

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

**“Actividad antibacteriana de los extractos supercríticos del  
ajo (*Allium sativum* L), chichipin (*Hamelia patens* Jacq),  
orégano (*Lippia graveolens* Kunth) y té de limón (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf)  
sobre el crecimiento in vitro de *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*,  
*Escherichia coli* y *Pseudomonas aureginosa*”**

Estudio experimental realizado en el Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones  
Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de  
Guatemala

abril – mayo 2014

Tesis

Presentada a la Honorable Junta Directiva  
de la Facultad de Ciencias Médicas de la  
Universidad de San Carlos de Guatemala

**Catherine Aracely Guerra López  
Luis Gabriel Robles González**

**Médico y Cirujano**

Guatemala, junio de 2014

El infrascrito Decano de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala hace constar que:

Los estudiantes:

Catherine Aracely Guerra López  
Luis Gabriel Robles González

200721140  
200710240

han cumplido con los requisitos solicitados por esta Facultad previo a optar al Título de Médico y Cirujano en el grado de Licenciatura, y habiendo presentado el trabajo de graduación titulado:

*“Actividad antibacteriana de los extractos supercríticos del ajo (*Allium sativum* L), chichipin (*Hamelia patens* Jacq), orégano (*Lippia graveolens* Kunth) y té de limón (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) sobre el crecimiento in vitro de *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Escheréchia coli* y *Pseudomonas aureginosa*”*

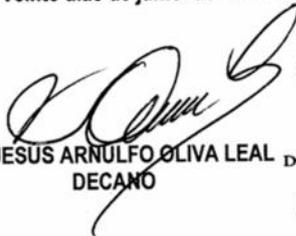
Estudio experimental realizado en el Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala

abril – mayo 2014

Trabajo tutorado por la Dra. Rosa Elena Solís y revisado por la Dra. Carmen Irene Villagrán Blanco de Tercero, quienes avalan y firman conformes. Por lo anterior, se emite, firma y sella la presente:

ORDEN DE IMPRESIÓN

En la Ciudad de Guatemala, a los veinte días de junio del dos mil catorce



DR. JESUS ARNULFO OLIVA LEAL  
DECANO





UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS  
COORDINACIÓN DE TRABAJOS DE GRADUACIÓN

El infrascrito Coordinador de la Unidad de Trabajos de Graduación de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, hace constar que los estudiantes:

Catherine Aracely Guerra López  
Luis Gabriel Robles González

200721140  
200710240

han presentado el trabajo de graduación titulado:

*“Actividad antibacteriana de los extractos supercríticos del ajo (*Allium sativum* L), chichipin (*Hamelia patens* Jacq), orégano (*Lippia graveolens* Kunth) y té de limón (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) sobre el crecimiento in vitro de *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aureginosa*”*

Estudio experimental realizado en el Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala

abril – mayo 2014

El cual ha sido revisado y corregido por el Dr. Edgar Rodolfo de León Barillas, y al establecer que cumple con los requisitos exigidos por esta Unidad, se les autoriza a continuar con los trámites correspondientes para someterse al Examen General Público. Dado en la Ciudad de Guatemala el veinte de junio del dos mil catorce.

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

Dr. Edgar de León Barillas  
Coordinador



Facultad de Ciencias Médicas  
Coordinación de Trabajos de Graduación  
COORDINADOR

Guatemala, 16 de junio del 2014

Doctor  
Edgar Rodolfo de León Barillas  
Unidad de Trabajos de Graduación  
Facultad de Ciencias Médicas  
Universidad de San Carlos de Guatemala  
Presente

Dr. de León Barillas:

Le informamos que los estudiantes abajo firmantes:

Catherine Aracely Guerra López

Luis Gabriel Robles González

Presentaron el informe final del Trabajo de Graduación titulado:

“Actividad antibacteriana de los extractos supercríticos del ajo (*Allium sativum* L), chichipin (*Hamelia patens* Jacq), oregano (*Lippia graveolens* Kunth) y té de limón (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) sobre el crecimiento in vitro de *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aureginosa*”

Estudio experimental realizado en el Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala

abril – mayo 2014

Del cual como tutor y revisor nos responsabilizamos por la metodología, confiabilidad y validez de los datos, así como de los resultados obtenidos y de la pertinencia de las conclusiones y recomendaciones propuestas.

*Rosa Elena Solís Aguilar*  
MEDICO Y CIRUJANO  
Colegiado No. 6769

*Rosa Elena Solís*  
Dra. Rosa Elena Solís  
TUTORA  
Firma y sello profesional

*Dr. Carmen Irene Villagrán de Tercero*  
REVISORA  
Firma y sello profesional



***De la responsabilidad del trabajo de graduación:***

El autor o autores es o son los únicos responsables de la originalidad, validez científica, de los conceptos y de las opiniones expresadas en el contenido del trabajo de graduación. Su aprobación en manera alguna implica responsabilidad para la Coordinación de Trabajos de Graduación, la Facultad de Ciencias Médicas y para la Universidad de San Carlos de Guatemala. Si se llegara a determinar y comprobar que se incurrió en el delito de plagio u otro tipo de fraude, el trabajo de graduación será anulado y el autor o autores deberá o deberán someterse a las medidas legales y disciplinarias correspondientes, tanto de la Facultad, de la Universidad y otras instancias competentes.

## LOGRO QUE DEDICO A

A DIOS por brindarme la sabiduría y las fuerzas necesarias para lograr este sueño.

A MIS PADRES Saúl Guerra y Gladis López. Por darme la vida y ser ejemplares, porque sé que a pesar de las adversidades y dificultades siempre se han esforzado para darnos lo mejor, enseñándome a ser perseverante y luchar por alcanzar mis sueños. Por obsequiarme la mejor herencia: la educación. Gracias por todo su apoyo y amor incondicional. Por enseñarme que el mejor ingrediente para ser feliz en la vida, es hacer lo que más me gusta.

A MIS HERMANOS Marisa, Saúl, Lucia y Walter, ustedes saben que los amo y son como un tesoro para mí.

A MIS ABUELITOS Baudilio, Piedad, María y Alfonso porque con su amor me han enseñado a valorar a la familia por sobre todo.

A Gabriel Robles mi novio y mejor amigo por tu paciencia, comprensión, apoyo y amor incondicional, porque a lo largo de este camino hemos aprendido mucho juntos y a pesar de las dificultades siempre has estado para mí como un ángel que guía mi camino.

A MIS PADRINOS Blanca y Antonio por siempre creer en mí y estar pendientes con amor y cariño.

A MIS TÍOS por todo su apoyo en especial a Rodolfo por haberme apoyado en mis estudios desde pequeña.

A MIS AMIGOS porque a pesar de lo difícil del camino siempre han sido entusiastas y tenido palabras de aliento.

A LA TRICENTENARIA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA por acogerme como alma mater y haberme formado como médica.

A LAS DOCTORAS ROSA SOLIS Y CARMEN DE TERCERO por todo su apoyo incondicional durante la realización de esta tesis.

A ABNER RODAS, MAX MÉRIDA, SUE QUAN, BRENDA CANCINOS Y MANUEL MUÑOZ: Excelentes profesionales san carlistas; gracias a su apoyo y conocimientos, fue posible realizar esta tesis.

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa.”

Mahatma Gandhi

Catherine Aracely Guerra López

LOGRO QUE DEDICO A:

A DIOS: Por permitirme trabajar para él.

A MIS PADRES EDUARDO Y LUCKY: Por enseñarme el amor por el prójimo y obsequiarme el gusto por las ciencias.

A MIS HERMANOS OSCAR Y ANDREA: Por los sacrificios que hicieron para que yo estudiara.

A MIS ABUELOS MAMITA Y COCA: Por haberme dado un hogar y ser ejemplos de honestidad, trabajo y amor.

A CATHERINE GUERRA: Por haber recorrido junto a mí este camino con amor, dedicación y comprensión; este logro no sería posible de no ser por ti.

A MIS AMIGOS: Porque en medio de desvelos, estudio y cansancios, nos alegramos el camino.

A LA FAMILIA GUERRA LÓPEZ: Por haberme acogido en su casa durante tantas tardes y noches de estudio.

A JORGE ORLANDO PAGUAGA Y JUAN ARTURO GONZÁLEZ: Por haberme apoyado y tendido la mano durante mis estudios.

A LA TRICENTENARIA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA, FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS Y MIS CATEDRÁTICOS: Por haberme enseñado los nobles fundamentos de mi profesión.

A CHESTER JOSÉ: Por estar a mi lado cada noche que estudié y haberme esperado cada noche que turné.

A ROSA ELENA SOLÍS Y CARMEN DE TERCERO: Ejemplares médicas sin quienes esta tesis no hubiese sido posible.

A ABNER RODAS, MAX MÉRIDA, SUE QUAN, BRENDA CANCINOS Y  
MANUEL MUÑOZ: Excelentes profesionales san carlistas; gracias a su apoyo y  
conocimientos, fue posible realizar esta tesis.

“Para seres tan pequeños como nosotros, la vastedad del espacio y la inmensidad  
del tiempo solo es tolerable a través del amor”

Carl Sagan

Luis Gabriel Robles González

## RESUMEN

**OBJETIVO:** Describir mediante el método de difusión en agar la actividad antibacteriana de los extractos supercríticos de ajo, chichipin, orégano y té de limón. **MÉTODOS:** Se utilizó el método de difusión en agar para probar el efecto bactericida de los extractos supercríticos de ajo (*Allium sativum* L.), chichipin (*Hamelia patens* Jacq), orégano (*Lippia graveolens* Kunth), y té de limón (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) sobre el crecimiento in vitro de *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aureginosa*. Las cepas bacterianas fueron proporcionadas por el Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la USAC. Las plantas fueron recolectadas en distintas partes de Guatemala; el ajo proviene de Huehuetenango, el chichipin de Chiquimula, el orégano de Zacapa y el té de limón de Alta Verapaz. Los extractos se realizaron en el Centro Universitario de Oriente. Luego, se llevaron al Laboratorio Clínico, donde se realizaron las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. **RESULTADOS:** Se demostró que el extracto supercrítico de orégano presenta actividad antibacteriana contra *S. aureus* mostrando un halo inhibitorio de 12 mm, *E. coli* mostrando un halo inhibitorio de 10 mm y *H. pylori* mostrando un halo inhibitorio de 8 mm. No tuvo actividad antibacteriana contra *P. aureginosa*. Los otros tres extractos; de ajo, chichipin, y té de limón, no mostraron actividad antibiótica. **CONCLUSIONES:** El extracto supercrítico de orégano presenta actividad antibiótica in vitro contra *S. aureus*, *E. coli* y *H. pylori*.

**Palabras clave:** Guatemala, medicina tradicional, fitoterapéutica, orégano, *Lippia graveolens* Kunt, ajo, *Allium sativum* L, chichipin, *Hamelia patens* Jacq, y té de limón, *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa*, *Helicobacter pylori*.



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	3
2.1. Objetivo general.....	3
<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	3
<b>3. MARCO TEÓRICO</b> .....	5
3.1. Definiciones:.....	5
3.1.1. Fluidos supercríticos:.....	5
<b>3.1.2. Procedimiento de extracción supercrítica:</b> .....	7
3.1.3. Descripción del proceso:.....	7
3.1.4. Método Bauer-Kirby .....	8
3.1.5. Plantas utilizadas:.....	10
3.1.5.1. Ajo, nombre científico: <i>Allium sativum</i> L.....	10
3.1.5.2. Chichipin, nombre científico: <i>Hamelia patens</i> Jacq. ....	11
3.1.5.3. Orégano, Nombre científico: <i>Lippia graveolens</i> Kunth. ....	11
3.1.5.4. Té de limón, Nombre científico: <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.....	12
3.1.6. Bacterias utilizadas:.....	13
3.1.6.1. <i>Helicobacter pylori</i> .....	13
3.1.6.2. <i>Pseudomonas aureginosa</i> .....	19
3.1.6.3. <i>Escherichia coli</i> .....	27
3.1.6.4. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	30
3.1.7. Antibióticos convencionales utilizados:.....	37
3.1.7.1 Ciprofloxacina.....	37
3.1.7.2. Vancomicina.....	39
3.1.7.3. Amoxicilina / Clavulanato .....	40
3.1.7.4. Oxacilina .....	42
3.1.7.5. Meticilina .....	42
3.1.7.6. Claritromicina .....	43
<b>4. MÉTODOS</b> .....	45
4.1. Tipo y diseño de la investigación:.....	45
<b>4.2 Unidad de análisis</b> .....	45

4.3	Población y Muestra:.....	45
4.4	<b>Objeto de estudio:</b> .....	46
4.5	<b>Enfoque o diseño de la investigación:</b> .....	46
4.6	Medición de variables:.....	47
4.7	Técnicas, procesos e instrumentos utilizados en la recolección de datos:.....	48
4.7.1	<b>Técnicas de recolección de datos:</b> .....	48
4.7.2	<b>Procesos:</b> .....	48
4.7.2.	<b>Instrumentos</b> .....	54
4.8.	<b>Procesamiento de datos</b> .....	54
4.8.1	<b>Procesamiento:</b> .....	54
4.8.1.	<b>Análisis</b> .....	55
4.8.2.	<b>Hipótesis de trabajo</b> .....	55
4.9.	<b>Límites de la investigación:</b> .....	55
4.9.1.	<b>Alcances</b> .....	55
4.9.2.	<b>Limites</b> .....	56
4.10.	<b>Aspectos éticos:</b> .....	56
4.11.	Recursos:.....	56
4.11.1.	<b>Recursos físicos:</b> .....	56
4.11.2.	<b>Recursos materiales:</b> .....	56
4.	<b>RESULTADOS</b> .....	59
4.1.	<b><i>Escherechia coli:</i></b> .....	59
4.2.	<b><i>Helicobacter pylori:</i></b> .....	60
4.3.	<b><i>Pseudomonas aureginosa:</i></b> .....	61
4.4.	<b><i>Staphylococcus aureus:</i></b> .....	62
5.	DISCUSIÓN .....	63
6.	CONCLUSIONES:.....	65
7.	RECOMENDACIONES:.....	67
8.	APORTES .....	69
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
10.	ANEXOS.....	79

## 1. INTRODUCCIÓN

Guatemala es una nación en vías de desarrollo con ubicación tropical que presenta un panorama epidemiológico en el que las infecciones bacterianas son causa importante de morbimortalidad (1). Se estima que del 70% al 90% de la población de países en vías de desarrollo, están colonizadas por *Helicobacter pilory* –*H. pilory*- antes de los 10 años de edad (2). Hay estudios que demuestran que *Escherichia coli* –*E. coli*- es el agente etiológico más frecuente en las heces de niños con diarrea en áreas marginales de nuestro país (3), además de ser responsable de más del 80% de las Infecciones del Tracto Urinario -ITU- (4). *Staphylococcus aureus* –*S. aureus*- es la causa bacteriana más frecuente de infección (4), el cual coloniza de forma asintomática la mucosa nasal, para luego infectar a personas susceptibles que están en contacto con personas colonizadas (5). Existen algunos estudios aislados en Guatemala de portadores nasales asintomáticos de *Staphylococcus*, con porcentajes que varían desde el 21% hasta el 48% (6, 7, 8) sin que haya datos epidemiológicos contundentes sobre dichos portadores en la comunidad. Por último, *Pseudomonas aureginosa* –*P. aureginosa*- es ubicua, se halla en superficies húmedas, suelos, desagües, vegetación, alimentos, baños, equipos médicos e incluso soluciones desinfectantes (2). Sin embargo su condición como oportunista la priva de causar infección más allá de pacientes inmunocomprometidos u hospitalizados por quemaduras, heridas abiertas o postoperados (2, 4), pero constituye un problema de salud debido a la alta tasa de resistencias antibióticas que presenta.

Desde el descubrimiento de la penicilina por Alexander Flemming en 1928 (9), la humanidad tiene un método eficaz para el control de las infecciones bacterianas, sin embargo conforme se han utilizado y abusado los fármacos antibióticos, han surgido cepas con resistencia a los mismos (2, 9). Esto ha llevado al desarrollo de

nuevos tipos de agentes quimioterápicos, insensibles a los mecanismos de resistencia bacteriana, pero de mayor costo económico. Nuestra condición como nación en vías de desarrollo, nos plantea un dilema socioeconómico: La población de escasos recursos no es capaz de costearse tratamientos antibióticos (10). Esto obliga a buscar alternativas en el tratamiento, que sean factibles, tanto desde el punto de vista económico como técnico, sin dejar de lado los aspectos culturales de la población guatemalteca. De tal manera que, aprovechándonos de nuestra ubicación tropical y nuestro bagaje cultural, resulta lógico avocarse a la fitoterapéutica, empero dicho enfoque se debe estandarizar desde el punto de vista científico para poder asegurar su eficacia (11). En Guatemala se han hecho investigaciones sobre la sensibilidad in vitro de varios microorganismos a extractos vegetales etanólicos, acetónicos, acuosos, metanólicos o aceites esenciales (1, 12 – 19), no obstante, dichos extractos tienen la desventaja de presentar residuos de disolventes e impurezas, a diferencia de los extractos supercríticos (21, 22). La utilización de extractos supercríticos por CO<sub>2</sub> en nuestro país ya se ha demostrado posible tanto económica como tecnológicamente (21, 22). Así mismo, el proceso de extracción supercrítica es más efectivo en cuanto a la obtención de compuestos orgánicos, ya que presenta un mejor rendimiento y menor tiempo de extracción que otros métodos (22).

Por lo que se plantea la siguiente pregunta: ¿Presentan actividad antibacteriana de los extractos supercríticos de ajo, chichipin, orégano y té de limón?, se probaron dichos extractos vegetales por medio del método de difusión en agar, demostrándose que el extracto supercrítico de orégano presenta actividad antibiótica in vitro contra *S. aureus*, *E. coli* y *H. pylori*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Describir mediante el método de difusión en agar la actividad antibacteriana de los extractos supercríticos de ajo, chichipin, orégano y té de limón.

### 2.2. Objetivos específicos

Comprobar:

2.2.1. La actividad antibacteriana de los extractos supercríticos de ajo, chichipin, orégano, y té de limón sobre el crecimiento in vitro de *Staphylococcus aureus*.

2.2.2. La actividad antibacteriana de los extractos supercríticos de ajo, chichipin, orégano, y té de limón sobre el crecimiento in vitro de *Helicobacter pylori*.

2.2.3. La actividad antibacteriana de los extractos supercríticos de ajo, chichipin, orégano, y té de limón sobre el crecimiento in vitro de *Escherichia coli*.

2.2.4. La actividad antibacteriana de los extractos supercríticos de ajo, chichipin, orégano, y té de limón sobre el crecimiento in vitro de *Pseudomonas aureginosa*.

2.2.5. Determinar cuál de los 4 extractos supercríticos presenta mayor actividad antibacteriana.



### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Definiciones:

##### 3.1.1. Fluidos supercríticos:

Tradicionalmente se conocen los tres estados clásicos de la materia: gas, sólido y líquido. Así como los distintos procesos físicos por los cuales la materia cambia de estado. Sin embargo, desde mediados del siglo XIX se conoce otra fase de la materia, el estado supercrítico. Este estado se obtiene al mantener una sustancia a una temperatura y presión por encima de su punto crítico (de lo que deriva el nombre, supercrítico). Los fluidos supercríticos ofrecen recursos para alcanzar propiedades propias de un gas y un líquido sin alterar la estructura química del compuesto con el que se trabaja. Esto es debido a que en un fluido sometido a estado supercrítico, la línea de separación de fases liquido-gas se interrumpe. Esto implica la formación de una sola fase en la que el fluido tiene características intermedias entre las de un gas y un líquido. Específicamente, las características supercríticas son una alta densidad (como la de los líquidos) y una gran difusividad (tal como los gases) (21, 22).

Figura 1. Diagrama de fases.

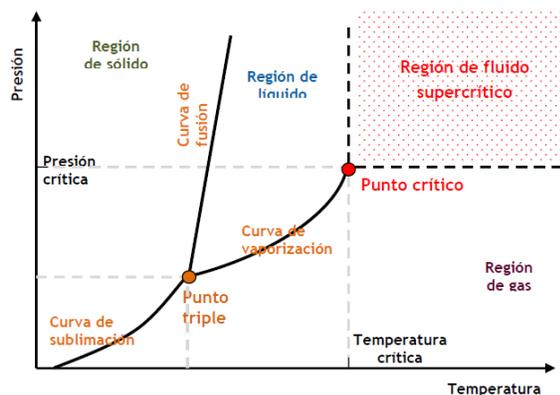


Fig. 1. Esquema representativo del diagrama de presión- temperatura de los estados de la materia, correspondiente a una sustancia pura.

Fuente: Extracción de metabolitos solubles en dióxido de carbono en condiciones supercríticas a partir de hojas deshidratadas de espinaca (*spinacea oleracea*) (21).

Al igual que los gases, los Fluidos supercríticos –FSC- poseen una densidad enormemente variable, en relación a su temperatura y presión, sin embargo a diferencia de los gases, alcanzan densidades muy cercanas a los de los líquidos. De modo que la principal característica de los FSC es el amplio rango de densidades que pueden presentar, en dependencia de las condiciones de temperatura y/o presión a los que estén sometidos (21, 22).

Dada la relación directa que existe entre la densidad de un fluido con su capacidad de actuar como solvente, los FSC son excelentes solventes a través de pequeñas variaciones en la presión y/o temperatura (22, 24).

El uso de fluidos supercríticos como solventes para la extracción de metabolitos orgánicos, ha recibido especial atención en los últimos años debido a su mayor eficiencia; menor tiempo de extracción y utilización de menor cantidad de materia prima. Los FSC más utilizados son: óxido nitroso ( $N_2O$ ), amoníaco ( $NH_3$ ), hexafloururo de azufre ( $SF_6$ ) y dióxido de carbono ( $CO_2$ ) (21, 22, 24).

Sin embargo, en su mayor parte se utiliza dióxido de carbono para extraer compuestos orgánicos, esto es debido a su nula toxicidad y bajo costo, además de presentar un punto crítico de temperatura y presión razonables ( $31.1^\circ C$  y  $7382kPa$ ). Asimismo el  $CO_2$  supercrítico tiene la habilidad de solvatar un gran rango de compuestos orgánicos no

polares y de baja polaridad, pero no es efectivo como solvente de compuestos polares, razón por la que se utiliza etanol al 95% como cosolvente. De modo que el extracto obtenido presenta todos los metabolitos orgánicos, tanto polares como no polares, de la muestra vegetal (21, 22, 24).

### **3.1.2. Procedimiento de extracción supercrítica:**

El proceso de extracción se lleva a cabo mediante un extractor supercrítico con CO<sub>2</sub>, el cual consta de un cilindro de dióxido de carbono, la celda de extracción (con su tapa y termómetro), dos manómetros (uno en la celda y otro en el tanque de CO<sub>2</sub>), 4 válvulas (1 de entrada, una de escape y dos de salida), un recipiente colector (probeta de vidrio) y una banda calefactora externa eléctrica (21, 22).

“El proceso típico de extracción consiste en un reactor en el que se introduce el substrato original y una cantidad de CO<sub>2</sub>. El sistema se presuriza y se calienta hasta alcanzar condiciones supercríticas, con lo que el CO<sub>2</sub> disuelve los compuestos a extraer. A continuación, se transfiere el fluido a otra cámara donde se despresuriza la mezcla, resultando la liberación del soluto y la eliminación del CO<sub>2</sub> como gas” (21).

### **3.1.3. Descripción del proceso:**

Se toma la muestra vegetal, se muele y se coloca en la celda de extracción. A continuación se agrega etanol al 95% y se cierra el sistema. Se eleva temperatura en el interior de la celda hasta 45°C utilizando el calefactor eléctrico externo, al alcanzar la temperatura, se presuriza el interior de la celda con CO<sub>2</sub> a 8,963kPa. Permanece el sistema bajo estas condiciones por una hora, luego de la cual se recupera

el extracto por las válvulas de salida en la parte inferior de la celda y se colecta en una probeta (21, 22).

#### **3.1.4. Método Bauer-Kirby**

El descubrimiento de la penicilina en 1928 por Alexander Flemming fue un hito en la práctica médica. Desde ese momento se empezó a desarrollar nuevos antibióticos y la comunidad científica llegó a pensar que erradicarían totalmente las enfermedades causadas por bacterias. Sin embargo esta idea ilusoria no duró; las especies bacterianas empezaron a desarrollar mecanismos de resistencia. Esto creó la necesidad de desarrollar un método por el cual se supiera de antemano la efectividad del tratamiento antibiótico. Por lo que se desarrollaron varios métodos para probar la susceptibilidad antimicrobiana. De tal manera que en 1956 Bauer, Kirby y colegas realizaron un exhaustivo trabajo de investigación en el cual compararon todos los métodos existentes, con el fin de estandarizar un método de susceptibilidad antimicrobiana. Este trabajo fue publicado por la Organización Mundial de la Salud en 1961 como el procedimiento estándar por medio de difusión en agar para probar la susceptibilidad antimicrobiana, por lo que es llamado Método de Bauer-Kirby (25, 26, 27).

El Método Bauer-Kirby consiste en:

1. Tomar 4 o 5 colonias de igual morfología del cultivo original de la cepa bacteriana con la que se desea trabajar.
2. Inocular un tubo con 4 ml de caldo tripticosa soya.

3. Incubar por 15 minutos a 36°C hasta que alcance una turbidez estándar 0.5 de McFarland lo cual equivale aproximadamente a 10<sup>8</sup> Unidades formadoras de colonia –UFC-.
4. Del caldo, se empapa un hisopo estéril, con el que se siembra la caja de Petri con agar Muller-Hinton en sentido horizontal, vertical y diagonal (en tres direcciones).
5. Se seca por 3 a 5 minutos y luego se colocan los discos de papel filtro previamente impregnados con el antibiótico que se desea probar.
6. Cultivar por 18 a 24 horas a 36°C y luego medir los diámetros de halos de inhibición en milímetros.
7. Para antibióticos ya conocidos, se compara el diámetro del halo de inhibición con las tablas del NCCLS (National Comitee for Clinical Laboratory Samples), para determinar si la cepa bacteriana en cuestión es sensible, resistente o presenta una sensibilidad intermedia al agente biocida probado (25, 26, 27, 28).

La manera como funciona el método es la siguiente:

Al colocar un disco de papel filtro de 6 mm impregnado con una concentración de antibiótico sobre el agar Muller-Hinton, inmediatamente, el papel absorbe agua desde el agar, esto a su vez facilita la difusión del antibiótico hacia el agar que rodea el disco. Sin embargo la tasa de difusión en el agar no es tan rápida como la tasa de extracción del antibiótico desde el papel filtro, de modo que la concentración del agente antibiótico es mayor en las cercanías del papel filtro. Otro factor que afecta el tamaño de los halos de inhibición es el hecho que la velocidad de difusión del agente antimicrobiano es dependiente de las propiedades de difusión y la solubilidad de la droga en agar Mueller-Hinton, así como el peso molecular del compuesto

antimicrobiano, ya que las moléculas pequeñas suelen difundir más rápido a través del agar (26).

### **3.1.5. Plantas utilizadas:**

#### **3.1.5.1. Ajo, nombre científico: *Allium sativum* L.**

Es una hierba perenne, forma un bulbo redondo compuesto de 8 a 15 bulbillos. Presenta un tallo cilíndrico de aproximadamente 50 cm de largo, escasas hojas y flores. Tiene importancia económica por ser ampliamente cultivado a nivel mundial, al igual que importancia en la historia culinaria y medicinal (14, 18, 19).

Se cree que es originario del Asia central, donde fue domesticado y posteriormente diseminado hasta el Asia menor, de donde tuvo contacto con las culturas antiguas y desde entonces se ha cultivado y usado, desde aproximadamente hace 5000 años. Llegó a América durante la colonización en el siglo XV, en Guatemala se cultiva principalmente en Huehuetenango y Sololá (14, 18, 19).

Históricamente se le han atribuido propiedades medicinales. En los papiros de Ebers se mencionan 800 formas terapéuticas del mismo, para tratar distintas afecciones. La Biblia de los cristianos hace referencia a su uso medicinal y el Talmud hebreo lo recomienda como antiinflamatorio. Hipócrates lo recomendaba como tratamiento para varias dolencias y enfermedades (14, 18, 19, 29).

Se ha estudiado su actividad antimicrobiana, sabiéndose que su tintura y decocción así como extractos etanólicos y acuosos tienen actividad anti bacterial (15, 17, 19, 20). El bulbo es rico en vitaminas (especialmente A, ácido ascórbico y tiamina), fosfolípidos, aminoácidos, glucosidos, minerales (Magnesio, selenio, cobre, cinc, germanio) y compuestos azufrados que le dan su olor característico (14, 18, 19).

#### **3.1.5.2. Chichipin, nombre científico: *Hamelia patens* Jacq.**

Es un arbusto herbáceo perenne que florece casi todo el año, midiendo de 1 a 3 metros de alto. Se considera una especie ruderal, crece arbitrariamente en espesuras, bosques secos, a la orilla de caminos y terrenos abandonados. Suele sembrarse para utilizarlo de forma ornamental en parques. Crece en casi toda América, desde el sur de México hasta Sur América e islas caribeñas. En Guatemala se halla en casi todo el país (18, 19).

Estudios antimicrobianos, realizados con extractos acuosos y etanólicos de las hojas, han demostrado actividad contra *S. aureus*, así mismo la tintura de las hojas ha demostrado tener actividad contra bacilos Gram negativos y *Candida albicans*. Las hojas contienen esteroides, saponósidos, taninos, triterpenos, flavonoides, ácido ursólico y alcaloides oxindólicos (18, 19). La tradición oral del área Chortí de Chiquimula, le atribuye propiedades antiinflamatorias y antibióticas.

#### **3.1.5.3. Orégano, Nombre científico: *Lippia graveolens* Kunth.**

Bajo el nombre de orégano se conocen más de 53 plantas, en Guatemala hay dos tipos distintos: *Origanum vulgare* y *Lippia*

*graveolens*. Para la realización del presente estudio se utilizó el segundo. Es una planta perene, de 20 a 30 cm de alto, ramificada en su parte superior, aromática y con cierto tinte rojizo (18, 19). Originaria de Mesoamérica y utilizada en la gastronomía como en la medicina tradicional. En Guatemala se cultiva principalmente en Chiquimula, Zacapa, El Progreso, Jutiapa, Jalapa e Izabal.

Estudios realizados demuestran que la tintura e infusión de las hojas tienen actividad antibacteriana de amplio espectro. Así mismo, el extracto etanólico es activo contra gran variedad de hongos. La medicina tradicional de nuestro país le atribuye propiedad antiséptica, calmante, cicatrizante, antiinflamatoria, diurética y expectorante, entre otras. En cuanto a su composición química, presenta flavonoides, ácido ursólico, taninos y minerales (18, 19).

**3.1.5.4. Té de limón, Nombre científico: *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.**

Es un pasto perenne de 1 a 2 metros de alto. Originario del subcontinente indio, crece en clima tropical húmedo y soleado. Ha sido cultivada en Asia y América con fines comerciales y medicinales. Fue introducida a Guatemala desde la India a finales del siglo XIX (18, 19).

Estudios realizados por Ohno, Kita, Yamaoka y colaboradores demostraron la actividad biocida que presenta el aceite esencial de té de limón contra *H. Pylori* (30). Otros estudios han demostrado actividad biocida del aceite esencial contra *S.*

*aureus*, *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Sin embargo no se ha demostrado que la tintura de las hojas tenga actividad alguna (18, 19). La medicina tradicional le atribuye propiedad astringente, diaforética, diuréticas, digestiva, hipotensora, entre otras. La composición química muestra flavonoides, mirceno, metil heptona, geraniol, citral y triterpenoides (19).

### **3.1.6. Bacterias utilizadas:**

#### **3.1.6.1. *Helicobacter pylori***

La bacteria se ha asociado a gastritis, úlceras pépticas, adenocarcinoma gástrico y linfomas de linfocitos B del tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (MALT) (2).

#### Fisiología y estructura

Las especies de *Helicobacter* se clasifican según el análisis de la secuencia del ARNr 16S de sus genes, la composición de sus ácidos grasos celulares y la presencia de flagelos polares. *Helicobacter* tiene forma de espiral o bacilar en los cultivos recientes (0,5-1um X 2-4um), pero adopta una morfología cocoide en los cultivos de mayor edad (2, 5).

Todos los microorganismos *Helicobacter*, incluido *H. pylori*, son muy móviles (movilidad en sacacorchos) gracias a los flagelos polares y producen gran cantidad de ureasa. Se cree que estas propiedades son importantes para la supervivencia en los ácidos gástricos y el movimiento rápido a través de la capa de moco viscoso hacia un entorno de pH neutro. La mayor parte de *Helicobacter* son positivos con catalasa y oxidasa y no fermentan

ni oxidan los carbohidratos, aunque pueden metabolizar los aminoácidos por vías de fermentación. En la membrana externa se encuentran lipopolisacáridos (LPS), que incluyen un lípido A, un oligosacárido central y una cadena lateral O. El lípido A de *H. pylori* muestra una baja actividad de endotoxina en comparación con otras bacterias gram negativas y la cadena lateral O se parece a nivel antigénico a los antígenos del grupo Lewis en la sangre, que puede proteger a las bacterias de la eliminación inmunitaria. El crecimiento de *H. pylori* y de otros *Helicobacter* necesita un medio complejo complementado con sangre, suero, carbón, almidón o yema de huevo, condiciones microaerófilas (oxígeno bajo y dióxido de carbono aumentado) y un intervalo de temperatura de 30-37 °C. Como resulta relativamente difícil aislar *Helicobacter* en cultivo e identificarlos mediante pruebas bioquímicas, la mayor parte de las enfermedades provocadas por *H. pylori* se confirman con técnicas distintas del cultivo (2).

#### Patogenia e inmunidad

*H. pylori* es una bacteria notable por su capacidad de colonizar de por vida el estómago de las personas no tratadas. Múltiples factores contribuyen a la colonización gástrica, inflamación, alteración de la producción de ácido gástrico y la destrucción tisular características de la enfermedad por *H. pylori*. La colonización inicial se facilita por: 1) bloqueo de la producción de ácido gracias a la proteína inhibidora del ácido de la bacteria, y 2) neutralización de los ácidos gástricos por el amoníaco generado mediante la actividad ureasa de la bacteria.

Los *Helicobacter* con capacidad de movimiento activo pueden adherirse a las células epiteliales gástricas atravesar el moco gástrico y adherirse a las células epiteliales gástricas gracias a múltiples proteínas de adhesión a la superficie. Las proteínas de superficie se pueden unir también a proteínas del anfitrión y esto ayuda a las bacterias a evitar la detección inmunitaria. Las lesiones tisulares localizadas vienen mediadas por los productos generados por la ureasa, mucinasa, fosfolipasas y la actividad de la citotoxina vacuolizante A (VacA), una proteína que tras sufrir endocitosis por las células epiteliales, causa lesiones en las células mediante la formación de vacuolas. Otro factor de virulencia importante de *H. pylori* es el gen asociado a la citotoxina (cagA), la cual interfiere con la estructura de citoesqueleto normal de las células epiteliales. También produce PAI (fosforribosilantranilinato isomerasa) que induce la producción de interleucina 8 (IL-8) que atrae a los neutrófilos. Se piensa que la liberación de proteasas y moléculas reactivas del oxígeno por los neutrófilos contribuye a la gastritis y las úlceras gástricas (2, 5).

### Epidemiología

Desde 1984, año en que se aisló por primera vez este microorganismo en cultivo, se ha recogido una gran cantidad de información acerca de la prevalencia de *H. pylori*. La tasa más alta de portadores se encuentra en los países en vías de desarrollo, donde el 70 al 90% de la población está colonizada antes de los 10 años. Estudios han demostrado que del 70 al 100% de los pacientes con gastritis, úlceras gástricas y úlceras

duodenales está infectado por *H. pylori*. El ser humano constituye el principal reservorio de *H. pylori*, y se piensa que la colonización persiste durante toda la vida salvo que el anfitrión reciba un tratamiento específico. Posiblemente la transmisión se produzca por vía fecal-oral (5).

Este microorganismo se asocia claramente a enfermedades como la gastritis, las úlceras gástricas, el adenocarcinoma gástrico y los linfomas gástricos MALT. La colonización por *H. pylori* parece conferir protección frente a la enfermedad producida por el reflujo gastroesofágico y los adenocarcinomas de la región distal del esófago y del cardias gástrico. Por tanto, no parece conveniente eliminar *H. pylori* a en los pacientes sin enfermedad sintomática (5).

#### Enfermedades clínicas

La colonización por *H. pylori* determina de forma invariable datos histológicos de gastritis (es decir, infiltración por neutrófilos y células mononucleares en la mucosa gástrica). La fase aguda de la gastritis se caracteriza por una sensación de plenitud, náuseas, vómitos e hipoclorhidria. Esto puede evolucionar a una gastritis crónica, en la que la enfermedad se limita al antro gástrico (donde existen menos células parietales secretoras de ácido) en pacientes con una secreción de ácido normal o afecta a todo el estómago (pangastritis) cuando se suprime la secreción ácida. Un 10%- 15% de los pacientes con gastritis crónica desarrollan úlceras pépticas. Las úlceras se suelen localizar en focos con inflamación intensa, especialmente

en la unión entre el cuerpo y el antro (ulcera gástrica) o la parte proximal del duodeno (ulcera duodenal). *H. pylori* también origina hasta el 85% de las úlceras gástricas y más del 95% de las úlceras duodenales (2).

La gastritis crónica acaba sustituyendo la mucosa gástrica normal por fibrosis con proliferación de un epitelio de tipo intestinal. Este proceso aumenta el riesgo de sufrir un carcinoma gástrico casi 100 veces (2).

Las infecciones por *H. pylori* se asocian también a infiltración por tejido linfoide de la mucosa gástrica. En un número de pacientes muy pequeño, se puede producir una población monoclonal de linfocitos B que evolucionan a un linfoma MALT (5).

## Diagnóstico de laboratorio

### Microscopia

Se detecta en un examen histológico de las biopsias gástricas. Aunque el microorganismo se puede visualizar con facilidad en las muestras teñidas con hematoxilina-eosina o Gram, la tinción de plata de Warthin-Starry es el método de tinción más sensible (2, 5).

### Detección de antígenos

Es posible estudiar en la muestra de biopsia si existe actividad de la ureasa. La abundancia de ureasa producida por *H. pylori* permite la detección de su metabolito alcalino en menos de 2 horas. La sensibilidad de la prueba directa con muestras de

biopsia oscila entre el 75% y el 95%; sin embargo, la especificidad se aproxima al 100%. De forma que una reacción positiva es un dato altamente sugestivo de infección activa. La prueba no invasiva de la ureasa realizada en el aliento humano tras el consumo de una solución de urea marcada con un isótopo muestra una sensibilidad y especificidad excelentes (2).

Se han desarrollado una serie de inmunoensayos mono y policlonales para la identificación de antígenos de *H. pylori* en las heces, cuya sensibilidad y especificidad superan el 95%. Estas pruebas son sencillas, baratas y se pueden aplicar en muestras de heces en lugar de biopsias (2).

### Cultivo

*H. pylori* se adhiere a la mucosa gástrica y no se recupera de las heces o la sangre. Es posible aislar la bacteria en cultivo si se inoculara la muestra en un medio de cultivo enriquecido suplementado con sangre, hemina o carbono y se incubaba en una atmósfera microaerófila durante hasta 2 semanas. Sin embargo el diagnóstico de infección por *H. pylori* se suele realizar con métodos no invasivos y el cultivo se reserva para las pruebas de susceptibilidad a antibióticos (5).

### Tratamiento

El máximo éxito en el tratamiento curativo de la gastritis o la úlcera péptica se ha conseguido mediante la combinación de un inhibidor de la bomba de protones (ej. omeprazol), un macrólido (ej. claritromicina) y un beta lactámico (ej.

amoxicilina) que se deben administrar durante 7-10 días inicialmente. El fracaso del tratamiento se suele deber a la resistencia frente a claritromicina. Es posible emplear metronidazol en el tratamiento combinado, pero las resistencias son frecuentes (2).

### 3.1.6.2. *Pseudomonas aureginosa*

Los miembros de este género son ubicuos y se encuentran en el suelo en los compuestos orgánicos en descomposición, en la vegetación y en el agua. Por desgracia, se encuentran en todo el ambiente hospitalario, en reservorios húmedos como los alimentos, las flores cortadas, los lavabos, los baños, las mopas para fregar los suelos, los equipos de diálisis y terapia respiratoria e incluso en las soluciones desinfectantes, es raro que las personas sean portadoras dentro de la flora microbiana normal, salvo en los pacientes hospitalizados y en anfitriones inmunodeprimidos ambulatorios (2, 5).

El amplio entorno en el que se distribuye *Pseudomonas* se explica por sus sencillas exigencias para crecer y versatilidad nutricional. Pueden emplear muchos compuestos orgánicos como fuente de carbono y nitrógeno, y algunas cepas consiguen incluso crecer en agua destilada empleando oligonutrientes. Estos microorganismos tienen también muchos factores estructurales, toxinas y enzimas que potencian su virulencia y los hacen resistentes a la mayor parte de los antibióticos de uso habitual (2).

Fisiología y estructura

La especie *Pseudomonas* suele incluir bacilos gramnegativos rectos o ligeramente curvados en general móviles (0.5-1 X 1.5-5 um), que se disponen típicamente en parejas. Los microorganismos emplean los carbohidratos mediante la respiración aerobia de forma que el oxígeno es el aceptor terminal de los electrones. Aunque se describen como aerobios obligados, pueden crecer de forma anaerobia utilizando nitratos o arginina como aceptor alternativo para los electrones. Algunas especies producen pigmentos difundibles, pioverdina y piorrubina, que explica su aspecto característico en cultivo (5).

#### Patogenia e inmunidad

*P. aureginosa* cuenta con muchos factores de virulencia incluidos componentes estructurales, toxinas y enzimas. Además, el sistema de transmisión utilizado por *Pseudomonas*, el sistema de secreción tipo III, resulta especialmente eficaz para la inyección de toxinas dentro de la célula anfitriona (2).

#### Adhesinas

La adherencia a las células anfitrionas resulta esencial para ocasionar la infección. Al menos cuatro componentes estructurales en la superficie de *P. aureginosa* facilitan esta adherencia: 1) Flagelos; 2) Pili; 3) lipopolisacáridos (LPS), y 4) alginato. Los flagelos y los pili también influyen sobre la movilidad de *P. aureginosa* y en componente de lípido A de los LPS es responsable de la actividad de la endotoxina. Alginato es un exopolisacárido mucoide que forma una capsula prominente

sobre la superficie bacteriana y protege al microorganismo de la fagocitosis y la actividad de los antibióticos (2, 5).

#### Toxinas secretadas y enzimas

Se cree que la exotoxina A (ETA) es uno de los factores de virulencia más importantes producidos por las cepas patógenas de *P. aureginosa*. Esta toxina altera la síntesis de proteínas al inhibir la elongación de la cadena peptídica en las células eucariotas. La exotoxina A probablemente participe en la dermatonecrosis que tiene lugar en las quemaduras, el daño corneal en las infecciones oculares y el daño tisular en las infecciones pulmonares crónicas. La toxina posee actividad inmunodepresora (2).

Un pigmento azul, piocianina, producido por *P. aureginosa*, cataliza la producción de superóxido y peróxido de hidrogeno, las formas tóxicas del oxígeno. Este pigmento estimula también la liberación de interleucina 8 (IL8), lo que potencia la atracción de los neutrófilos. Un pigmento verde-amarillento, pioverdina es un sideróforo, que se liga al hierro para usarlo en el metabolismo. Este pigmento regula también la secreción de otros factores de virulencia, incluida la exotoxina A (5).

Dos enzimas, "las A" (serina proteasa) y "las B" (metaloproteasa de zinc), actúan de manera sinérgica para degradar la elastina, lo que ocasiona daños en los tejidos que contienen elastina y el parénquima pulmonar, así como lesiones hemorrágicas (ectima gangrenoso) que se asocian a las infecciones diseminadas por *P. aureginosa*. Estas enzimas

degradan también los componentes del complemento e inhiben la quimiotaxis y la función de los neutrófilos, lo que provoca una mayor diseminación y daño tisular en las infecciones agudas. Las infecciones crónicas por *Pseudomonas* se caracterizan por la formación de anticuerpos frente a “las A” y “las B”, con acumulación de los inmunocomplejos en los tejidos infectados (2).

Al igual que las elastasas, la proteasa alcalina participa en la destrucción tisular y en la diseminación de *P. aureginosa*. También interfiere en la respuesta inmunitaria del organismo anfitrión. La fosfolipasa C es una hemolisina termolábil que degrada los lípidos y la lecitina, de modo que facilita la destrucción tisular (23).

Las exoenzimas S y T son toxinas extracelulares producidas por *P. aureginosa*. Poseen una actividad ribosiltransferasa de difosfato de adenosina, cuya función no está clara. Sin embargo, cuando las proteínas son introducidas en sus células eucariotas diana por el sistema de secreción de tipo III, se produce un daño en las células epiteliales que facilita la diseminación de las bacterias, la invasión tisular y la necrosis. Esta citotoxicidad esta mediada por una reorganización de la actina (2).

#### Resistencia a antibióticos

*P. aureginosa* posee una resistencia inherente a muchos antibióticos y puede mutar a cepas aún más resistentes durante el tratamiento. Aunque se han identificado numerosos mecanismos de resistencia, la mutación de las porinas

constituye el principal mecanismo de resistencia. La penetración de los antibióticos en la célula pseudomónica tiene lugar principalmente a través de los poros de la membrana externa. La alteración de las proteínas que configuran la pared de estos poros con el fin de restringir el flujo al interior de la célula conlleva la aparición de resistencia a numerosos grupos de antibióticos de manera simultánea. *P. aureginosa* sintetiza, asimismo, diferentes B-lactamasas (2, 5).

### Epidemiología

Las *Pseudomonas* son patógenos oportunistas presentes en una gran variedad de ambientes. La capacidad para aislar a estos microorganismos de las superficies húmedas puede verse limitada solamente por los esfuerzos para detectar los microorganismos. *Pseudomonas* tienen unos requerimientos nutricionales mínimos, pueden tolerar un amplio intervalo de temperaturas (4-42°C) y son resistentes a muchos antibióticos y desinfectantes. De hecho, la recuperación de *Pseudomonas* a partir del ambiente tiene un escaso significado a no ser que existan indicios epidemiológicos de que el lugar contaminado sea un reservorio de la infección (5).

Además, el aislamiento de *Pseudomonas* en un paciente hospitalizado constituye un motivo de preocupación, pero normalmente no justifica la intervención terapéutica a no ser que existan indicios de enfermedad. La recuperación de *Pseudomonas*, particularmente de especies diferentes a *P. aureginosa*, a partir de una muestra clínica puede representar

una mera colonización del paciente o bien suponer una contaminación ambiental de la muestra durante su obtención o procesamiento en el laboratorio (5).

## Enfermedades Clínicas

### Infecciones pulmonares

Las infecciones de las vías respiratorias inferiores por *P. aeruginosa* pueden variar en gravedad desde una colonización asintomática o una traqueo bronquitis benigna hasta una bronconeumonía necrosante grave. La colonización se da en pacientes con fibrosis quística, los aquejados de otras enfermedades pulmonares crónicas, y en neutropénicos. Las infecciones en los primeros se han asociado a la exacerbación de la entidad de base, así como con procesos pulmonares invasivos. Las cepas mucoides son las que suelen aislar en las muestras de estos pacientes, y son difíciles de erradicar con tratamiento antibiótico (2).

Las circunstancias que predisponen a los pacientes inmunodeprimidos a contraer infecciones por *Pseudomonas* son: 1) el tratamiento previo con antibióticos de amplio espectro que alteran la población bacteriana protectora normal, y 2) el uso de respiradores, que pueden introducir el microorganismo en las vías respiratorias inferiores. La enfermedad invasiva en esta población se caracteriza por una bronconeumonía bilateral difusa con la formación de micro abscesos y la necrosis de los tejidos. La tasa de mortalidad es tan elevada como el 70% (2).

### Infecciones cutáneas primarias

*P. aureginosa* puede producir varias infecciones cutáneas. Las infecciones mejor conocidas son las infecciones de las quemaduras. La colonización de una quemadura, seguida de un daño vascular localizado, necrosis tisular y finalmente bacteriemia, es frecuente en los pacientes con quemaduras graves. La superficie húmeda de la quemadura y la falta de respuesta de los neutrófilos a la invasión tisular predisponen a los pacientes a adquirir estas infecciones (2).

### Infecciones del aparato urinario

La infección del aparato urinario aparece principalmente en los pacientes con sondas urinarias de larga duración (2).

### Infecciones del oído

Con frecuencia, la otitis externa se debe a la infección por *P. aureginosa*, siendo la natación un importante factor de riesgo (oído de nadador). Se asocia también a la otitis media crónica (2).

### Infecciones oculares

Las infecciones oculares tienen lugar con posterioridad a un traumatismo inicial en la córnea y la posterior exposición a *P. aureginosa* en el agua contaminada. Se producen úlceras corneales que pueden progresar a una enfermedad con riesgo de pérdida del ojo a no ser que se instaure un tratamiento precoz (2).

## Bacteriemia y endocarditis

La bacteriemia por *P. aureginosa* es clínicamente indistinguible de la que producen otras bacterias gram negativas. Sin embargo, la tasa de mortalidad de los pacientes afectados es mayor debido a lo siguiente: 1) la predilección de este microorganismo por los pacientes inmunodeprimidos, y 2) la virulencia inherente de *Pseudomonas aureginosa* (2).

## Diagnóstico de laboratorio

### Microscopia

La observación de bacilos gramnegativos delgados dispuestos sueltos o formando parejas sugiere *Pseudomonas* aunque no es patognomónica (5).

### Cultivo

Dado que *Pseudomonas* tiene exigencias nutricionales muy sencillas, es fácil recuperar esta bacteria en medios de aislamiento frecuentes, como agar sangre o agar MacConkey. Necesitan incubación aerobia (5).

La morfología de las colonias y los resultados de una selección de pruebas bioquímicas rápidas bastan para la identificación preliminar de las cepas. *P. aureginosa* crece rápidamente y forma colonias planas con bordes que se van extendiendo, B-hemolisis, una pigmentación verde relacionada con la producción de los pigmentos azul y amarillo verdoso y un olor dulce característico semejante al de las uvas (2).

## Tratamiento, prevención y control

El tratamiento antimicrobiano de las infecciones por *Pseudomonas* es frustrante, debido a los siguientes motivos: 1) las bacterias suelen presentar resistencia a la mayoría de los antibióticos, y 2) el paciente infectado, con las defensas alteradas es incapaz de potenciar la actividad antibiótica (2). Se necesita generalmente una combinación de antibióticos activos para el éxito en el tratamiento de los pacientes con infecciones graves (9).

### 3.1.6.3. *Escherichia coli*

Es el miembro más frecuente e importante del género *Escherichia*. Este microorganismo se asocia a múltiples enfermedades, incluida la gastroenteritis e infecciones extra intestinales, como las infecciones del tracto urinario –ITU-, meningitis y sepsis. Multitud de cepas son capaces de producir enfermedad y algunos serotipos se asocian a una mayor virulencia (p. ej. *E. Coli* 0157 es la causa más frecuente de colitis hemorrágica) (2).

#### Epidemiología

En el tubo digestivo existen grandes cantidades de *E. coli*. Aunque estos microorganismos pueden comportarse como patógenos oportunistas cuando los intestinos se perforan y las bacterias acceden a la cavidad peritoneal, la mayor parte de *E. coli* que causan enfermedad digestiva y extra intestinal lo hacen porque han adquirido factores de virulencia secundarios codificados en plásmidos, islotes de patogenicidad o en ADN de

bacteriófagos. La eficacia de *E. coli* como patógeno se ilustra por el hecho de que estas bacterias son: 1) los bacilos gramnegativos que con más frecuencia se aíslan de pacientes con sepsis; 2) responsables de más del 80% de las ITU adquiridas en la comunidad y del mismo número de las infecciones hospitalarias, y 3) una causa destacada de gastroenteritis en los países en vías de desarrollo. La mayor parte de las infecciones son endógenas, de forma que *E. coli* de la propia flora microbiana normal del paciente consigue ocasionar infección cuando sus defensas se alteran (2, 5).

## Enfermedades Clínicas

### Gastroenteritis

Las cepas de *E. coli* que provocan gastroenteritis se subdividen en los cinco principales grupos siguientes *E. coli*: enteropatógena, enterotoxígena, enterohemorrágica, enteroinvasiva y enteroagregativa. Los tres primeros grupos ocasionan principalmente una diarrea secretora que afecta al intestino, mientras que los dos últimos afectan sobre todo al intestino grueso (5).

### *E. coli* enterotoxígena

La enfermedad causada por *E. coli* enterotoxígena se produce principalmente en los países en vías de desarrollo (se calculan unos 650 millones de casos anuales), aunque se estiman unos 80,000 casos cada año en viajeros procedentes de EE.UU. y la enfermedad es endémica en las poblaciones nativas americanas.

Las infecciones son más frecuentes en niños pequeños de países en vías de desarrollo o en viajeros a estas regiones. El inoculo de la enfermedad es alto, de forma que las infecciones se adquieren fundamentalmente por el consumo de aguas o alimentos contaminados por heces. La transmisión persona a persona es imposible. La diarrea secretora causada se produce tras un periodo de incubación de 1-2 días y persiste durante un promedio de 3-5 días. Los síntomas (diarrea acuosa con dolores tipo cólico abdominal, siendo menos frecuentes las náuseas y los vómitos) se parecen a los descritos en el cólera, aunque suelen ser más leves, especialmente en adultos. No se observan cambios histológicos ni inflamación en la mucosa intestinal (2, 5).

Sintetiza dos clases de enterotoxinas: toxinas termolábiles (LT-1, LT-II) y toxinas termoestables (STa y STb). Mientras que la LT-II no se asocia a enfermedad en el ser humano, LT-I es funcional y estructuralmente semejante a la toxina del cólera y se asocia a enfermedad en el ser humano. Esta toxina está formada por una subunidad A y por cinco subunidades B idénticas. La subunidades B se unen al mismo receptor que la toxina del cólera, así como a otras glicoproteínas de superficie en las células epiteliales del intestino delgado (2).

Después de la endocitosis, la subunidad A de LT-I se transloca por la membrana de la vacuola. La subunidad A tiene actividad difosfato de adenosina-ribosiltransferasa e interacciona con una proteína de membrana que regula la adenil ciclasa. El resultado neto es el aumento de las concentraciones de monofosfato de

adenosina cíclico (AMPC) con un incremento de la secreción de cloro y disminución de la absorción de cloro y de sodio, que se manifiestan con diarrea acuosa. La exposición a la toxina estimula también la secreción de prostaglandinas y la producción de citocinas inflamatorias, lo que da lugar a una mayor pérdida de líquidos (2).

STa, se asocia a la enfermedad en el ser humano, es una toxina pequeña y monomérica que se une al receptor transmembrana de la guanilto ciclasa, lo que provoca un aumento de las concentraciones de guanosina monofosfato ciclico (GMPC) y la posterior hipersecreción de líquidos. Los genes de LT.I y STa se encuentran en un plasmido transferible, que puede portar también los genes de las adhesinas (CFA/I, CFA/II, CFAIII). Los factores de colonización son fimbrias que reconocen unos receptores glucoproteicos específicos de la célula anfitriona. La aparición de enfermedad requiere la actuación de la toxina y los factores de colonización. La enfermedad causada por la toxina termoestable es indistinguible de la asociada a la toxina termolábil (2).

#### **3.1.6.4. *Staphylococcus aureus***

Los cocos grampositivos son un grupo heterogéneo de bacterias. Las características que tienen en común son su forma esférica, su reacción a la tinción de Gram y la ausencia de endoesporas. La presencia o ausencia de actividad catalasa es una prueba sencilla que se utiliza para subdividirlos en varios géneros. Las catalasas son enzimas que catabolizan peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno gaseoso. Cuando se pone en contacto una gota

de solución de peróxido de hidrogeno con una colonia productora de catalasa, aparecen burbujas a medida que se forma oxígeno gaseoso (2, 5).

El nombre del género *Staphylococcus* se refiere a que las células de estos cocos se desarrollan en un patrón que recuerda a un racimo de uvas; sin embargo, los microorganismos presentes en muestras clínicas aparecen como células aisladas, en pares o en cadenas cortas. La mayor parte de los estafilococos tiene un diámetro de entre 0,5 y 1  $\mu\text{m}$  y son anaerobios facultativos inmóviles capaces de crecer en un medio con una elevada concentración de sal y a temperaturas de 18-40 °C, estas bacterias están presentes en la piel y las mucosas del ser humano (2, 5).

Las especies que se asocian con mayor frecuencia a enfermedad en el ser humano son *S. aureus*. Las colonias de *S. aureus* son doradas como consecuencia de los pigmentos carotenoides que se forman durante su crecimiento y que le dan el nombre a la especie. Es la única especie presente en las personas que produce la enzima coagulasa (2, 5).

#### Fisiología y estructura

##### Capsula y capa de polisacárido

La capa más externa de la pared celular estafilocócica se puede recubrir de una capsula de polisacárido. Se han identificado once serotipos capsulares de *S. aureus*. Los serotipos 1 y 2 se asocian a capsulas muy gruesas y colonias de aspecto mucoso,

pero es raro que produzcan enfermedad en las personas. Por el contrario, los serotipos 5 y 7 son responsables de la mayor parte de las infecciones humanas. La capsula protege a las bacterias al inhibir la fagocitosis de estos microorganismos. La mayor parte de los estafilococos producen una biopelícula hidrosoluble laxa (capa de polisacárido extracelular) formada por monosacáridos, proteínas y pequeños péptidos en una cantidad que depende de factores genéticos y de las condiciones de crecimiento. Esta sustancia extracelular une las bacterias a tejidos y cuerpos extraños, como catéteres, injertos, prótesis valvulares y articulares (2).

#### Peptidoglucano y enzimas asociadas

El peptidoglucano representa la mitad de la pared celular en peso, característica que comparten todas las bacterias gram positivas. El peptidoglucano está formado por capas de cadenas de glucanos construidas con 10 o 12 subunidades alternantes de ácido N-acetilmurámico y N- acetilglucosamina. Las cadenas laterales de oligopeptidos están unidas a las subunidades de ácido N-acetilmuramico y se entrecruzan por medio de puentes peptídicos. La capa de Peptidoglucano se compone de numerosas capas entrecruzadas, lo que confiere una mayor rigidez a la pared celular. Las enzimas que catalizan la construcción de la capa de peptidoglucano se llaman proteínas ligadoras de penicilina y son dianas para antibióticos betalactámicos (2).

#### Ácidos teicoicos

Constituyen un componente de la pared celular, en el que representan entre un 30% y un 50% de su peso seco. Los ácidos teicoicos son polímeros fosfatados específicos de especie que se unen de manera covalente a residuos de ácido N-acetilmurámico de la capa de Peptidoglucano o a través de una unión lipofílica a la membrana citoplásmica (ácidos lipoteicoicos) (2).

#### Proteína A

La superficie de la mayoría de las cepas de *S. aureus* está recubierta de proteína A. esta proteína se une a la capa de peptidoglucano o a la membrana citoplásmica y tiene afinidad de unión especial el receptor Fc de las inmunoglobulinas IgG1, IgG2, IgG4. La detección de la proteína A puede utilizarse en pruebas de identificación específicas de *S. aureus* (2).

#### Coagulasa

La superficie externa de la mayoría de las cepas de *S. aureus* contiene un factor de agregación. Esta proteína constituye un destacado factor de virulencia. Se une al fibrinógeno y lo convierte en fibrina insoluble, lo que hace que los estafilococos se agreguen o formen grupos. La detección de esta proteína constituye la prueba de identificación principal de *S. aureus* (2).

#### Epidemiología

Los estafilococos son ubicuos y sensibles a las temperaturas elevadas, así como a los desinfectantes y las soluciones antisépticas, pueden sobrevivir en las superficies secas durante

periodos de tiempo prolongados. Estas bacterias se pueden transferir a una persona vulnerable por contacto directo o a través de fómites (5).

#### Enfermedades clínicas

*S. aureus* causa enfermedad mediante la producción de toxina o a través de la invasión directa y la destrucción del tejido. Las manifestaciones clínicas de algunas enfermedades estafilocócicas se deben casi exclusivamente a la actividad de la toxina, mientras que otras afecciones son consecuencia de la proliferación de los microorganismos, la cual da lugar a la formación de abscesos y la destrucción tisular. La producción de enfermedad en presencia de un cuerpo extraño requiere un número significativamente menor de estafilococos (2, 5).

#### Síndrome de piel escaldada por estafilococos

Se caracteriza por el inicio brusco de un eritema peribucal localizado que se extiende por todo el organismo a lo largo de los 2 días siguientes. Una ligera presión desprende la piel (signo de Nikolsky positivo), y poco después se forman grandes ampollas o vesículas cutáneas que se siguen de descamación epitelial. Las ampollas contienen un líquido claro, pero no microorganismos ni leucocitos (2).

#### Impétigo ampolloso

Es una forma localizada de síndrome de piel escaldada por estafilococos. Las cepas específicas de *S. aureus* productoras de toxina se asocian a la formación de ampollas cutáneas

superficiales. Los pacientes aquejados de impétigo ampolloso muestran ampollas localizadas que arrojan resultados positivos en los cultivos. El eritema no se extiende más allá de los límites de la ampolla y no está presente el signo de Nikolsky. La enfermedad se da principalmente en lactantes y niños pequeños y se transmite con facilidad (2).

#### Intoxicación alimentaria por estafilococos

Una de las enfermedades más frecuentes transmitidas por los alimentos representa una intoxicación en mayor medida que una infección. La enfermedad se debe a la acción de una toxina bacteriana presente en los alimentos más que al efecto directo del microorganismo en el paciente. Los alimentos que se contaminan con mayor frecuencia son las carnes elaboradas, como el jamón y el cerdo curados con sal, los bollos rellenos de crema, la ensalada de patatas y los helados (2).

#### Síndrome del shock toxico

Esta enfermedad se inicia con el crecimiento localizado de cepas de *S. aureus* productoras de la toxina en la vagina o herida, seguida de la liberación de la toxina en la sangre. Las manifestaciones clínicas aparecen de forma brusca y consisten en fiebre, hipotensión y exantema eritematoso macular difuso. Se observa una afectación multiorgánica (nervioso central, digestivo, hematológico, hepático, muscular y renal) y toda la piel se descama, incluyendo las palmas y las plantas (2, 5).

#### Infecciones cutáneas

Dentro de las infecciones estafilocócicas piógenas localizadas figuran el impétigo, la foliculitis, los forúnculos y el carbunco (5).

#### Bacteriemia

Es una causa frecuente de bacteriemia. Aunque las bacteriemias producidas por la mayor parte de los microorganismos tienen su origen en un foco identificable de infección, como una infección pulmonar, del aparato genitourinario o el aparato digestivo, no se conocen los focos iniciales de la infección en aproximadamente un tercio de los pacientes afectados (2).

#### Endocarditis

Endocarditis aguda producida por *S. aureus* constituye una enfermedad grave con una tasa de mortalidad de aproximadamente el 50%. Aunque los pacientes aquejados de endocarditis por *S. aureus* pueden mostrar inicialmente síntomas inespecíficos de tipo gripal, su situación se puede deteriorar rápidamente con alteración del gasto cardiaco e indicios de embolizaciones sépticas periféricas (2).

Otras de las enfermedades que puede causar son neumonía, empiema, osteomielitis y artritis séptica (2).

#### Diagnóstico de laboratorio

##### Microscopia

Los estafilococos son cocos gram positivos que forman racimos cuando crecen en un medio de agar, pero que generalmente se

observan en las muestras clínicas en forma de células únicas o en pequeños grupos de microorganismos (2).

### Cultivo

Las muestras clínicas se deben inocular en medios de agar enriquecidas complementados con sangre de carnero. Los estafilococos crecen rápidamente en los medios no selectivos tanto aerobia como anaerobiamente, y se pueden apreciar colonias lisas de gran tamaño en el plazo de 24 horas. Las colonias de *S. aureus* adquieren gradualmente una coloración dorada, en especial cuando los cultivos se incuban a temperatura ambiente. Casi todas las cepas de *S. aureus* y algunas cepas de estafilococos coagulasa- negativos producen hemólisis en el agar sangre de carnero. La hemólisis se debe sobre todo a citotoxinas, fundamentalmente la toxina alfa. Cuando la muestra contiene una mezcla de varios microorganismos, se puede aislar de forma selectiva *S. aureus* en un agar manitol- sal complementado con cloruro sódico al 7,5 % y de manitol (2, 5).

### **3.1.7. Antibióticos convencionales utilizados:**

#### **3.1.7.1 Ciprofloxacina**

Es una quinolona, derivada del ácido nalidíxico, el cual se obtuvo en forma de producto intermedio de la síntesis de la cloroquina (9).

Los antibióticos de tipo quinolona se dirigen hacia la girasa de ADN y a la topoisomerasa IV bacterianas. Para muchas

bacterias como *S. aureus*, la topoisomerasa IV es la actividad primaria inhibida por las quinolonas. En cambio para muchas bacterias gramnegativas como *E. coli*, la girasa de ADN es el blanco primario de la quinolona. Las cadenas individuales de la doble hélice del ADN deben de estar separadas para que haya replica o transcripción del ácido ribonucleico. Sin embargo, todo lo que los separe ocasiona un “desenrollado” o un “superenrollado” positivo excesivo del ADN, ante el punto de la separación. Para eliminar este obstáculo mecánico, la enzima bacteriana girasa de ADN es la encargada de la introducción continua de “superespiras” negativas en el ADN; se trata de una reacción que depende del trifosfato de adenosina (ATP) y requiere el corte de ambos cordones de ADN para que pase el segmento de este a través del espacio así creado; una vez terminado el paso, se sellan de nuevo las espiras de los cordones (9).

La girasa de ADN de *E. coli* está compuesta de dos unidades  $\alpha$  de 105 000 daltones y otras dos subunidades  $\beta$  de 95 000 daltones codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*, respectivamente. Las subunidades  $\alpha$  que se transportan la función de “recorte del cordón” de la girasa son el sitio de acción de las quinolonas. Los fármacos inhiben el “superenrollamiento” de ADN mediado por la girasa en concentraciones que guardan relación evidente con las necesarias para inhibir la proliferación bacteriana (0.1 a 10 $\mu$ g/ml). Las mutaciones del gen que codifica el polipéptido de la subunidad  $\alpha$  confieren resistencia a dichos medicamentos (9).

### 3.1.7.2. Vancomicina

Es un glucopéptido tricíclico complejo e infrecuente; producido por *Streptococcus orientalis*. Es activa fundamentalmente contra bacterias gram positivas, se considera que las cepas son sensibles a una concentración inhibitoria mínima menor o igual a 4 µg/ml. *S. aureus* y *staphylococcus epidermidis*, incluso cepas resistentes a la meticilina, suelen inhibirse con cifras de 1 a 4 µg/ml. *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus viridans* son muy sensibles a la vancomicina (9).

#### Mecanismo de acción

La vancomicina inhibe la síntesis de la pared celular en bacterias sensibles al unirse con las terminaciones D-alanil-D-alanina de alta afinidad de las unidades precursoras parietales. El fármaco posee efecto bactericida en microorganismos en fase de división (9).

*S. aureus* y el estafilococo coagulasa negativo expresan en ocasiones una sensibilidad reducida o intermedia a la vancomicina o bien una gran resistencia. La resistencia intermedia se acompaña de un fenotipo heterogéneo donde una pequeña proporción de las células de la población (1 en  $10^5$  a  $1$  en  $10^6$ ) crece en presencia de una concentración de vancomicina mayor de 4µg/ml. Todavía no se conoce bien la base genética y bioquímica del fenotipo intermedio. Las cepas intermedias producen una pared celular anormalmente gruesa y la resistencia quizá se debe a objetivos falsos para la vancomicina. Participan varios elementos genéticos y

mutaciones múltiples y muchos de los genes que han sido implicados codifican enzimas de la vía biosintética de la pared celular (9).

La primera cepa de *S. aureus* altamente resistente a la vancomicina se aisló por primera vez en junio de 2002. Esta cepa, al igual que otras que han sido aisladas posteriormente, albergan un plásmido de conjugación en el que se integró el transposon Van A, por efecto de una transferencia genética horizontal entre especies proveniente de *Enterococcus faecalis* a una cepa resistente a la meticilina de *S. aureus* (9).

### **3.1.7.3. Amoxicilina / Clavulanato**

Las aminopenicilinas son bactericidas contra grampositivos y gramnegativos. Los meningococos y *Listeria Monocitogenes* son sensibles al fármaco. Conviene considerar resistentes a la amoxicilina a las cepas penicilino resistentes, *Haemophilus influenzae* y el grupo viridans de estreptococos muestran grados variables de resistencia. Casi todas las cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* y *Shigella* eran altamente sensibles cuando se utilizó por primera vez la ampicilina en el comienzo del decenio de 1960, pero ahora un porcentaje creciente de dichas especies es resistente. Casi todas las cepas de *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Acinetobacter* y *Proteus* indolpositivo son resistentes a este grupo de penicilinas; dichos antibióticos son menos activos contra *Bacteroides fragilis* que la penicilina G. Sin embargo, la administración conjunta de un inhibidor de la lactamasa  $\beta$ , como ácido clavulánico, amplía el espectro de actividad de estos fármacos (9).

Algunas moléculas inactivan a la  $\beta$  lactamasa, impidiendo la destrucción de los antibióticos lactámicos  $\beta$ , sustratos para estas enzimas. Los inhibidores de la lactamasa  $\beta$  son más activos contra las lactamasas  $\beta$  codificadas en el plásmido (incluso las enzimas que hidrolizan a la ceftazidima y cefotaxima), pero son inactivas a la concentración clínica habitual contra las lactamasas  $\beta$  cromosómicas de tipo I inducidas en los bacilos gramnegativos por el tratamiento con cefalosporinas de segunda y tercera generaciones (9).

El ácido clavulánico es producido por *Streptomyces clavuligerus*, tiene muy poca actividad antimicrobiana intrínseca, pero es un inhibidor "suicida" (ligador irreversible) de lactamasas  $\beta$  producidas por muy diversos microorganismos gram positivos y gram negativos. El ácido clavulánico se absorbe adecuadamente por vía oral y también puede aplicarse por vía parenteral. Se le ha combinado con la amoxicilina en un preparado oral (9).

La combinación de amoxicilina y clavulanato resulta eficaz in vitro e in vivo contra cepas de estafilococos productoras de lactamasa  $\beta$ , *H. influenzae*, gonococos y *E. coli*. En tiempos recientes se ha mostrado que la amoxicilina/clavulanato mas ciprofloxacina constituye un tratamiento eficaz por vía oral para pacientes febriles de bajo riesgo con neutropenia por quimioterapia contra cáncer (9).

#### 3.1.7.4. Oxacilina

Es una penicilina semi sintética, catalogada como una isoxazolilpenicilina. Mantiene la estructura básica de toda penicilina, un anillo de tiazolidina y un anillo lactámico  $\beta$ , conectado a un grupo azol. Al igual que otras penicilinas, su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana a través de las proteínas fijadoras de penicilina para inhibir el puente D-alanil D-alanina (9).

La oxacilina se absorbe bien en administración oral, es estable en un medio ácido y es muy resistente a la degradación por penicilinasas. Por esta razón está indicado para tratar cepas resistentes a meticilina de *S. aureus*. Como las otras isoxazolilpenicilinas, inhibe de forma potente la proliferación de casi todos los estafilococos productores de penicilinasas, lo cual es precisamente su aplicación clínica válida (9).

#### 3.1.7.5. Meticilina

Es un antibiótico  $\beta$  lactámico semi sintético de espectro limitado del grupo de las penicilinas. Fue desarrollado en el año 1959 por la compañía Beecham para tratar infecciones producidas por cepas productoras de beta lactamasa. No se puede administrar por vía oral, solo por vía parenteral. Su mecanismo de acción es el mismo que el de otros beta lactámicos, inhibe la síntesis de la pared bacteriana. Su uso se discontinuó debido a que tenía una incidencia alta de nefritis intersticial, un efecto secundario poco frecuente de otras penicilinas (9).

Hoy en día solo se utiliza en laboratorios clínicos durante la realización de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana debido a que una cepa resistente a meticilina, es resistente a otras pencilinas “resistentes a la beta lactamasa”. Razón por la que persiste el término “*Staphylococcus aureus* meticilino resistente” (SARM o MRSA) (9).

#### **3.1.7.6. Claritromicina**

Es un macrólido semi sintético desarrollado a partir de la eritromicina (producida por el hongo *Streptomyces erythreus*). Los macrólidos llevan dicho nombre porque contienen un anillo de lactona multilátero de 14 miembros. Es un antibiótico bacteriostático que inhibe la síntesis de proteínas bacterianas al unirse de manera reversible a las subunidades ribosómicas 50S, de modo que inhiben el paso de la translocación en el que una molécula nueva de petidilo ARNt se desplaza del sitio aceptor del ribosoma al sitio donador del peptidilo. La claritromicina se comercializa combinada con lansoprazol y amoxicilina para tratamiento de *H. Pylori* (9).

La resistencia a macrólidos se puede dar por uno de cuatro probables mecanismos:

1. Emisión del fármaco por medio de un mecanismo de bomba activa.
2. Protección ribosómica por la producción inducible o constitutiva de metilasas que modifican el objetivo ribosómico y reducen el enlace del fármaco.

3. Hidrolisis del macrólido por medio de la producción de esterases.

4. Mutaciones cromosómicas que alteran alguna de las proteínas de la subunidad 50S.

(9).

## 4. MÉTODOS

### 4.1. Tipo y diseño de la investigación:

Estudio descriptivo de la actividad antibacteriana del extracto supercrítico de ajo (*Allium sativum* L.), chichipin (*Hamelia patens* Jacq), orégano (*Lippia graveolens* Kunth) y té de limón (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) sobre el crecimiento in vitro de *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Escherechia Coli* y *Pseudomonas aureginosa*.

### 4.2 Unidad de análisis

4.2.1 Unidad Primaria de muestreo: Extracto supercrítico de ajo (*Allium sativum* L.), chichipin (*Hamelia patens* Jacq), orégano (*Lippia graveolens* Kunth) y té de limón (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf).

4.2.2 Unidad de análisis: Registro de los distintos diámetros de los halos inhibitorios en los cultivos medidos en milímetros y su porcentaje de efecto inhibitorio.

4.2.3 Unidad de información: Antibiogramas realizados por medio del método de Bauer-Kirby en cultivos de cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Escherechia coli*, *Pseudomonas aureginosa* y cepas aisladas de muestras clínicas de *Helicobacter pylori*.

### 4.3 Población y Muestra:

4.3.1 Población o universo: Bacterias Gram positivas y Gram negativas.

4.3.2 Marco muestral: Cepario del Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la USAC.

4.3.3 Muestra: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherechia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aureginosa* ATCC 27853 Y *Helicobacter pylori* proveniente de aislados clínicos.

**4.4 Objeto de estudio:**

Extractos supercríticos de ajo, chichipin, orégano y té de limón.

**4.5 Enfoque o diseño de la investigación:**

Estudio descriptivo longitudinal.

#### 4.6 Medición de variables:

Variable	Definición Conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Criterio de clasificación
Actividad antibacteriana in vitro del extracto supercrítico de Ajo ( <i>Allium sativum</i> L.)	Inhibición del crecimiento bacteriano en un cultivo secundario a la aplicación del extracto de ajo obtenido mediante técnica de extracción supercrítica con CO <sub>2</sub> a 45 °C y 8963 kPA y etanol al 95% como cosolvente.	Halo inhibitorio medido en milímetros sobre las cajas de Petri, sobre el cual se calculara su porcentaje de efecto inhibitorio.	Cuantitativa a continua	Razón	Milímetros
Actividad antibacteriana in vitro del extracto supercrítico de chichipin ( <i>Hamelia patens</i> Jacq)	Inhibición del crecimiento bacteriano en un cultivo secundario a la aplicación del extracto de ajo obtenido mediante técnica de extracción supercrítica con CO <sub>2</sub> a 45 °C y 8963 kPA y etanol al 95% como cosolvente.	Halo inhibitorio medido en milímetros sobre las cajas de Petri, sobre el cual se calculara su porcentaje de efecto inhibitorio.	Cuantitativa a continua	Razón	Milímetros
Actividad antibacteriana in vitro del extracto supercrítico de orégano ( <i>Lippia graveolens</i> Kunth)	Inhibición del crecimiento bacteriano en un cultivo secundario a la aplicación del extracto de ajo obtenido mediante técnica de extracción supercrítica con CO <sub>2</sub> a 45 °C y 8963 kPA y etanol al 95% como cosolvente.	Halo inhibitorio medido en milímetros sobre las cajas de Petri, sobre el cual se calculara su porcentaje de efecto inhibitorio.	Cuantitativa a continua	Razón	Milímetros
Actividad antibacteriana in vitro del extracto supercrítico de té de limón ( <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf)	Inhibición del crecimiento bacteriano en un cultivo secundario a la aplicación del extracto de ajo obtenido mediante técnica de extracción supercrítica con CO <sub>2</sub> a 45 °C y 8963 kPA y etanol al 95% como cosolvente.	Halo inhibitorio medido en milímetros sobre las cajas de Petri, sobre el cual se calculara su porcentaje de efecto inhibitorio.	Cuantitativa a continua	Razón	Milímetros

Variable Derivada	Definición Conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Criterio de clasificación
Porcentaje de efecto inhibitorio	Relación entre el halo inhibitorio de cada extracto contra el halo inhibitorio del control positivo.	% Efecto Inhibitorio= [(Diámetro del Halo inhibitorio del extracto en mm)/ (Diámetro del halo inhibitorio del control positivo en mm)] x 100	Cuantitativa continua	Razón	Porcentaje

## **4.7 Técnicas, procesos e instrumentos utilizados en la recolección de datos:**

### **4.7.1 Técnicas de recolección de datos:**

Se realizaron las pruebas de actividad antimicrobiana de los extractos por medio del Método Bauer-Kirby de difusión en agar.

### **4.7.2 Procesos:**

#### **4.7.2.1. Proceso de selección de vegetales:**

Para seleccionar las distintas plantas que se incluyen en el estudio, se revisaron publicaciones de la Facultad de Ciencias Médicas y de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, así como el Vademécum Nacional de Plantas Medicinales y algunas otras publicaciones nacionales e internacionales (1,13 - 20, 25, 33, 34). Se tomó en cuenta especies vegetales las cuales han presentado actividad antimicrobiana, aunque, cabe destacar que se utilizaron otros tipos de extractos distintos al proceso supercrítico en dichas publicaciones.

Los vegetales utilizados fueron obtenidos en los distintos puntos donde se producen en nuestro país: el ajo proviene de Chiantla, Huehuetenango, el chichipin de San Juan Ermita, Chiquimula, el orégano de Teculután, Zacapa y por último el té de limón de Cobán, Alta Verapaz. Luego se llevaron a la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala para ser identificadas taxonómicamente. Por último los extractos supercríticos fueron proporcionados por el Laboratorio

Ambiental del Centro Universitario de Oriente (CUNORI) de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

#### **4.7.2.2. Proceso de selección de bacterias:**

Las bacterias utilizadas son del cepario de Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la USAC. Estas cepas son *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aureginosa* ATCC 27853 Y *Helicobacter pylori* proveniente de aislados clínicos.

#### **4.7.2.3. Proceso de extracción supercrítica:**

Los extractos vegetales fueron proporcionados por el Laboratorio Ambiental del CUNORI, los cuales fueron fabricados por el método de extracción supercrítica, utilizando CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico solvatante y etanol al 95% como cosolvente. Proporcionando un extracto vegetal en etanol. Para el Chichipin, el orégano y té de limón, se utilizó únicamente las hojas, para el ajo los bulbos. Se molieron 2 libras de la parte de la planta a utilizada y se colocó en la celda, se agrega 2 litros de etanol al 95% y se cerró la cámara. Acto seguido, se agregó el CO<sub>2</sub> hasta alcanzar la presión supercrítica de 8,963kPa, mientras se procedió a calentar el sistema a 45°C. Pasada una hora. Se recolectó el extracto en una probeta, obteniéndose un litro de extracto y luego, para asegurar su esterilidad, se filtró, bajo condiciones estériles; en una campana de flujo laminar, utilizando guantes estériles, cofia, mascarilla y material estéril. Dicho filtrado se realizó con un filtro estéril de Nylon de 45

micras y se almacenó el extracto filtrado en un tubo de vacío estéril de vidrio marca Vacutainer.

#### **4.7.2.4.Método de impregnación de extracto supercrítico en papel filtro.**

Se utilizó antibióticos convencionales como controles negativos y positivos, dichos antibióticos están impregnados en discos de papel filtro de 6 milímetros. Por lo que se fabricaron discos de papel filtro utilizando un sacabocados de 6 mm de diámetro marca Korff Honsberg, dichos discos fueron esterilizados en autoclave. Luego, bajo condiciones estériles se impregnaron los distintos extractos supercríticos; se utilizó jeringas desechables estériles de 3 mililitros, con jeringas calibre 22G de 30 milímetros de largo marca Nipro. El volumen depositado sobre el disco para impregnarlo es de una gota. Antes de colocar los discos en el agar, se secaron en una incubadora a 37 °C por 20 minutos.

Para cuantificar el peso exacto de la gota de cada extracto supercrítico, se pesó un disco de papel filtro no impregnado en una balanza analítica marca Radwag modelo AS 220, luego se pesó el mismo disco pero ya impregnado con una gota de extracto, de modo que se obtuvo por medio de una substracción, el peso de la gota. Debido a que los discos se secaron antes de utilizarlos, se procedió a secar el disco de la forma ya descrita para luego pesarlo seco. De tal manera se obtiene el peso de

extraco seco impregnado. El proceso se realiza para cada extracto supercrítico.

#### **4.7.2.5.Método para evaluar actividad antimicrobiana**

##### **4.7.2.5.1. Prueba de difusión en agar para *Staphylococcus aureus*, *Escherechia coli*, y *Pesudomonas aureginosa*:**

La actividad antimicrobiana se evaluó por medio de antibiogramas utilizando el método de Bauer-Kirby en agar Mueller-Hinton (27, 35). El procedimiento fue:

1. Se tomó 4 o 5 colonias de igual morfología de cada cultivo original.
2. Se inoculo un tubo con 4ml de caldo tripticasa soya.
3. Se incubo por 15 minutos hasta alcanzar una turbidez estándar 0.5 de McFarland.
4. Del caldo, se empapó un hisopo estéril, con el cual se sembró la caja de Petri con agar en sentido horizontal, vertical y diagonal, para cada especie bacteriana se sembraron cuatro cajas de Petri.
5. Se dejó secar por 3 a 5 minutos y luego se colocaron los discos de papel filtro, los cuales fueron previamente impregnados con los distintos extractos.
6. Se colocaron 7 discos de papel filtro de 6mm en total, tres en una caja de Petri y cuatro en la otra
  - a. Los controles positivos fueron: para *S. aureus*, vancomicina, para *E. coli* y para *P. aureginosa*, ciprofloxacina.
  - b. Los controles negativos fueron: para *S. aureus*, metilicina, para *E. coli*, oxacilina y para *P. aureginosa*,

- amoxicilina/clavulanato. Además se utilizó como control negativo adicional discos impregnados con solución salina.
- c. Los discos impregnados de extracto supercrítico fueron numerados así:  
Orégano "1", Chichipin "2", Té de limón "3" y Ajo "4".
  7. Se cultivó por 24 horas a 36°C y luego se midieron los diámetros de halos de inhibición.
  8. El porcentaje inhibitorio de cada extracto se evaluó mediante la fórmula propuesta por Martínez y colaboradores (31, 32, 33, 34):

$$\% \text{ Efecto Inhibitorio} = \frac{\text{Diámetro del Halo inhibitorio del extracto en mm} \times 100}{\text{Diámetro del Halo inhibitorio del control positivo en mm}}$$

Diámetro del Halo inhibitorio del control positivo en mm

#### 4.7.2.5.2. Prueba de difusión en Agar para *Helicobacter pylori*:

1. Se prepararon 8 cajas de Petri con agar sangre de carnero al 7%.
2. Se tomaron colonias de un cultivo de *H. pylori* y se inocularon en un tubo de ensayo con 1 ml de solución salina estéril hasta que alcanzo la turbidez de 0.5 de McFarland.
3. De la solución se empapó un hisopo estéril, con el cual se siembro una caja de Petri en 3 direcciones (horizontal, vertical y diagonal), el proceso se repitió 8 veces hasta que se hallaron sembradas 8 cajas de Petri.
4. Se dejó secar por 5 minutos y luego se colocaron los discos de papel filtro previamente impregnados con los extractos,

así como los discos control. Los discos fueron colocados de la siguiente manera:

- a) Las 8 cajas de Petri se dividieron en 4 subgrupos, cada caja de cada subgrupo se rotuló como a y b.
- b) En las cajas "a" se colocó tres discos:
  - El disco impregnado con Orégano, rotulado como "1".
  - El disco impregnado con Chichipin, rotulado como "2".
  - El disco impregnado con Té de limón, rotulado como "3"
- c) En las cajas "b" se colocó otros 3 discos:
  - El disco impregnado con Ajo, rotulado como "4".
  - El control positivo; claritromicina.
  - Los controles negativos, amoxicilina/clavulanato y solución salina.
5. Se cultivó por 72 horas a 37°C y luego se midieron los halos de inhibición con regla milimétrica.
6. El porcentaje inhibitorio de cada extracto se evaluó mediante la fórmula propuesta por Martínez y colaboradores (31, 32, 33, 34):

$$\% \text{ Efecto Inhibitorio} = \frac{\text{Diámetro del Halo inhibitorio del extracto en mm} \times 100}{\text{Diámetro del Halo inhibitorio de claritromicina en mm}}$$

7. Si la bacteria resulta resistente al control positivo, la formula anterior no es aplicable debido a que no es matemáticamente posible hacer divisiones por cero, sin embargo se tomó de referencia el halo inhibitorio reportado en las tablas de la NCLS de claritromicina para *H. pylori*.

#### 4.7.2.5.3. Controles positivos y negativos

Todos los controles son marca HIMEDIA, en disco de papel filtro de 6mm de diámetro, variando únicamente el antibiótico y la concentración del mismo:

Para *Staphylococcus aureus* el control positivo utilizado fue Vancomicina a una concentración de 30 µg, el control negativo fue Meticilina a una concentración de 5 µg.

Para *Escherechia coli* el control positivo usado fue Ciprofloxacina a una concentración de 5 µg, el control negativo fu Oxacilina a una concentración de 1 µg.

Para *Pseudomonas aureginosa* el control positivo utilizado fue Ciprofloxacina a una concentración de 5 µg y el control negativo fue Amoxicilina/Clavulanato a una concentración de 30 µg.

Para *Helicobacter pylori* el control positivo utilizado fue Claritromicina a una concentración de 15 µg, el control negativo fue Amoxicilina/Clavulanato a una concentración de 30 µg.

#### 4.7.2. Instrumentos

Los investigadores tomaron nota de los halos de inhibición y de los porcentajes de efecto inhibitorio utilizando la tabla de recolección de datos que se muestra en los anexos.

### 4.8. Procesamiento de datos

#### 4.8.1 Procesamiento:

La información obtenida en la tabla de recolección de datos fue evaluada por los investigadores para establecer si los distintos extractos presentaron características antibióticas.

#### **4.8.1. Análisis**

Una vez completa la tabla de recolección de datos se procedió verificar los tamaños de los halos de inhibición, se consideró que si hay halo de inhibición, el extracto tiene actividad bactericida. Sin embargo para comparar su efectividad versus la efectividad de un antibiótico estándar, se calculó su porcentaje de efecto inhibitorio, de manera que se pueda comparar fácilmente si su actividad es menor, similar o mayor a la del antibiótico utilizado. Posteriormente se utilizó estadística descriptiva para su interpretación.

#### **4.8.2. Hipótesis de trabajo**

H<sub>1</sub>: Al menos uno de los extractos supercríticos de ajo, chichipin, orégano y té de limón, presenta actividad antibacteriana.

H<sub>0</sub>: Ninguno de los extractos supercríticos de ajo, chichipin, orégano y té de limón presenta actividad antibacteriana.

### **4.9. Límites de la investigación:**

#### **4.9.1. Alcances**

Se investigó si los extractos supercríticos de ajo, chichipin, orégano y té de limón presentan actividad antibacteriana, la cual se evaluó in vitro en las siguientes bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aureginosa* ATCC 27853 Y *Helicobacter pylori* proveniente de aislados clínicos. Todas del cepario

del Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la USAC.

#### **4.9.2. Límites**

Las bacterias utilizadas son *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aureginosa*, por lo que, aunque se demuestre actividad antibacteriana contra ellas, no se puede aseverar con absoluta certeza que los extractos presenten actividad contra otras especies bacterianas. Además, con respecto al *Helicobacter pylori*, al ser cepa aislada de muestras clínicas, es posible que presente resistencias antibióticas que de algún modo le confiera resistencia contra el control positivo o contra los extractos a utilizar.

#### **4.10. Aspectos éticos:**

No se realizaron pruebas en humanos ni en animales y toda prueba que requirió la manipulación de bacterias se realizó únicamente en estado in vitro.

#### **4.11. Recursos:**

##### **4.11.1. Recursos físicos:**

- Espacio físico y recursos para trabajo microbiológico bacteriano del Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Balanza analítica y micro pipetas del Laboratorio de Físicoquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Extractor supercrítico y material de laboratorio del Laboratorio Ambiental del Centro Universitario de Oriente (CUNORI).

##### **4.11.2. Recursos materiales:**

- Extracto supercrítico de ajo

- Extracto supercrítico de chichipin
- Extracto supercrítico de orégano
- Extracto supercrítico de té de limón
- Cepas bacterianas del Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Guantes descartables
- Guantes estériles
- Papel mayordomo
- Mascarillas
- Cajas de Petri
- Jabón antibacterial
- Gradilla
- Pipetas
- Alcohol
- Marcadores
- Agar nutritivo solido
- Cubre objetos
- Porta objetos
- Asa bacteriológica
- Fósforos
- Discos de papel filtro
- Tubos de ensayo
- Vernier o regla milimétrica

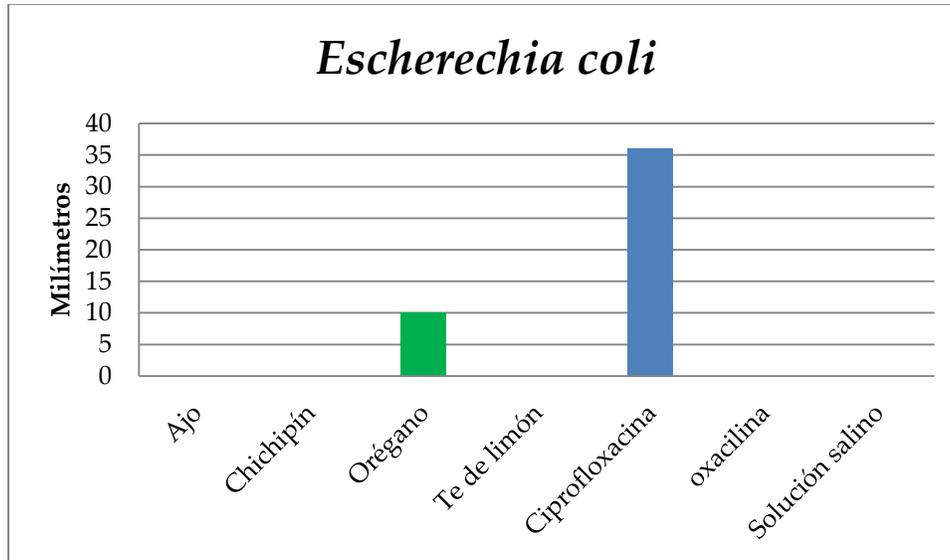


## 4. RESULTADOS

### 4.1. *Escherechia coli*:

Grafica 1

Diámetros de halos inhibitorios en *Escherechia coli*



Fuente: los autores

Guatemala 6 de Junio de 2014

Porcentaje de efecto bactericida:

Porcentaje de efecto bactericida de Ajo = 0%

Porcentaje de efecto bactericida de Chichipin = 0%

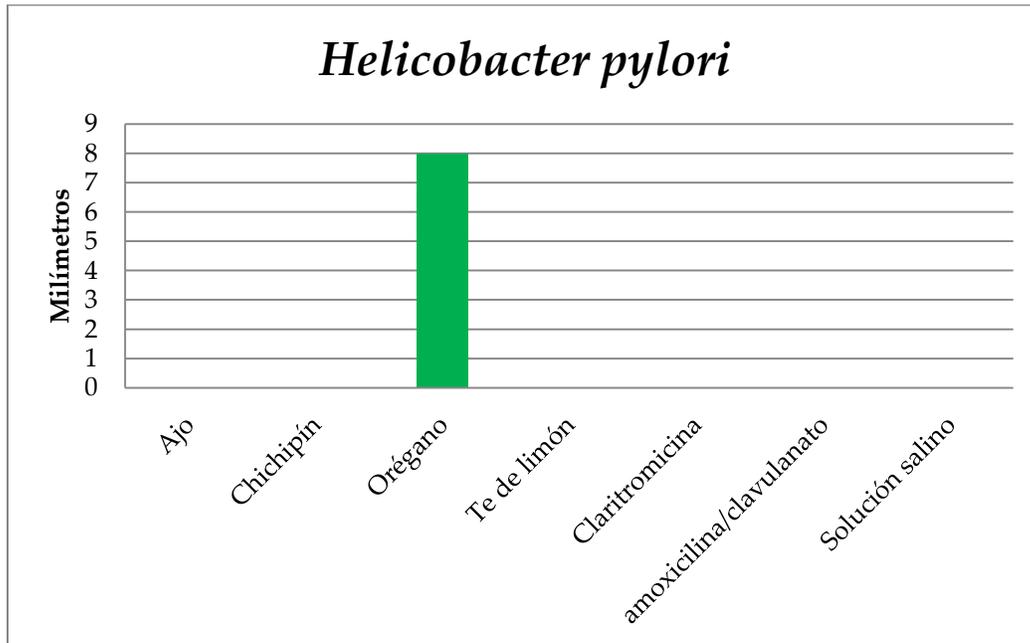
Porcentaje de efecto bactericida de Orégano = 27.28%

Porcentaje de efecto bactericida de Té de limón = 0%

#### 4.2. *Helicobacter pylori*:

Grafica 2

Diámetros de halos inhibitorios en *Helicobacter pylori*



Fuente: los autores

Guatemala 6 de Junio de 2014

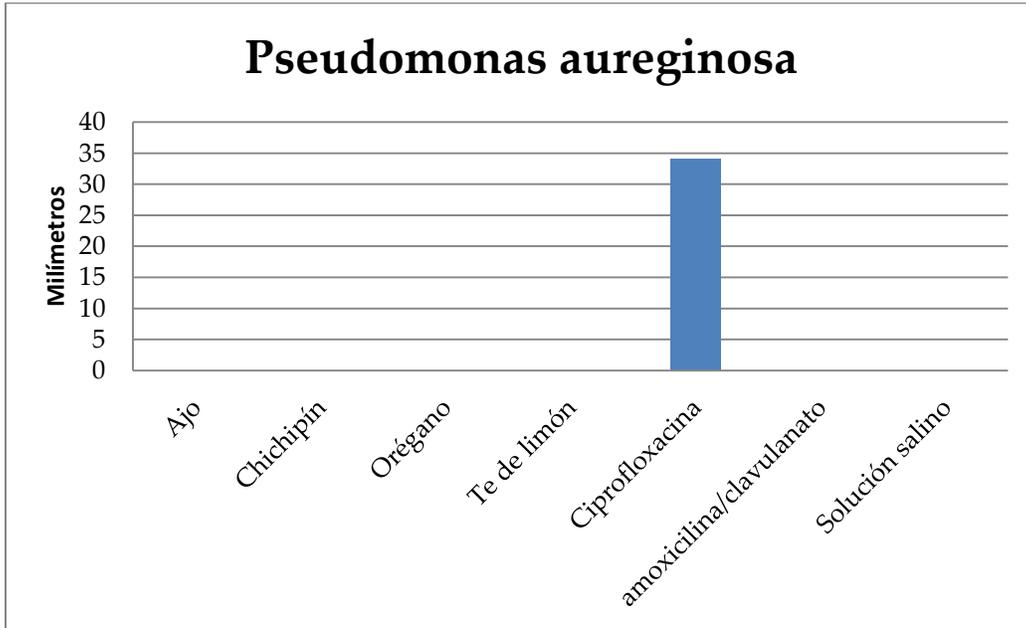
Porcentaje de efecto bactericida:

No calculable, debido a que la cepa de *H. pylori* fue resistente a claritromicina (control positivo), sin embargo se tomó de referencia el halo inhibitorio reportado en las tablas de la NCLS de claritromicina para *H. pylori*, el cual es de 18 mm, por lo que se estima un porcentaje de efecto inhibitorio de 44.44%.

### 4.3. *Pseudomonas aureginosa*:

Grafica 3

Diámetros de halos inhibitorios en *Pseudomonas aureginosa*



Fuente: los autores

Guatemala 6 de Junio de 2014

Porcentaje de efecto bactericida:

Porcentaje de efecto bactericida de Ajo = 0%

Porcentaje de efecto bactericida de Chichipin = 0%

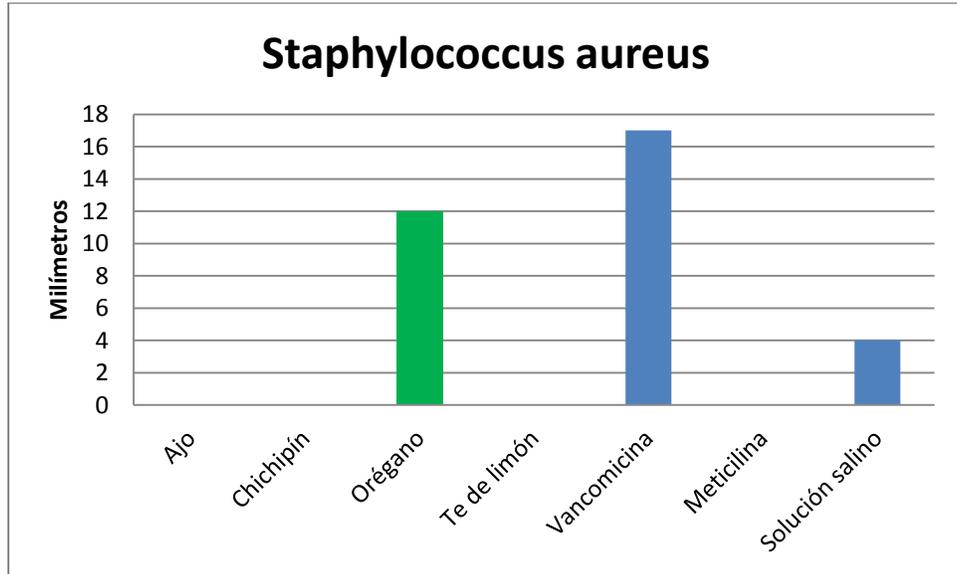
Porcentaje de efecto bactericida de Orégano = 0%

Porcentaje de efecto bactericida de Té de limón = 0%

#### 4.4. *Staphylococcus aureus*:

Grafica 4

Diámetros de halos inhibitorios en *Staphylococcus aureus*



Fuente: los autores

Guatemala 6 de Junio de 2014

Porcentaje de efecto bactericida:

Porcentaje de efecto bactericida de Ajo = 0%

Porcentaje de efecto bactericida de Chichipin = 0%

Porcentaje de efecto bactericida de Orégano = 70.59%

Porcentaje de efecto bactericida de Té de limón = 0%

## 5. DISCUSIÓN

A través del método de difusión en agar de Bauer-Kirby se probó el efecto bactericida de los distintos extractos supercríticos de ajo (*Allium sativum* L), chichipin (*Hamelia patens* Jacq), orégano (*Lippia graveolens* Kunth), y té de limón (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) sobre el crecimiento in vitro de *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aureginosa*. Las plantas fueron recolectadas de distintas partes de Guatemala; el ajo proviene de Chiantla, Huehuetenango, el chichipin de San Juan Ermita, Chiquimula, el orégano de Teculután, Zacapa y por último el té de limón de Cobán, Alta Verapaz. Luego fueron llevadas al Laboratorio Ambiental del Centro Universitario de Oriente (CUNORI) para realizar los extractos supercríticos. Una vez obtenidos los extractos supercríticos, fueron llevados al Laboratorio Clínico de la Facultad de Ciencias Médicas de la USAC para pasarlos por filtros de 0.45µm para aseverar su esterilidad y posteriormente realizar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

El extracto supercrítico de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) presenta actividad antibacteriana contra las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* mas no contra *pseudomonas aureginosa*. Los resultados fueron los siguientes:

*S. aureus*:

- Halo inhibitorio: 12 mm
- Porcentaje de efecto inhibitorio: 70.59%

*E. coli*:

- Halo inhibitorio: 10 mm

- Porcentaje de efecto inhibitorio: 27.28%

*H. pylori*:

- Halo inhibitorio: 8 mm
8. Porcentaje de efecto inhibitorio: no se puede calcular debido a que la cepa de *H. pylori* fue resistente a claritromicina (control positivo), sin embargo se tomó de referencia el halo inhibitorio reportado en las tablas de la NCLS de claritromicina para *H. pylori* el cual es de 18 mm, por lo que se estima un porcentaje de efecto inhibitorio de 44.44%.

*P. aureginosa*

- Halo inhibitorio: 0mm
- Porcentaje de efecto inhibitorio: 0%

Los otros tres extractos supercríticos, de ajo (*Allium sativum* L), chichipin (*Hamelia patens* Jacq), y té de limón (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), no mostraron actividad antibacteriana alguna.

Cabe mencionar que la cepa utilizada de *H. pylori* es aislada de muestras clínicas, y mostró resistencia contra los controles utilizados: Claritromicina y amoxicilina/clavulanato. Pero mostró sensibilidad contra el extracto supercrítico de orégano, lo cual sugiere que el efecto bactericida de dicha planta tiene un mecanismo de acción distinto al de los antibióticos convencionales utilizados.

Por último se pesó la cantidad de sólidos impregnados de cada extracto, es notorio que con una dosis de 0.0014g (1.4mg) de extracto supercrítico de *Lippia graveolens* Kunt se logró obtener efecto bactericida sobre el crecimiento in vitro de *S. aureus*, *E. coli* y *H. pylori*

## 6. CONCLUSIONES:

1. Se acepta la hipótesis planteada, al menos un extracto supercrítico de las cuatro especies de plantas analizadas presenta actividad antibacteriana.
2. El extracto supercrítico de orégano (*Lippia graveolens* Kunt) presenta actividad antibacteriana sobre el crecimiento bacteriano in vitro de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, mostrando un halo inhibitorio de 12 mm para un porcentaje de efecto inhibitorio de 70.59%.
3. El extracto supercrítico de orégano (*Lippia graveolens* Kunt) presenta actividad antibacteriana sobre el crecimiento bacteriano in vitro de *Escherichia coli* ATCC 25922, mostrando un halo inhibitorio de 10 mm para un porcentaje de efecto inhibitorio de 27.28%.
4. El extracto supercrítico de orégano (*Lippia graveolens* Kunt) presenta actividad antibacteriana sobre el crecimiento bacteriano in vitro de *Helicobacter pylori* aislada clínica, mostrando un halo inhibitorio de 8 mm, para un porcentaje de efecto inhibitorio estimado de 44.44%.
5. El extracto supercrítico de orégano (*Lippia graveolens* Kunt) no presenta actividad antibacteriana sobre el crecimiento bacteriano in vitro de *Pseudomonas aureginosa* ATCC 27853, a la dosis utilizada.
6. Los extractos supercríticos de ajo (*Allium sativum* L), chichipin (*Hamelia patens* Jacq), y té de limón (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) no mostraron

actividad antibacteriana in vitro contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aureginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Helicobacter pylori* aislada clínica; a las dosis utilizadas.

## 7. RECOMENDACIONES:

- A la Facultad de Ciencias Médicas:
  - Se debe de continuar estudiando las propiedades antibióticas del orégano (*Lippia graveolens* Kunt), para determinar cuál o cuáles de sus metabolitos son los que presentan actividad antibiótica, cuál es su concentración inhibitoria mínima y cuál es su dosis letal en mamíferos.
  - Se exhorta a probar el extracto supercrítico de orégano (*Lippia graveolens* Kunt), sobre otras especies bacterianas, así como a distintas concentraciones.
  - Se ha reportado en la literatura que tanto el ajo (*Allium sativum* L), como el chichipin (*Hamelia patens* Jacq), y el té de limón (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), han presentado actividad antibiótica utilizando otros métodos de extracción, por lo que se recomienda estudiar si dicho efecto es dosis dependiente o si utilizando otros métodos de extracción se obtienen metabolitos distintos que puedan tener efecto bactericida.
  - Incentivar la investigación científica en las áreas biomédicas: Biología, patología, microbiología, farmacología, bioquímica, fisiología e histología. De modo que el Centro de Investigaciones Biomédicas sea un eje de referencia regional en cuanto a medicina basada en evidencia.
- A la Universidad de San Carlos de Guatemala
  - Promover el apoyo investigativo entre Facultades y Centros Universitarios, de manera que se aprovechen los recursos humanos y

materiales de cada unidad al máximo para el desarrollo de conocimiento.

- Al Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social:
  - Agregar a las Guías de Atención Primaria en Salud, tratamientos fitoterapéuticos basándose en evidencia científica, tal como la presentada en este estudio.

## 8. APORTES

Guatemala es un país con una biodiversidad botánica muy rica, cuya población tiene arraigadas ciertas creencias y costumbres precolombinas, entre las que encontramos la fito terapéutica. Nuestra condición como nación en vías de desarrollo hace que la compra de medicamentos, en este caso antibióticos, no siempre sea posible por parte de la población de escasos recursos. Además de esto, se tiene el creciente problema global de las resistencias antibióticas, de tal modo que se estima que en un futuro no habrán tratamientos antibióticos disponibles, a no ser que se administre mejor el uso de los mismos y se desarrollen nuevos agentes biocidas.

Durante el presente estudio se empleó tecnología y recursos humanos altamente capacitados de varias Facultades y Centros Regionales de la Universidad de San Carlos de Guatemala, así como especies de plantas silvestres y cultivadas en diversas áreas de Guatemala. Por lo que los resultados de este estudio tienen potencial de ser replicados, ampliados y aplicados en la práctica médica comunitaria de Guatemala.

Se comprobó que el extracto supercrítico de orégano (*Lippia graveolens* Kunt) presenta actividad antibacteriana in vitro contra:

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, mostrando un halo inhibitorio de 12 mm y un porcentaje de efecto inhibitorio de 70.59%.

*Escherichia coli* ATCC 25922, mostrando un halo inhibitorio de 10 mm y un porcentaje de efecto inhibitorio de 27.28%.

*Helicobacter pylori* aislada clínica, mostrando un halo inhibitorio de 8 mm.

Queda pendiente realizar en estudios futuros la determinación fito química de los metabolitos activos del orégano, así como su concentración inhibitoria mínima y dosis toxica en mamíferos.

Los extractos supercríticos de ajo (*Allium sativum* L), chichipin (*Hamelia patens* Jacq), y té de limón (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) no mostraron actividad antibacteriana in vitro, sin embargo es posible que utilizando un extracto más concentrado, presenten actividad antibacteriana.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cano López JO. Susceptibilidad bacteriana in vitro a extractos de vegetales utilizados popularmente en el tratamiento de infecciones gastrointestinales: utilización de veinticinco extractos vegetales y determinación de su actividad in vitro contra los entero patógenos gram negativo más frecuentes implicados en el proceso diarreico. [tesis Médico y Cirujano]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Médicas; 1985.
2. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Editores. Microbiología médica. 6 ed. Barcelona: Elseiver; 2009.
3. Caceres A, Girón L, Alvarado S, Torres M. Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. J Ethnopharmacol [en línea] 1987 Aug [citado 12 Mar 2014]; 20(3): 223 – 37. DOI: 10.1016/0378-8741(87)90050-X.
4. Lowy F. *Staphylococcus aureus* Infections. N Engl J Med. 1998; 339: 520-532.
5. Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S, Mietzner T, Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología médica. 25 ed. México: McGrawHill; 2011.
6. Castañeda M. Determinación de portadores nasales asintomáticos en salas de cirugía del Hospital Nacional Pedro Bethancourth. [en línea] [tesis Química Bióloga] Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; 2005. [citado 22 Feb 2014]. Disponible en: [biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2191.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2191.pdf)

7. Guzman B. Tamizaje de niños portadores nasales asintomáticos del Jardín Infantil y Colegio Carlos II de la Universidad de San Carlos de Guatemala. [ en línea ] [ tesis Químico Biólogo ] Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; 2007. [citado 22 Feb 2014]. Disponible en: [biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2917.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2917.pdf)
8. Guatemala. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Protocolos nacionales de vigilancia de salud pública. [en línea]. Guatemala: MSPAS; 2007 [accesado 24 Feb 2014]. Disponible en: <http://epidemiologia.mspas.gob.gt/vigepi/PROTOCOLOS%20MSPAS.pdf>
9. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman & Gilman las bases farmacológicas de la terapéutica. 11 ed. México: Mc Graw Hill; 2007.
10. Guatemala. Instituto Nacional de Estadística. Encuesta Nacional de Condiciones de Vida. [en línea]. Guatemala: INE; 2011. [accesado 25 Feb 2014]. Disponible en: <http://www.ine.gob.gt/np/encovi/documentos/Pobreza%20y%20Desarrollo%202011.pdf>
11. Nwobike JC. Empresas farmacéuticas y acceso a medicamentos en los países en desarrollo: el camino a seguir. Sur Jour [en línea] 2006 [citado 1 Feb 2014]; 3 (4): 129 - 145. Disponible en: [http://www.surjournal.org/esp/conteudos/artigos4/esp/artigo\\_nwobike.htm](http://www.surjournal.org/esp/conteudos/artigos4/esp/artigo_nwobike.htm)
12. World Health Organization. Quality control methods for medicinal plant materials. Ginebra: WHO; 1998.

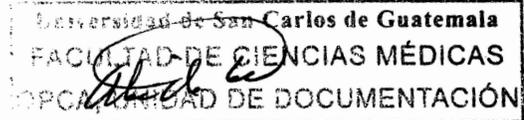
13. Barahona Lara EF. Sensibilidad de *Trichomonas vaginalis* in vitro ante extractos de plantas medicinales: Estudio experimental de cinco extractos vegetales acuosos usados popularmente en el tratamiento de leucorreas y evaluación in vitro de su actividad inhibitoria ante T. Vaginalis. [tesis Médico y Cirujano] .Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Médicas; 1986.
14. Urizar Urizar FL. Ensayo clínico sobre la efectividad de *Smilax lundellii* en el tratamiento de candidiasis vaginal: Estudio prospectivo analítico comparativo entre clotrimazol y un extracto de *Smilax lundellii*, realizado en pacientes de la consulta externa del departamento de ginecología del Hospital General San Juan de Dios, durante los meses de julio –septiembre de 1989. [tesis Médico y Cirujano]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Médicas; 1989.
15. Juárez Muñoz IF. Efecto antibacteriano del ajo: estudio prospectivo realizado durante los meses de junio 1988 a febrero 1989, en el laboratorio multidisciplinario de la facultad de medicina, IN VITRO con 40 cepas de *Escherichia coli* provenientes de pacientes con infección urinaria. [tesis Médico y Cirujano]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Médicas; 1989.
16. Escobar Peña MJ. Tratamiento alternativo de faringoamigdalitis bacteriana con *Phusalis* (miltomate): Estudio prospectivo en 30 pacientes del puesto de salud de canalitos zona 17, bajo el programa de IGMANAGCEC (Instituto guatemalteco de medicinas alternativas naturales y asociación guatemalteca para la cultura, la educación y la ciencia), en los meses de julio y agosto 1993

- .Guatemala. [tesis de Médico y Cirujano]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Médicas; 1993.
17. Rascón Aguilar IE. Efectos antibacterianos del ajo sobre *H. pylori* in vitro. [tesis Médico y Cirujano]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Médicas; 2000.
  18. Pérez Salas RA. Sensibilidad bacteriana in vitro con extractos de plantas medicinales usadas popularmente en el tratamiento de infecciones respiratorias superiores: estudio experimental para estreptococo beta hemolítico del grupo A, con extractos de plantas medicinales seleccionadas. [tesis Médico y Cirujano]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de ciencias médicas; 1986.
  19. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria; 1996.
  20. Cáceres A. Vademécum Nacional de plantas medicinales. Guatemala: Editorial Universitaria; 2009.
  21. Álvarez González LJ. Extracción de metabolitos solubles en dióxido de carbono en condiciones supercríticas a partir de hojas deshidratadas de espinaca (*Spinacea oleracea*). [tesis Ingeniería Química]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de ingeniería; 2011.
  22. Loaiza Salguero ES. Extracción supercrítica con CO<sub>2</sub>. [tesis Licenciado Químico]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; 1994.
  23. Jiménez Navas MO. Determinación de la Actividad Biocida de cinco plantas del género *Acalypha* (*A. guatemalensis*, *A. arvensis*, *A. polystaquia*, *A. indica* y *A.*

- pseudoalopecuroides*). [en línea] [tesis Química Farmacéutica] Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; 2005. [citado 2 Feb 2014]. Disponible en: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2327.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2327.pdf)
24. International Centre for Science and High Technology. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. Trieste: ICS-UNIDO; 2008.
  25. American Society for Microbiology Microbe Library [en línea]. Kansas: ASM Microbe Library; 2009 [actualizado 1 Abr 2013; citado 13 Mar 2014]. Kirby-Bauer diffusion susceptibility test protocol [aproximadamente 20 pant]. Disponible en <http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3189-kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol>.
  26. Ortez JH. Disk diffusion testing in Manual of antimicrobial susceptibility Testing. Seattle: ASM; 2005: p 39-52.
  27. Gobierno de Chile. Ministerio de Salud. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. Chile: El Ministerio; 2005.
  28. Torres Rubín MF. Manual práctico de bacteriología médica. Guatemala: Serviprensa; 1996.

29. Zhang X. Introduction en: WHO monographs on selected medicinal plants. Ginebra: WHO; 1999: vol 1 p 1 – 4.
  
30. Ohno t, Kita M, Yamaoka Y, Imamura S, Yamamoto T, Mitsufuji S, Kodama T, Kashima K, Imanishi J. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter Pylori*. *Helicobacter* [en línea] 2003 May [citado 13 Mar 2014]; 8(3): 207 – 215. DOI: 10.1046/j.1523-5378.2003.00146.x
  
31. Irianda P. Capacidad antimicrobiana y antioxidante de extractos de orégano obtenidos mediante fluidos supercríticos. [en línea] [ tesis Master en Gestión y Seguridad Alimentaria] Valencia: Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Tecnología de Alimentos; 2011. [citado 9 Feb 2014]. Disponible en : <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/13703/Capacidad%20antimicrobiana%20y%20antioxidante%20de%20extractos%20de%20or%C3%A9gano%20obtenidos%20mediante%20fluidos%20supercr%C3%ADticos.pdf?sequence=1>
  
32. Jiménez Navas MO. Determinación de la actividad biocida de cinco plantas del género *Acalypha* (*A. guatemalensis*, *A. arvensis*, *A. polystaquia*, *A. indica* y *A. pseudoalopecuroides*). [ en línea ] [ tesis Química Farmacéutica ] Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; 2005. [citado 2 Feb 2014]. Disponible en: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2327.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2327.pdf)

33. Martínez MJ, Alonso GN, Betancourt BJ. Actividad antimicrobiana del *Schinus terebenthifolius* Raddi (Copal). Rev. Cubana plant Med. 1996, 1(3): 37-39.
34. Morales MJR, Huerta de la Luz IJ, Liga NN, Velásquez OO, Sepúlveda MA, López VH. Actividad antimicrobiana del extracto fluido de la planta *Gnaphalium SPP* (Gordolobo). *Episteme* [en línea] 2006 [citado 12 Mar 2014]; 8-9(2): [aprox. 9 pant]. Disponible en: [http://www.uvmnet.edu/investigacion/episteme/numero8y9-06/jovenes/a\\_gordolobo.asp](http://www.uvmnet.edu/investigacion/episteme/numero8y9-06/jovenes/a_gordolobo.asp)





## 10. ANEXOS

**Tabla 10.1**

**Tabla de Recolección de Datos:**

	Dimensional	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aureginosa</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Ajo	Milímetros				
	Porcentaje				
Chichipín	Milímetros				
	Porcentaje				
Orégano	Milímetros				
	Porcentaje				
Té de limón	Milímetros				
	Porcentaje				
Control positivo	Milímetros				
Control negativo	Milímetros				
Solución salino	Milímetros				

**Tabla 10.2**

**Tabla de recolección de datos llena:**

	Dimensional	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aureginosa</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Ajo	Milímetros	0	0	0	0
	Porcentaje	0	0	0	0
Chichipín	Milímetros	0	0	0	0
	Porcentaje	0	0	0	0
Orégano	Milímetros	12mm	10mm	0	8mm
	Porcentaje	70.59%	27.28%	0	44%
Te de limón	Milímetros	0	0	0	0
	Porcentaje	0	0	0	0
Control positivo	Milímetros	17mm (Vancomicina)	36mm (Ciprofloxacina)	34mm (Ciprofloxacina)	18 mm (Claritromicina)**
Control negativo	Milímetros	0 (metilina)	0 (oxacilina)	0 (amoxicilina/clavulanato)	0 (amoxicilina/clavulanato)
Solución salino	Milímetros	4 mm	0	0	0

\*\* Según referencia del NCLS

Fuente: los autores

Guatemala 6 de Junio de 2014

**Tabla 10.3****Presupuesto**

RECURSOS	CANTIDAD	COSTO	PROPORCIONADO POR
Extracto de plantas	4 extractos	Q.960.00	Investigadores
Guantes descartables	50 pares	Q.30.00	Investigadores
Guantes estériles	20 pares	Q.100.00	Investigadores
Papel Mayordomo	1 rollo	Q.15.00	Investigadores
Mascarillas	10 unidades	Q.15.00	Investigadores
Cajas de Petri	15 unidades	Q300.00	Investigadores
Jabón antibacterial	1 bote	Q.15.00	Investigadores
Hojas papel bond	300 hojas	Q.30.00	Investigadores
Impresiones	200 hojas	Q.200.00	Investigadores
Folder	5 unidades	Q.10.00	Investigadores
Gradilla	2 unidades	Q.100.00	Investigadores
Pipetas	4 pipetas	Q14.00	Investigadores
Alcohol	2 botes	Q.8.00	Investigadores
Marcadores	2 unidades	Q10.00	Investigadores
Agar nutritivo solido	2 unidades	Q30.00	Investigadores
Cubre Objetos	1 caja	Q72.00	Investigadores
Porta Objetos	1 caja	Q50.00	Investigadores
Asa Bacteriológica	2 asas	Q50.00	Investigadores
Fósforos	2 carteras	Q2.00	Investigadores
Discos de papel filtro	4 cajas	Q50.00	Investigadores
Tubos de ensayo	10 unidades	Q30.00	Investigadores
TOTAL		Q2,091.00	

**Tabla 10.4**

**Cronograma**

ACTIVIDADES		TIEMPO																	
		Febrero				Marzo				Abril				Mayo				Junio	
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2
Elaboración de anteproyecto	E	■	■																
	R																		
Elaboración de protocolo	E		■	■	■	■	■	■	■										
	R																		
Trabajo de campo	E									■	■	■	■	■	■				
	R																		
Elaboración de informe final	E															■	■	■	■
	R																		

Cronograma sujeto a cambios.

E: Tiempo Estimado

R: Tiempo Real

**Tabla 10.5**

**Peso de la gota de extracto impregnado**

	Orégano	Chichipin	Ajo	Té de limón
papel filtro	0.4417	0.4691	0.4537	0.3837
papel filtro + gota fresca	0.4497	0.4763	0.462	0.3921
papel filtro + gota seca	0.4431	0.4693	0.4582	0.3838
gota fresca	0.0080	0.0072	0.0083	0.0084
gota seca	0.0014	0.0002	0.0045	0.0001
Porcentaje de sólidos en papel filtro	17.50 %	2.78 %	54.22 %	1.19 %

Pesos en gramos

## Figura 10.1

*Antibiograma de E. coli*



Halo inhibitorio de ciprofloxacina, orégano (etiquetado como "1") y chichipin (etiquetado como "2") en cultivo de *E. coli* en agar Muller-Hinton.

Fuente: Los autores

## Figura 10.2

### Antibiograma de *H. pylori*

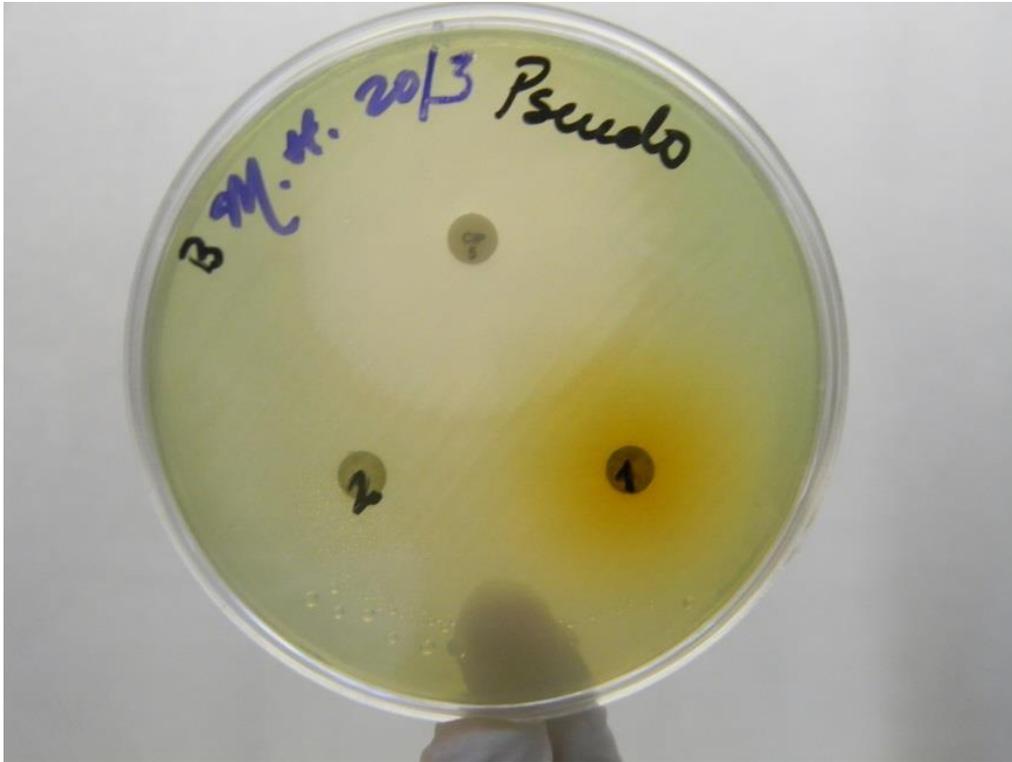


Halo inhibitorio de orégano (etiquetado como "1") y chichipin (etiquetado como "2"), los discos sin etiqueta fueron impregnados con solución salina en cultivo de *H. Pylori* en agar sangre de carnero al 7%.

Fuente: Los autores

**Figura 10.3**

Antibiograma de *P. aureginosa*

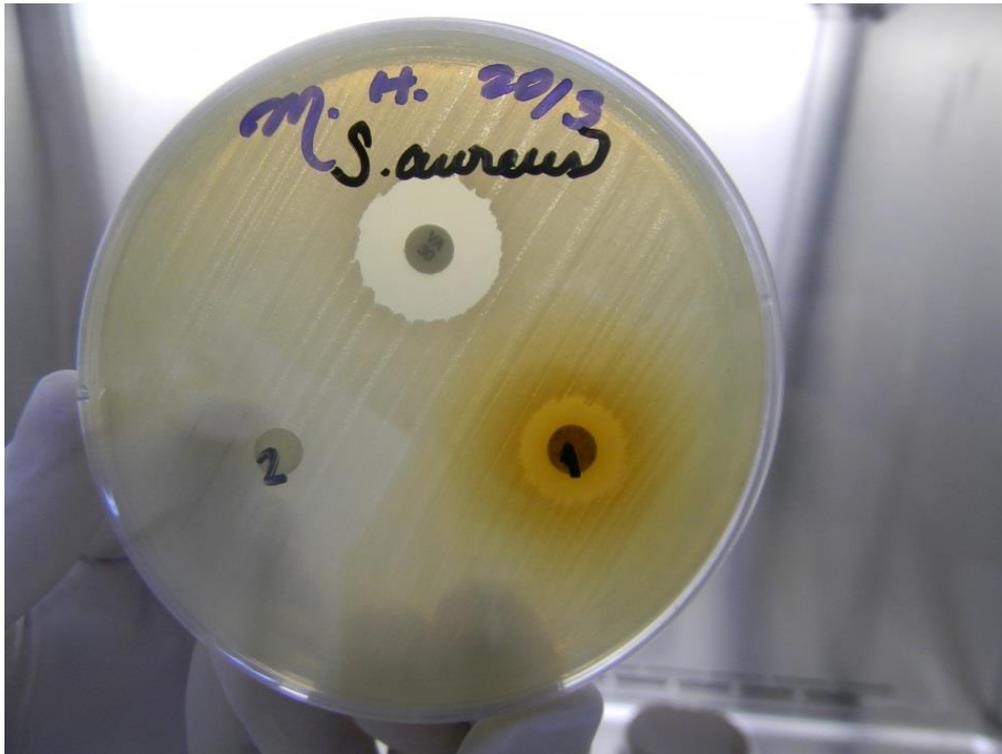


Halo inhibitorio de ciprofloxacina, orégano (etiquetado como "1") y chichipin (etiquetado como "2") en cultivo de *P. aureginosa* en agar Muller-Hinton.

Fuente: Los autores

## Figura 10.4

Antibiograma de *S. aureus*



Halo inhibitorio de vancomicina, orégano (etiquetado como "1") y chichipin (etiquetado como "2") en cultivo de *S. aureus* en agar Muller-Hinton.

Fuente: Los autores

Figura 10.5. Extractor supercrítico



Figura 10.5. Foto esquema del extractor supercrítico utilizado, ubicado en el Laboratorio Ambiental del CUNORI-USAC.

Fuente: Los autores.

Guatemala, 04 de junio de 2014

## A QUIEN INTERESE

Por este medio se hace constar que realicé la determinación taxonómica de 4 especies vegetales las cuales son el objeto de estudio de la tesis titulada "Actividad antibacteriana de los extractos supercríticos de ajo (*Allium sativum* L.), chichipin (*Hamelia patens* Jacq), orégano (*Lippia graveolens* Kunth), y té de limón (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) sobre el crecimiento in vitro de *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aureginosa*" la cual está siendo realizada por los bachilleres Luis Gabriel Robles González y Catherine Aracely Guerra López para optar al título universitario de Médico y Cirujano en el grado académico de Licenciatura.

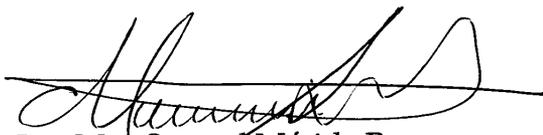
Se describen abajo los nombres comunes, los nombres científicos y la familia botánica a la que pertenecen las especies vegetales analizadas:

Orégano	<i>Lippia graveolens</i> Kunth	Familia VERBENACEAE
Ajo	<i>Allium sativum</i> L.	Familia AMARYLLIDACEAE
Chichipín	<i>Hamelia patens</i> Jacq.	Familia RUBIACEAE
Té de limón	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	Familia POACEAE

Sin más que hacer constar, se extiende la presente nota en el mismo lugar y fecha arriba indicados.

Atentamente,

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"



Lic. Max Samuel Mérida Reyes

Biólogo  
Colegiado 3901

Lic. Max Samuel Mérida R.  
Biólogo  
Colegiado No. 3901