esta cuando tiene un tamaño de caparazón de entre nueve y diez centímetros y una edad entre dos a cinco años, mientras que las hembras alcanzan su madurez entre los cuatro y siete años de edad y tienen un tamaño de plastrón (el plastrón es más pequeño que el caparazón) entre los quince y diecisiete centímetros de longitud (Rueda-Almonacid, et al., 2007)

Trachemys scripta venusta

Esta tortuga igualmente que la *scripta elegans* pertenece a la familia *Trachemys*. Se le encuentra de manera natural en cuerpos de aguas permanentes en los ríos de corrientes lentas, lagos y lagunas de costas Mexicanas (estados de Veracruz, Oaxaca, Tabasco, Chiapas, Campeche, Quintana Roo y Yucatán) y Hondureñas, en la vertiente del Atlántico de Nicaragua, Costa Rica, Panamá y el bajo Atrato en Colombia (Rueda-Almonacid, et al., 2007)

Debido a que tiene una gran distribución en Centro y Sudamérica, se le conoce de diferentes maneras en cada uno de estos como Tortuga Carey, Tortuga icotea o jicotea, slider o tortuga pavorreal.

Físicamente *Trachemys scripta venusta* es de color verde en tonos oscuros en el caparazón con manchas redondas que simulan a los círculos que se encuentran en la cola del pavorreal (de allí su nombre de tortuga pavorreal) como se muestra en la figura 3. Estos círculos tienen un contorno color amarillo en jóvenes y naranjas en adultos. El plastrón tiene manchas de color verde y amarillo que en conjunto forman figuras que son diferentes para cada tortuga como si fuera su huella digital (Figura 3). La piel es de un color verdoso con franjas amarillas, inclusive las que están a los costados de la cabeza (franja característica del género). En el cuello estas cuentan con líneas gruesas de color amarillo sin forma como se puede ver en la figura 3.



(A)(B)

Figura 3.- *Trachemys scripta venusta*. A) Caparazón característico de este ejemplar debido a que cuenta con un grupo de círculos de diferentes tamaños y colores que asemejan a los círculos de las plumas de un pavorreal, de allí su nombre comercial. B) Plastrón y Cabeza de *Trachemys scripta venusta*, mostrando franja de color amarilla característica de la subespecie.

Con lo referente a la madurez sexual esta especie la alcanza a los cuatro o siete años de vida cuando alcanzan un tamaño de plastrón de entre diecinueve y veintidós centímetros

Graptemys köhnii* y *Graptemys pseudogreographica

Esta tortuga pertenece al género *Graptemys* y se le conoce también con el nombre de Tortuga del Mississippi o Tortuga Mapa (Como a las demás subespecies de la familia), aunque es importante aclarar que la taxonomía de este tipo de subespecie no ha sido del todo esclarecida debido a la similitud de una especie con otra. Algunos autores nombran a *la Graptemys köhnii* también como *Graptemys pseudogreographica köhnii* (Johnson & Briggler, 2012)

Se le ubica principalmente en el sur de los Estados Unidos en hábitats de agua estancada o de curso muy lento con una densa vegetación (Hartmut, 2010) que en algunos casos es fuente de alimento. De hecho específicamente a esta especie se le encuentra de manera endémica en el río Mississippi al sur de Hannibal, Missouri y también los ríos Illinois y Missouri en los Estados Unidos (Johnson & Briggler, 2012) de allí uno de sus nombres típicos.

Llega a ser confundida en ocasiones con la Tortuga Falsa Mapa (*Graptemys pseudogreographica*), que a diferencia de la primera no posee los picos característicos de la especie en la columna vertebral como se puede apreciar en la figura 4 (he de allí otra de las razones por las cuales no se ha logrado del todo esclarecer una taxonomía correcta del género, pese a que no existe una uniformidad de información en las descripciones de cada subespecie por lo que se pudo apreciar mientras se hacia la investigación bibliográfica de este trabajo) a parte de no poseer la misma forma de las líneas amarillas de la cabeza. En *Graptemys köhnii* las marcas de color amarillo se encuentran detrás del ojo en forma de media luna con un grosor menor (Johnson & Briggler, 2012) en comparación con las *Graptemys ouachitensis* que tienden a tener un grosor mayor como se puede ver en la figura 5.



Figura 4. - *Graptemys pseudogreographica* vs. *Graptemys köhni*



Figura 5.- Diferentes formas de las líneas amarillas de la cabeza del genero *Graptemys*. Del lado izquierdo esta la *Graptemys köhni* y del lado derecha la *Graptemys ouachitensis*

Siguiendo con la descripción física el caparazón de las *Graptemys köhni* va desde colores grisáceos hasta marrones con los picos de la columna bien definidos y coloreados con manchas de color café y negro. La piel es de color gris con amarillo o blanco y en la parte del cuello tiende a formar unos círculos parecidos a las curvas de nivel que también las podemos encontrar de manera clara en colores amarillo o anaranjado en el caparazón de esta como se puede observar en la figura 6.



Figura 6.- Caparazón, cuello y piel de una tortuga *Graptemys köhni*

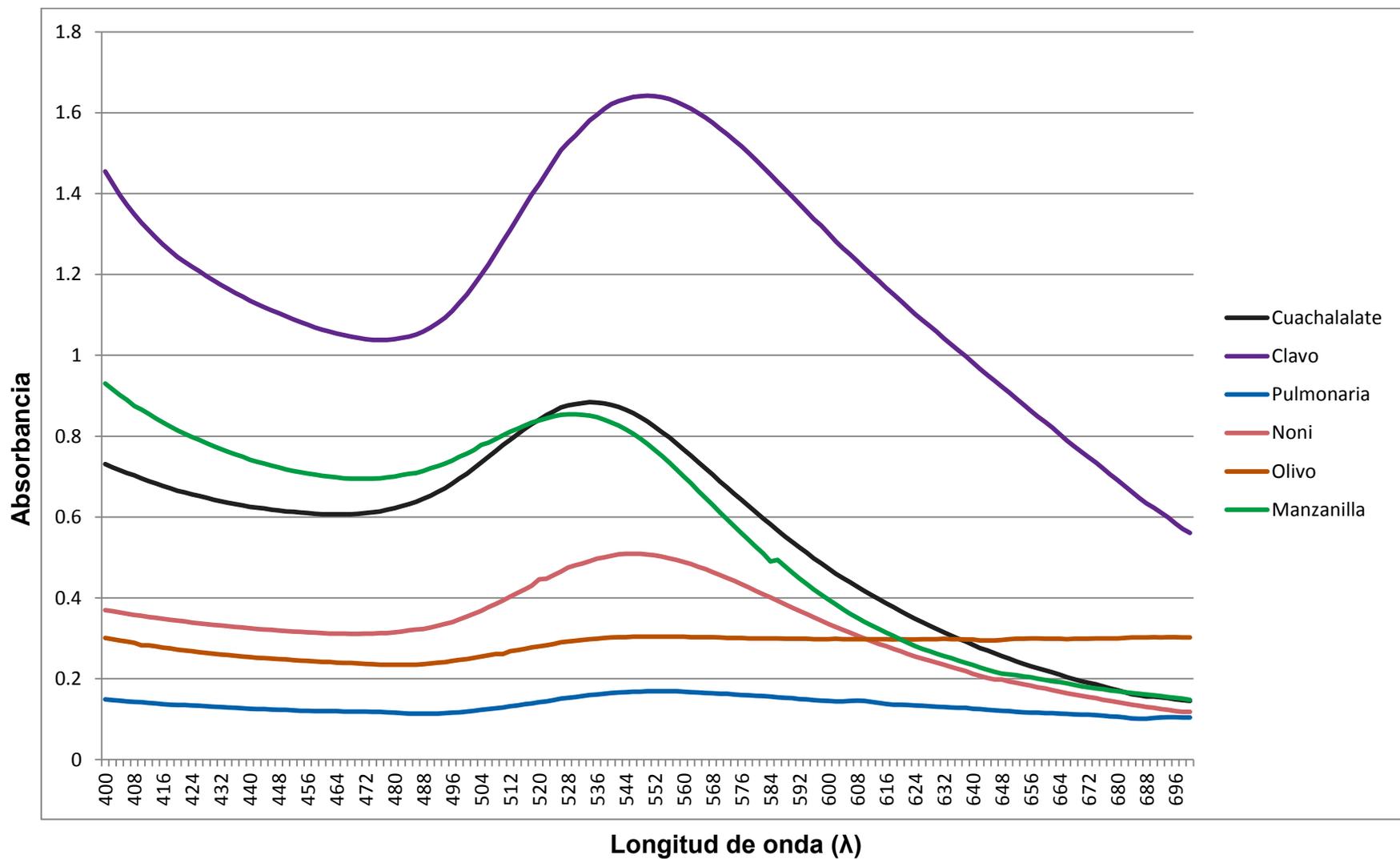
Con respecto al plastrón este es de color amarillo y cuenta con la presencia de manchas de color gris y blanco en este que son diferentes para cada tortuga como se puede apreciar en la figura 7



Figura 7.- Plastrón de una tortuga *Graptemys Köhni*

Anexo B

Información adicional de las AuNPs biosintetizadas



Grafica 2.- Espectro de absorción UV-Vis de AuNPs biosintetizadas (volumen de agua de 50 mL)

Anexo C

Información adicional de la enrofloxacin

INFORMACIÓN

En bovinos, ovinos y caprinos:

Infecciones respiratorias: Bronquitis, neumonías, bronconeumonías, complejo neumónico, neumonía enzoótica, neumoenteritis o peste boba, Septicemia hemorrágica o fiebre de embarque, micoplasmosis (*Pasteurella multocida*, *Bordetella* spp, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella haemolytica*, *Mycoplasma bovis*). Infecciones del aparato digestivo: Diarreas infecciosas, diarrea neonatal en terneros, diarrea colibacilar, enterotoxemia colibacilar, colisepticemia, salmonelosis (*Escherichia coli*, *Proteus* spp, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp, *Streptococcus* spp.).

Infecciones del aparato genitourinario: Nefritis, pielitis, pielonefritis, endometritis, vaginitis, piómetras (*Corynebacterium pyogenes*, *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *E. coli*, *Proteus* spp, *Pseudomonas* spp.)

Infecciones de la piel y tejidos blandos: Infecciones del ombligo, heridas infectadas, dermatitis, abscesos (*Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *proteus* spp, *E. coli*, *Pseudomonas* spp.)

Infecciones septicémicas por: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Haemophilus* spp.

Infecciones bacterianas secundarias: a enfermedades virales producidas por gérmenes sensibles a Baytril.

En Cerdos:

Infecciones del aparato respiratorio: Pleuroneumonía infecciosa (*Actinobacillus pleuroneumoniae*), Neumonía enzoótica (*Mycoplasma* spp.), Rinitis atrófica (*Pasteurella multocida*), Complejo neumónico, rinitis atrófica (*Bordetella* spp, *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Corynebacterium* spp).

Infecciones del aparato digestivo: Colibacilosis, colisepticemia (*E. coli*), Salmonelosis entérica y septicémica (*Salmonella* spp.)

Infecciones del aparato genitourinario: infecciones renales, síndrome metritis – mastitis - agalactia (*E. coli*).

Infecciones septicémicas: por *E. coli*, *Salmonella* spp, *Erysipelothryx rhusiopathiae*, *Staphylococcus* spp.

Infecciones de la piel: Eczema húmedo (*Staphylococcus hycus*), otros.

Infecciones bacterianas secundarias a enfermedades vírales producidas por gérmenes sensibles a Baytril.

En perros y gatos:

Infecciones del tracto digestivo: (*E. coli*, *Salmonella* spp. , *Proteus* spp)

Infecciones de los órganos respiratorios: (*Pasteurella* spp, *Bordetella* spp., *Klebsiella* spp)

Infecciones del tracto urogenital: Nefritis, cistitis, pielonefritis, (*E. coli*, *Corynebacterium pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp.)

Infecciones cutáneas, heridas infectadas, dermatitis (*E. coli*, *Klebsiella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp).