

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**DETERMINACIÓN POR UN MÉTODO DE DILUCIÓN, DE LA
CONCENTRACIÓN INHIBIDORA MÍNIMA DE EXTRACTOS
VEGETALES PRODUCIDOS INDUSTRIALMENTE**

Informe Final de Tesis

**Presentado por
WALTER RODRIGO CONTRERAS ESCOBAR**

**Para optar al título de
QUÍMICO BIÓLOGO**

Guatemala, enero de 1999

ACTO QUE DEDICO

A DIOS: Agradecimiento infinito por sus bendiciones, que me permitieron realizar una de mis metas

A MIS PADRES: Rodrigo Contreras y Amparo Escobar de Contreras; por haberme dado la vida, hoy mi triunfo una recompensa a su invaluable sacrificio

A MI ESPOSA: Rosa María Munguía Galindo de Contreras, por su amor, comprensión y apoyo para alcanzar esta meta

A MIS HIJOS: Walter Vinicio, Herbet Josué y Pablo David; orgullo y riqueza que Dios me dio

A MIS HERMANOS: Josué Eliú, Brenda Lissette, Ingrid Amparo, Herbet Isaf y Damaris Aracely; con amor fraternal

A MIS SOBRINOS Y DEMÁS FAMILIA: Con mucho cariño

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS

A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

AGRADECIMIENTO

Al Licenciado Armando Cáceres Estrada, por su valiosa dirección y conducción en la asesoría de la presente tesis.

A la Licenciada Claudia Regina Morales Ortiz, por el apoyo recibido de su parte durante el desarrollo de esta investigación.

Al Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos -FARMAYA-, por el financiamiento y colaboración prestada para el desarrollo de este trabajo.

INDICE

	pagina
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
ANTECEDENTES.....	3
JUSTIFICACIONES.....	26
OBJETIVOS.....	27
HIPOTESIS.....	28
MATERIALES Y METODOS.....	29
RESULTADOS	33
DISCUCION DE RESULTADOS.....	34
CONCLUSIONES.....	36
RECOMENDACIONES.....	37
BIBLIOGRAFIA.....	38
ANEXO.....	47

1. RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo con el propósito de determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos vegetales y establecer si los procesos de industrialización interfieren en forma negativa disminuyendo la potencia antimicrobiana que estos presentan. Los extractos vegetales utilizados fueron: Psidium guajava, Smilax regelli, Tagetes lucida, Byrsonima crassifolia, Solanum americanum y Cassia occidentalis, producidos en una planta piloto multiuso, a los cuales se les determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM).

Para determinar la CIM se utilizó la metodología de dilución en agar según Mitscher et al. y los microorganismos probados fueron Staphylococcus aureus, Shigella flexneri, Salmonella typhi, Pseudomonas aeruginosa y Candida albicans.

Solamente el extracto de Smilax regelli presentó una actividad antimicrobiana significativa, lo que hace suponer que el proceso de extracción puede alterar los principios activos de las plantas estudiadas.

El análisis estadístico que se utilizó fue la prueba de hipótesis binomial: siendo las variables: éxito = inhibición de crecimiento (+), fracaso = crecimiento (-). Se rechazó H_0 concluyendo que sí tiene efecto. Por lo tanto el criterio de clasificación fue positivo o negativo.

2. INTRODUCCIÓN

El hombre desde su origen ha utilizado ciertas plantas que en la actualidad se sabe que contienen principios activos de acción terapéutica definida, que pueden emplearse para modificar favorablemente los trastornos patológicos originados por las enfermedades y recuperar la salud.

Siendo Guatemala una región privilegiada por la riqueza natural y cultural que posee, el uso por parte de su población de plantas a las que se les atribuye propiedades medicinales para el tratamiento de infecciones forma parte de la cultura heredada de nuestros antepasados y ha alcanzado una distribución a diferentes niveles sociales.

Por lo tanto la validación científica de las propiedades atribuidas debe ser objeto de estudio ya que esto permitirá dar a la población una alternativa eficaz, confiable y segura.

El presente estudio utilizó el método de Mitscher et. al. para determinar la potencia antimicrobiana *in vitro* de los extractos etanólicos obtenidos en planta piloto de las plantas: Psidium guajava L. (Mytaceae) – Guayaba; Smilax regelli Killip y Morton. (Smilacaceae) – Zarzaparilla; Tagetes lucida (Compositae) – Pericón; Byrsonima crassifolia (Malphigeacea) – Nance; Solanum americanum Miller (Solanaceae) – Macuy; y, Cassia occidentalis, (Caesalpinaceae) – Frijolillo, contra las bacterias Shigella flexneri, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella tiphy, y el hongo Candida albicans.

3. ANTECEDENTES

3.1 Microorganismos patógenos:

3.1.1 Shigella flexneri:

Shigella sp., es un bacilo Gram negativo, no móvil, fermenta la lactosa lentamente o no lo hace. Tiene cuatro grupos serológicos principales A, B, C y D de acuerdo al antígeno de su pared celular; aproximadamente 50 serotipos conforman estos cuatro grupos (1).

Tiene una distribución mundial, pero algunas especies prefieren ciertas áreas. En el oriente y en Centro América, la Shigella dysenteriae es comúnmente responsable de los casos severos de disentería (2).

La shigela al igual que las salmonelas no tifoidea no tiene huésped natural intermedio. Debido a que reside en el tracto intestinal del hombre, la shigelosis es una enfermedad de transmisión directa ano-oral (2,3).

Durante el período de 1964 a 1973, se informaron 105,832 casos de shigelosis al Center for Disease Control de Atlanta, de los cuales el 26 por ciento fue Shigella flexneri.

La shigela debe penetrar las células epiteliales del intestino grueso para producir disentería. Después de la penetración intracelular ocurre multiplicación en la submucosa o lámina propia, pero la más alta concentración de bacterias se encuentra cerca de la superficie luminal. Ocurre distorsión de las criptas debido a la acumulación de células inflamatorias

detrás de la obstrucción conduce a la formación de microabscesos. Grandes segmentos del colon son afectados y puede cubrirse con exudado fibroso conteniendo gran número de neutrófilos en las ulceraciones de 5 mm de diámetro. La perforación no es una complicación de la infección. La colitis aguda produce fuerte dolor abdominal y diarrea con sangre y moco, acompañado de periodos febriles con recuperación espontánea de 2 a 7 días después de su apareamiento. No hay evidencia de que la shigela conduzca a una colitis ulcerativa crónica (2,3).

Antes de que la shigela inicie la secuencia de cambios antes descritos, debe atravesar el tracto digestivo proximal. La acidez gástrica destruye muchas shigelas pero se ha aislado de jugo gástrico de voluntarios hasta 4 horas después de la ingestión (3).

Una extensa y grave epidemia de disentería bacilar, que comenzó en Centro America a principios de 1969, se identificó por primera vez en Guatemala y luego en los países vecinos al Norte y Sur. La epidemia afecto a centenares de comunidades rurales y ciudades, la gravedad excepcional de la enfermedad y su resistencia al cloranfenicol, tetraciclina y sulfonamidas complicaron aún mas la situación (4).

Como la shigelosis es autolimitante, se ha cuestionado la necesidad de una terapia antimicrobiana. Sin embargo, un buen porcentaje de los médicos administran antibióticos en estos casos, las tetraciclinas, cloranfenicol y ampicilinas son efectivas para este tratamiento (5). En muchas áreas endémicas

una sola dosis de 2.5 gm de tetraciclina en adultos da excelentes resultados(6). El uso de antidiarreico no es recomendable, pero es imprescindible el uso de sales de rehidratación oral.

3.1.2 Salmonella typhi:

Es un bacilo Gram negativo, aerobio, no capsulado, no formador de esporas, móvil, fermenta la glucosa con producción de ácido, no fermenta la lactosa. Se diagnostica presuntivamente por características bioquímicas y la identificación definitiva por pruebas serológicas usando antígeno somático O y flagelar H. Salmonella typhi vive únicamente en humanos y los portadores representan el único reservorio natural de estas bacterias(1).

El control de los portadores, la eliminación apropiada de las aguas servidas y el agregado de cloro al agua, han reducido la incidencia de fiebre tifoidea en los Estados Unidos de más de 5,000 casos en 1942 a poco más de 500 casos en 1980.

En los países en desarrollo, sin las medidas de control adecuadas, la fiebre tifoidea continúa siendo un importante problema de salud que involucra a miles de personas. En estas áreas endémicas, el agua contaminada representa la principal fuente de infección(3).

La entrada de S.typhi casi siempre es por el tracto gastrointestinal, probablemente por el intestino delgado superior.

S.typhi en pequeñas dosis puede eliminarse del tracto gastrointestinal o puede pasar a la fase de multiplicación. Exista o no multiplicación los bacilos pasan la mucosa intestinal

hacia los linfáticos de la región y luego a la corriente sanguínea vía linfáticos, produciendo una bacteremia inicial, la cual se elimina rápidamente por las células del sistema reticuloendotelial.

Durante la fase de bacteremia sostenida, ocurre infección del tracto biliar y la multiplicación de los bacilos produce la diseminación de millones de bacterias del tracto gastrointestinal. La entrada de bilis infectada al intestino es responsable del aumento del número de salmonelas en las heces durante la segunda y tercera semana de enfermedad (2,3).

La proliferación de células mononucleares grandes derivadas del sistema reticulo endotelial es la característica más importante de su patología. El involucramiento del tejido linfoide en el intestino, principalmente de las placas de Peyer en el ilium terminal puede producir necrosis.

Se observa leucopenia en muchos casos y se caracteriza por la disminución relativa en el número de polimorfonucleares. La melena es frecuente durante la tercera y cuarta semana de la enfermedad (2,3).

El tratamiento debe centrarse en medidas de sostén y la prevención de la deshidratación y desequilibrio electrolítico.

En casos de septicemia, la ampicilina o cloranfencol son las drogas de elección. Sin embargo en 1972, una epidemia en México fue causada por una cepa de *S. typhi* resistente al cloranfenicol.

El cloranfenicol no es efectivo en el tratamiento de portadores en estado crónico y no debería ser usado para este

propósito. La ampicilina puede ser de valor para el tratamiento de ciertos portadores crónicos(7-9).

3.1.3 Staphylococcus aureus:

S. aureus son cocos suelen agruparse en pares, tetradas, cadenas cortas en racimos. Son bacterias Gram positivo, inmóviles, no formadoras de esporas y no poseen cápsula. Las cepas patógenas suelen ser coagulasa positivo, catalasa positivo, hemolíticas y fermentan el manitol (10).

Es un componente normal de la microbiota humana y es transportado en forma asintomática en cierto número de zonas del cuerpo.

El niño es colonizado por estafilococos pocos días después del nacimiento, pero debido a los anticuerpos pasivamente adquiridos a través de la placenta, la tasa de portador cae durante los primeros dos años de vida. Hacia los 6 años de edad, el niño ha adquirido una tasa de portador adulto de aproximadamente 30 por ciento. Las fosas nasales anteriores se consideran el principal reservorio de infección y fuente de enfermedad.

La virulencia de S. aureus se debe en gran parte a su capacidad de resistir a la fagocitosis. La toxina alfa de S. aureus tiene diversas propiedades que aumentan su virulencia. Esta proteína mata las células fagocitadas, constriñe los músculos lisos, paraliza las paredes de los vasos sanguíneos, es dermonecrótica y en dosis suficiente mata a los animales de experimentación (2).

Puede causar infecciones respiratorias muy graves. Su principal patología es la neumonía que puede ser primaria o secundaria (11).

La infección estafilocócica de la piel es la más común de todas las infecciones bacterianas a el hombre. La más superficial de éstas es la foliculitis, en la cual se observa una infección del folículo piloso. Una extensión hacia el tejido subcutáneo da como resultado la formación de una lesión supurativa local ó forúnculo. Un carbunco es similar al forúnculo pero tiene múltiples focos y se extiende hacia las capas más profundas del tejido fibroso. El impétigo en el recién nacido, se caracteriza por la formación de pústulas encontradas en las capas superficiales de la piel (12). Las pruebas de sensibilidad a los antibióticos son importantes en la selección del antibiótico apropiado. La elección inicial debe limitarse a drogas resistentes a penicilinas, ya que muchos aislamientos de infecciones hospitalarias y comunitarias son resistentes a penicilina G y ampicilina. En las infecciones cutáneas, el tratamiento con una penicilina semisintética, como la dicloxacilina, habitualmente es eficaz. En enfermedades estafilocócicas sistémicas serias se aconseja la administración parenteral de meticilina, oxacilina o una cefalosporina(2).

3.1.4 Pseudomonas aeruginosa

Es la especie de más frecuentemente asociada con enfermedad humana. En algunos hospitales este microorganismo causa de 10 al 20 por ciento de las infecciones hospitalarias. Ha reemplazado

al *S. aureus* como principal patógeno en pacientes con fibrosis quística y con frecuencia se aísla de individuos con enfermedades neoplásicas y quemaduras severas.

Es un bacilo Gram-negativo de 0.5 a 1 por 3 a 4 μm . Habitualmente posee un único flagelo polar, pero ocasionalmente puede observarse dos o tres flagelos. Produce una capa de polisacárido extracelular, similar a una cápsula(2,3).

Las infecciones se producen en individuos con defensas alteradas. Estos incluyen pacientes con quemaduras, personas con enfermedades malignas ó metabólicas o aquellos que han sido sometidos a instrumentación o manipulación. La frecuencia de infecciones de las vías urinarias es mayor en individuos de edad avanzada. El tratamiento prolongado de drogas inmunosupresoras o antimicrobianas y la radioterapia también predispone a estas infecciones.

Puede infectar casi cualquier tejido o sitio del cuerpo. Las lesiones localizadas se producen en el sitio de quemaduras o heridas, en el tejido corneal, vías urinarias o pulmones. Desde la infección localizada, los microorganismos por vía hematógena, producen septicemia, la tasa de mortalidad puede llegar al 80 por ciento(2,3).

La principal defensa corporal contra la infección es un sistema fagocítico eficiente. En pacientes con leucemia la mortalidad es más elevada cuando el paciente presenta una leucopenia severa.

Muchos agentes antimicrobianos son efectivos para el

tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa*. La prevención de la colonización y el control de las enfermedad primaria son los principales factores en la sobrevida de los pacientes.

La mayoría de cepas son susceptibles a amikacina, gentamicina y colistina, pero se desarrollan formas resistentes especialmente con tratamientos prolongados. Aproximadamente el 50 por ciento de la *P. aeruginosa* es sensible a la carbenicilina(2).

3.1.5 *Candida albicans*

Es una levadura dimórfica que se encuentra en asociación obligada con animales de sangre caliente. Es considerada como parte de la microbiota normal del hombre, especialmente de las mucosas de la oro-faringe, tubo digestivo y vagina. Usualmente está presente como un comensal inofensivo, pero puede manifestarse como patógeno(13).

Tanto en cultivo como en el tejido es una levadura ovoide de pared delgada. En frotis de lesiones pueden haber hifas septadas con blastosporas ovoides de 2-4 μ m de diámetro. Las hifas también se forman en el cultivo (14)

Es importante diferenciar *C. albicans* de otras especies de cándida, por que otras especies ordinariamente no son patogénicas. La formación de clamidosporas en agar harina de maíz o la formación de túbulos germinales en suero humano son las pruebas más útiles.

Tiene una distribución mundial y comúnmente es encontrada en individuos normales. La incidencia en pacientes que se someten a tratamiento médico es en general alta. Odds sugiere un valor

significativo de 42.9 por ciento en la cavidad oral, 22 por ciento anorectal y 20.7 por ciento vaginal (13).

Ocurre candidosis en todas las edades, razas y en ambos sexos, habiéndose conocido ciertos factores predisponentes como: cambios fisiológicos, administración prolongada de antibióticos y esteroides, debilidad general y constitución inadecuada (15). En el embarazo, ocurren cambios fisiológicos que alteran el contenido de carbohidratos de la vagina e induce al aumento de la población de *Candida*, además de cambios hormonales (15).

La candidosis puede afectar diferentes partes del cuerpo por lo que se divide en: candidosis cutánea, mucocutánea y sistémica. Las primeras drogas antifúngicas usadas desde 1950 son la nistatina y la anfotericina B, ambas contienen un sistema poliénico y actúan aumentando la permeabilidad de la membrana celular del hongo, lo que les hace perder sustancias vitales para su metabolismo y funciones celulares como potasio, aminoácidos y purinas (13,16). El ketoconazol es un imidazol que tiene actividad antifúngica ya que inhibe la síntesis de ergosterol en *C. albicans* (13). El clotrimazol es otro imidazol antifúngico, su principal mecanismo de acción es la inhibición de la biosíntesis del ergosterol (17,18).

3.2 Descripción de plantas en estudio:

3.2.1 *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) - Guayaba

3.2.1.1 Descripción y distribución:

Arbol de 10 m de alto; corteza suave, delgada, rojo-café, produce escamas. Hojas siempre verdes, opuestas, pecíolo

corto, elípticas, 5-15 cm de largo, redondas en el ápice y en la base, con múltiples venas horizontales, provistas de glándulas. Flores axilares, solitarias, blancas, de 3-4 cm de ancho, penacho prominente de 275 estambres. Frutos aromáticos, piriformes, de 7-8 cm de largo; cáscara amarilla; carnaza rosada o amarilla, granular al centro, suave, lleno de pulpa con muchas semillas. Nativa de México y Centro América; naturalizada en todo el mundo. En Guatemala crece en grupos puros, entre 500-1,800 msnm. en todo el país (19).

3.1.2 Usos y propiedades:

El cocimiento de la corteza y las hojas se usa para cólico, diarrea, fistulas, hemorragia, hinchazón, leucorrea, piodermia, resfrío, uretritis, úlceras y tiña (20,21). Se le atribuyen propiedades astrigente, antidiarréica, carminativa, desinflamante, espasmolítica febrífuga; en grandes dosis puede ser abortiva. (22,23,21). El tamizaje antibacteriano demuestra que el extracto acuoso de las hojas y raíces tiene actividad antibacteriana (24,25,26). El extracto etanólico y acetónico tiene actividad antibacteriana, con CIM de 5 mg para S. typhi.

En la keratoconjuntivitis experimental en el cobayo no se demostró mejoría de la infección por S. dysenteriae. La actividad antibacteriana se atribuye a la guayaverina; cristal amarillo soluble en etanol y la actividad antiprotozoárica al ácido psidiólico, triterpeno ácido de peso molecular 455, cristal blanco soluble en etanol. La quercetina tiene actividad

inhibitoria de la acetilocolina y de la motilidad intestinal, lo que podría explicar su actividad antidiarréica. El extracto alcohólico de las hojas disminuye la actividad motora (21).

3.2.1.3 Composición química:

Toda la planta contiene taninos (hojas, 9-10% ; corteza, 12-30% ; raíz, 10-20%). Las hojas tienen ácido maslinico y eleágico y aceite esencial, (β -cariofileno, β -bisaboleno, aromadendreno, p-selineno, nerolidiol, β -sistosterol y ácido oleanólico, ursólico, cratególico y guayavólico). La raíz contiene esteroides, leucoantocianinas y ácido gálico (21).

3.2.2 *Smilax regelli* Killip & Morton (Smilacaceae) Zarzaparrilla:

3.2.2.1 Descripción y distribución:

Smilax regelli es una enredadera de hasta 15 m de largo; raíces delgadas, largas, color café; tallos inferiores agudos, cuadrangulares, ángulos espinosos; ramas superiores cuadrangulares, agudas. Hojas grandes de 20-30 cm de largo por 15-20 de ancho, ovaladas u oblongas, base cordiforme, 5-7 nervios, color verde claro. Pedúnculo estaminífero de 6.5 cm de largo, menos largo que los pecíolos, pedúnculos de 7-12 mm de largo, perianto segmentado, fructíferos de 9-19 mm de largo. Frutos globosos, 1.3 cm de diámetro, color negro. Nativa de México y Centro América. Se encuentra en bosques o malezas hasta de 1,500 msnm. En Guatemala se ha descrito en El Progreso, Petén, Izabal, Jalapa, Santa Rosa, Chimaltenango, Quetzaltenango y Zacapa (27).

3.2.2.2 Usos y Propiedades:

Se usan indistintamente varias de las especies del género *Smilax*, aparentemente con los mismos beneficios terapéuticos. A la decocción y tintura de la raíz y rizoma se le atribuye propiedad antiprurítica, antirreumática, antiséptica, cicatrizante, depurativa, diurética, sudorífica y tónica; se utiliza para el tratamiento de enfermedades de la sangre y del hígado, infecciones venéreas y dermatomucosas, retención urinaria y reumatismo (21).

Estudios microbiológicos demuestran que el extracto alcohólico del rizoma de *S. lundellii* y *S. regelii* posee amplia actividad antimicrobiana y antimicótica *in vitro*: inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativo como *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. dysenteriae* y *S. flexneri* (28) y Gram positivo como *S. aureus* y *S. pyogenes* (29), *C. albicans* (30) y dermatofitos.

En un estudio con 20 cepas de bacterias patógenas, el extracto metanólico demostró un espectro de inhibición de 85 por ciento de cepas de *P. aeruginosa*, 80 por ciento de *S. typhi* y 70 por ciento de *S. aureus* (31).

3.2.2.3 Composición química:

El rizoma contiene glicócidos, saponinas y sarsapogeninas (sarsasaponina, sarsasapogenina, smilagenina, parillina), aceite esencial, β -sitosterol, stigmasterol, sitosterol-D- glicosido, ácido sarsápico, resinas (1.25%), azúcares y grasas (21). La actividad antimicrobiana se atribuye a varias de las saponinas, pero en particular a la parrillina (32).

3.2.3. *Tagetes lucida* (Compositae) - Pericón

3.2.3.1 Descripción y distribución:

Hierba perenne, aromática, erecta, 30-95 cm de alto ramas escasas, muy resinosa al secarse. Hojas opuestas, oblongo-lanceoladas, finamente dentadas, provistas de glándulas oleosas. Flores amarillas en cabezuelas de 9-10 mm de ancho; receptáculo cilíndrico 5-10 mm de largo, en arreglos terminales. Semillas de 6-7 mm de largo, con ranuras, pappus de 3-4 mm de largo (33).

Nativa de México a Honduras en alturas de 900-2,000 msnm.; cultivada en Estados Unidos y Europa. En Guatemala crece Chimaltenango, Jalapa, Guatemala, Huehuetenango, Petén, Quetzaltenango, Quiché, San Marcos y Sacatepéquez (33).

3.2.3.2 Usos y propiedades:

Las flores y hojas se usan para tratar cólico, diarrea, flatulencia e indigestión (34,35,36), paludismo, gripe, resfriado (37), picadura de escorpión y enfermedades hepáticas (21,23,28). Se le atribuyen propiedades antisépticas, digestivas, espasmolíticas e insecticidas. Las hojas tienen acción depresiva del sistema nervioso central e hipotensiva (21). El tamizaje farmacológico demuestra que el extracto acuoso tiene actividad espasmolítica in vivo e in vitro, la cual está relacionada con la 7-metoxicoumarina.

El tamizaje antibacteriano demuestra que el extracto acuoso es activo contra *S. enteritidis*, *S. typhi*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* (25,26,39,40).

3.2.3.3 Composición química:

Toda la planta contiene resinas acídicas, ácido gálico,

tanino, glucosa, dextrina, pectina y sales minerales (41); alcaloides cuaternarios, flavonoides, saponinas, leucoantocianinas (38), quercetagina, petuletina, limoneno (42), α -tertienilo, poliacetilenos, glicósidos cianogénicos, derivados de cumarina y aceite esencial (39).

3.2.4 *Byrsonima crassifolia* L. (Malphiaceae) - Nance:

3.2.4.1. Descripción y distribución:

Arbol de 3-10 m de alto, copa rodeada o extendida, tronco recto, corteza café oscuro, rugosa, rosada por dentro. Hojas siempre verdes, opuestas, ovaladas o elípticas, coriáceas, 5-20 cm de largo y 4-15 cm de ancho, puntiagudas.

Flores de 5 pétalos amarillas o anaranjadas de 1-2 cm de ancho, numerosas en grupos erectos de 12 cm de largo, conspicuas. Fruta en drupa, 8-12 mm de diámetro, piel delicada, amarilla; carnaza blanca, 5 mm de espesor, jugosa, ácida, con olor peculiar; tiene una semilla negra muy dura (21).

Nativo de México, Centro, Sur América y el Caribe en bosques secos de pino-encino y de clima tropical hasta 1,800 msnm. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chiquimula, El Progreso, El Quiché, Escuintla, Huehuetenango, Izabal, Jalapa, Jutiapa, Petén, Quetzaltenango, Retalhuleu, San Marcos, Santa Rosa, Suchitúquez y Zacapa (27,43,44).

3.2.4.2 Usos y propiedades:

El cocimiento de la corteza y flores se usa para tratar enfermedades respiratorias: amigdalitis, asma, bronquitis, fiebre, tos (20,38,44,45); digestivas (cólico, diarrea,

disentería, estreñimiento, indigestión) (21,46,47,48,49) y dermatomucosas (estomatitis, leucorrea, piodermia, tiña, úlcera) (20,50,51), dolor de muelas (52), hemorragias, mordedura de culebra (43), parásitos (21,45) y tumores (53). A la corteza se le atribuye propiedad acaricida, antineurálgica (54), antitusiva, astringente, cicatrizal, digestiva, febrífuga, y tónica (20,21,38,48).

El fruto se come fresco, el mesocarpio representa hasta el 40 por ciento del fruto y se prepara en numerosas formas como dulce, jaleas, helado, refresco y bebida fermentada parecida a la chicha (21,44,45,49); la corteza se usa en la industria artesanal de cueros y la madera en la construcción y en la fabricación artesanal de carbón (27).

Estudios de la actividad antimicrobiana in vitro demuestra que la maceración hidroalcohólica de la corteza es activa contra enterobacterias (S. typhi, S. flexneri(47), S. pneumoniae y S. pyogenes (55).

La actividad antifúngica demuestra que la maceración hidroalcohólica de la corteza tiene actividad contra Candida albicans, C. krusei, C. parapsilosis y C. stellatoidea, con una CIMD de 1-2 mg (30). La decocción de la corteza tiene acción contra seis dermatofitos ensayados, con una CIM de 200 mg y (50). En un estudio de confirmación con cinco órganos de la planta se demostró que la corteza es la que tiene mayor actividad y el etanol el mejor disolvente por actividad y rendimiento del extracto (6.8 %); las bacterias más sensibles fueron P.

aeruginosa, *S. aureus*, *S. flexneri* y *S. pyogenes*; en la confirmación antidermatofítica, tanto la corteza como los frutos secos fueron activos contra tres dermatofitos patógenos al hombre (57).

3.2.4.3 Composición química:

La corteza tiene 20-30 por ciento de taninos, 2.7 por ciento de ácido oxálico y glucósidos. El tamizaje fitoquímico de las hojas indica saponinas, esteroleos insaturados, cardenólidos, bufadienólicos, flavonoides, leucoantocianinas, taninos, polifenoles (57) y triterpenoides (birsonimol) (58).

3.2.5 *Solanum americanum* Miller (Solanaceae) - Macuy

3.2.5.1 Descripción y distribución:

Hierba de 1 m de alto, tallo pubescente. Hojas en pares o solitarias de 3-14 cm de largo, lanceoladas, ápice agudo. Inflorescencia internodal, racemiforme, pedunculada, pocas flores. Flores en cálices de 1-2 mm, lóbulos ovalados, agudos; corola blanca, limbo partido, 5-8 mm de ancho, pistilo 2.5-3.5 cm de largo, más largo que los estambres, ovario globoso. Frutos globosos, negros al madurar, 4-8 mm de diámetro; semillas pequeñas.

Nativa de América, crece en matorrales y sembradíos de 350-1,500 msnm. En Guatemala se encuentra en Alta y Baja Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Escuintla, Guatemala, Jutiapa, Huehuetenango, Petén, Retalhuleu, Sacatepéquez, San Marcos, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa (27).

3.2.5.2 Usos y propiedades:

El conocimiento de las hojas y las semillas tiene amplio uso medicinal. La decocción de hojas se usa por vía tópica para el tratamiento de infecciones dermatomucosas: abscesos, acné, dermatitis, eczema, erisipela, exantema, heridas, leucorrea, llagas, mezquinos, pústulas, tiña, úlceras y vaginitis (20,21,23); por vía oral se usa en el tratamiento de asma, amigdalitis, anemia cirrosis (20), cólico, diarrea, dolor de muelas, escorbuto, estreñimiento, gastritis, hinchazón, meningitis, nerviosismo, paludismo (59), presión alta, retención urinaria, reumatismo, tos ferina y úlcera gástrica (21,23).

Se le atribuye propiedad aperitiva, calmante, depurativa, diurética, desinflamante, emoliente, mineralizante y sedante (21,23,52,59).

Las hojas se comen en caldo o fritas con huevo; es una hierba que se consume en grandes cantidades en el país y es frecuente encontrarla en los mercados, se acostumbra a comer para la convalecencia y recuperación de diversas enfermedades (59).

Estudios antimicrobianos *in vitro* demuestran que la decocción de las hojas tiene actividad antibiótica contra Staphylococcus aureus (11,25).

Estudios antimicóticos *in vitro* demuestran que la decocción y la maceración hidroalcohólica de las hojas tiene actividad contra C. albicans (60) y Cryptococcus neoformans (61).

3.2.5.3 Composición química:

Aunque poco estudiada S. americanum contiene alcaloides (solasodina, solasonina, glucoalcaloides y alcalinas) (60).

3.2.6. *Cassia occidentalis* L. (Caesalpiaceae) - Frijolillo

3.2.6.1 Descripción y distribución:

Arbusto anual que crece comúnmente hasta los 2 m de altura, robusto, algunos con ramificaciones en la base, otros leñosos; estipular-linear a lanceolado, de 4-6 mm de longitud, caduco, permite crecer y ser peciolado en su longitud (27).

Hojas bipinnadas, de 4-6 pares de hojuelas abovado o lanceolados 3-7 cm de longitud, agudo, acuminado. Flores amarillas medianas, en racimos cortos, ramas axilares, laxas, de 1.4-1.8 cm de ancho, pétalos dobles y sépalos, de 6-7 estambres perfectos, anteras enroscadas (27). Su fruto es una vaina aplanada de 7.5-12.5 cm de longitud, oblongo-linear y de curva comprimida, 6-7 mm de ancho. Semillas con folíolos de color café oscuro, linear plano, ligeramente curvado, posee dos valvas, con márgenes de 5-12 cm de longitud, 5-10 mm de ancho, puntiagudo y se dirige hacia arriba o en su forma horizontal; puede contener de 30 ó más semillas (61).

Es una planta que comúnmente crece en lugares áridos y llenos de malas hierbas, algunas veces en los terrenos arenosos con elevaciones de 1,400 m de altura ó menos. En Guatemala, se la encuentra en El Petén, Alta Verapaz, Izabal, Zacapa, Chiquimula, El Progreso, Jutiapa, Retalhuleu, Guatemala y Escuintla (27).

3.2.6.2 Usos y propiedades:

En Jamaica, se utiliza como remedio en los niños, con incontinencia nocturna y enfermedades bacterianas por B.

subtilis y *S. aureus* (62). En Guatemala y El Salvador, las raíces cocidas son empleadas como remedio para el tratamiento de edema, diarrea, dolores espasmódicos, enfermedades del sistema nervioso central, dolores menstruales e histeria (63,64).

3.2.6.3 Composición Química:

La hoja contiene glucósidos flavónicos y antraquinonas: crisofanol, emodina, fisción y derivados. El fisción y la emodina fueron también evidenciados en las flores.(65). La raíz contiene flavonoides, fitosteroles y antraquinonas: casiolina, fisción, emodina, crisofanol, islandicina, helmistosporina y xantonina. En la semilla se evidenciaron fitosteroles, antraquinonas, N-acetil morfolina y N-metil morfolanina (66,67).

3.3 Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro*:

Los métodos de difusión y dilución han sido empleadas para estudiar la actividad antimicrobiana de las plantas medicinales. Gran número de modificaciones han sido hechas en las técnicas para obtener mejores resultados. Debido a que algunos factores (composición del medio de cultivo, microorganismo probado, método de extracción, pH, solubilidad de la muestra en el medio de cultivo etc.) pueden cambiar los resultados es difícil usar estos métodos para estandarizar un procedimiento para el estudio de plantas antimicrobianas. La bioautografía es otro método para estudiar actividad antimicrobiana, con este, los principios previamente cromatografados son difundidos al agar. Los resultados pueden cambiar de acuerdo al método empleado (68-70).

3.3.1. Metodos de difusión:

Son los más frecuentemente empleados en investigación a pesar de ciertas dificultades, pero son modelos de baja credibilidad para muestras que son difíciles de difundir en medios acuosos porque no hay relación entre el poder de difusión y la actividad antimicrobiana (68).

En la mayoría de estudios, las zonas de inhibición son comparadas con las obtenidas para antibióticos. Esto es útil en el establecimiento de la sensibilidad de organismos probados, pero una comparación de la potencia antimicrobiana de las muestras y antibióticos no puede ser sacada de esto.

Esta técnica no requiere dispersión homogénea en agua; es el método de carga en agar usando un disco, agujero o cilindro como reservorio. El reservorio contiene la muestra y la pone en contacto con el medio inoculado y luego se incuba. Se mide el diámetro de la zona clara alrededor de la droga.

Las ventajas de estos métodos es el pequeño tamaño de la muestra que es usado en la prueba y la posibilidad de probar 5 o 6 compuestos contra un solo microorganismo. Sin embargo, estos métodos no deberían de ser empleados cuando la muestra es lipofílica o para determinar el MIC de una muestra. En algunos casos las técnicas de difusión pueden ser usadas para el tamizaje de antimicrobianos, pero no pueden ser usados como un método definitivo. Los métodos de difusión son adecuados para tamizaje preliminar para sustancias puras (alcaloides, flavanoides, terpenoides, etc) (70,71).

3.3.2 Metodos de dilución:

Incluye métodos de dilución en un medio líquido y uno sólido. Ambos métodos se basan en la dispersión homogénea de la muestra en un medio de cultivo selectivo para el microorganismo. Estos métodos son los mejores cuando es necesario probar muestras solubles en agua ó lipofílicas y para determinar el MIC de compuestos (70).

La dilución en medio líquido es un método más complicado pero es el más preciso. Se recomienda para la determinación de MIC de una muestra pura, por medio de subcultivo de un tubo con inhibición en una placa de agar o medio líquido. Cuando el microorganismo no crece, la muestra es microbicida.

El método de dilución en sólido es comparable al de dilución en medio líquido. Este método es rápido y ahorra tiempo y el MIC de un producto contra seis microorganismos puede determinarse al mismo tiempo.

Los métodos de dilución y difusión han sido comparados usando la sensibilidad de ocho antibióticos contra 200 variedades de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes hospitalizados y se obtuvieron resultados similares con los dos métodos (68).

Usando el método de dilución en agar, Mitscher *et al* ha probado más de 1,000 extractos de plantas y encontraron que 26 por ciento de ellos fueron activos. De los distintos métodos de prueba es el más adecuado para un laboratorio pequeño porque es muy difícil preparar extractos de plantas estériles sin el uso de autoclave u otras condiciones especiales. En esta técnica no es necesario que la muestra sea estéril porque los organismos

aeróbicos no se desarrollan bien en agar solidificado. La contaminación ocasional del cultivo se desarrolla en la superficie del agar y no es un problema porque puede reconocerse fácilmente. El método de Mitscher estableció que la cantidad de muestra necesaria, no puede ser mayor de 1 mg en 1 ml de medio de cultivo (73).

El método de dilución en agar se aplica a muestras polares y no polares. Cuando la muestra es lipofílica o un aceite esencial la inclusión puede ser hecha como una emulsión; entre de los emulsificantes con mejores resultados estan Tween 20 y Tween 80 (68).

3.3.3 Bioautografía:

En el estudio de los compuestos biológicamente activos de fuentes naturales, es evidente que la detección rápida y eficiente de tales compuestos es un aspecto crítico del descubrimiento del proceso. Debido a la complejidad de los extractos de plantas, pocos estudios han tratado con el aislamiento de antibióticos de plantas superiores. La Bioautografía es un método que hace posible localizar la actividad antimicrobiana en un cromatograma, la Bioautografía de contacto es el método más frecuente empleado, pero presenta ciertas dificultades y requiere el uso de equipo adecuado. La Bioautografía de inmersión también se basa en la difusión de compuestos separados y para un laboratorio pequeño es más apropiado por que no se afecta por posible contaminación (68).

Tanto en el método de inmersión como en el directo las zonas

de inhibición se observan directamente en placas. La comparación con un cromatograma desarrollado bajo condiciones idénticas y visualizado con un reactivo cromogénico puede proporcionar información extremadamente útil relacionada con la naturaleza química del principio activo (68,69).

4. JUSTIFICACIONES

Las enfermedades infecciosas son frecuentes en Guatemala, lo que obliga a la mayoría de la población de escasos recursos económicos a buscar medicamentos de bajo costo.

Las plantas medicinales han sido utilizadas para diversas afecciones y en los últimos años se han llevado a cabo varias investigaciones tendientes a la validación científica del uso de estas.

Para la industrialización de las plantas medicinales es necesario estandarizar procedimientos de extracción y normalizar sus productos para garantizar la efectividad terapéutica demostrada.

La determinación de la actividad antimicrobiana in vitro se hace necesaria para evaluar y garantizar la potencia de los extractos vegetales con actividad antimicrobiana obtenidos por procesos industriales. Por consiguiente es indispensable establecer una metodología práctica y confiable con la que se pueda evaluar sistemáticamente la existencia de la actividad antimicrobiana y se logre garantizar al público el uso de este tipo de medicamento.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVOS GENERALES

Contribuir a generar métodos para control de calidad de extractos vegetales que se producen industrialmente.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

5.2.1 Confirmar el espectro de inhibición antimicrobiana de seis extractos industriales de plantas medicinales.

5.2.2 Utilizar la metodología de dilución y estrias para evaluar la potencia antimicrobiana de extractos vegetales obtenidos en una plata piloto multiuso.

5.2.3 Demostrar la CIM de seis extractos vegetales obtenidos industrialmente.

6. HIPOTESIS

Los extractos obtenidos en planta piloto mantienen la actividad antimicrobiana descrita en las pruebas de tamizaje preliminar.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo de trabajo

Extractos vegetales producidos industrialmente para fines medicinales y microorganismos causantes de infecciones.

7.2 Muestra

Esta constituida por extractos etanólicos, producidos en planta piloto de las plantas *P. guajava*, *S. regelli*, *T. lucida*, *B. crassifolia*, *S. americanum* y *C. occidentalis* para probar actividad antimicrobiana contra de *C. albicans*(ATCC 10231), *P. aeruginosa*(ATCC 27853), *S. aureus*(ATCC 6538), *S. flexneri*(INCAP 706608) y *S. typhi*(ATCC 14028) provenientes del cepario del Laboratorio y Drogueria de Productos Fitofarmacéuticos FARMAYA S.A., gracias a la colaboración del Subprograma (Química fina farmacéutica) del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).

7.3 Recursos

7.3.1 Recursos Humanos

Lic. Armando Cáceres, Asesor del trabajo.

Personal del Laboratorio y Drogeria FARMAYA S.A.

Tesista Walter Rodrigo Contreras Escobar.

7.3.2 Materiales Químicos

Agar Mueller Hinton

Caldo Tripticasa Soya

Agua destilada

Etanol

7.3.3. Material de vidrio

Embudos de vidrio

Frascos de 120 ml color ámbar

Pipetas volumétricas y calibradas

Tubos de vidrio con tapón de rosca

7.3.4 Material de Plástico

Cajas de Petri de 150 x 20

7.3.5 Otros

Algodón

Gradillas

Papel filtro

Filtro milipore

7.3.6 Equipo de laboratorio

Autoclave

Campana microbiológica

Incubadora

Refrigerador

Balanza analítica

Balanza semi analítica

Asa microbiológica

7.4 PROCEDIMIENTO

7.4.1 Preparación de las cajas con agar planta.

A 9 ml de agar Mueller Hinton se le adiciona 1 ml del extracto vegetal, se vierten en caja de petri y se dejan

solidificar. Se incubó a 36 °C durante 24 horas, las cajas que presentaron crecimiento microbiano se descartaron, almacenándose las cajas libres de contaminación a 4 °C hasta el momento de su uso.

7.4.2 Preparación del inóculo

Se inoculó una asada de cultivo puro microbiano en 5 ml de caldo tripticasa soya, se incubó a 36°C 24 h. En el caso de las bacterias se diluyó 100 µl de la suspensión en 9.9 ml de solución salina estéril, para las levaduras se diluyó 1 ml de la suspensión en 9 ml de solución salina.

7.4.3 Determinación de la CIM.

Se realizó el ensayo iniciando con una concentración de 10 mg/ml, los extractos que resultaron positivos fueron probados a concentraciones mas bajas 9 y 8 mg/ml.

7.4.4 Demostración de la actividad

Se inoculó el agar planta con una asada de cada uno de los microorganismos, siguiendo un patrón de ocho partes iguales con una zona clara en el centro de la caja, (anexo 1) se dejó reposar durante 5 a 10 min. y se incubó a 36°C durante 24 h.

7.4.5 Interpretación de los resultados

Se examinó la aparición de un crecimiento homogéneo en las zonas de inoculación y se intrepetó de la siguiente forma:

No hay crecimiento = extracto positivo

Si hay crecimiento = extracto negativo

Presencia de microorganismos fuera de la inoculación = contaminación.

7.5 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante la prueba de hipótesis binomial utilizando la hipótesis estadística:

H_0 : El extracto vegetal no tiene efecto inhibitorio ($P = 0.5$).

H_a : El extracto vegetal si tiene efecto inhibitorio ($P > 0.5$).

H_0 . Se rechaza si la probabilidad de error es menor a $\alpha = 0.1$

Variable binomial: Exito = inhibición (+).

Fracaso = crecimiento (-)

Se rechazó H_0 concluyendo que si tiene efecto. Por lo tanto el criterio de clasificación fue como positivo ó negativo. Cada ensayo se comparó con un control (agar sin extracto) y un fármaco para validar el bioensayo y por ende los resultados.

8. RESULTADOS

En éste estudio se trabajó con extractos etanólicos obtenidos en planta piloto de las plantas: *P. guajava*, *T. lucida*, *S. regelli*, *B. crasifolia*, *S. americanum* y *C. occidentalis*, con el propósito de determinar la CIM contra *C. albicans*, *F. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. flexneri* y *S. aureus*.

Se provó la actividad antimicrobiana *in vitro* a tres distintas concentraciones 10, 9 y 8 mg/ml, los resultados se presentan a continuación (tabla 1).

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE 6 EXTRACTOS VEGETALES

EXTRACTO ETANOLICO	MICROORGANISMOS (CIM) mg/ml				
	A	B	C	D	E
<i>P. guajava</i>	> 10	10	> 10	> 10	10
<i>T. lucida</i>	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
<i>S. regelli</i>	9.0	9.0	> 10	10	9.0
<i>B. crasifolia</i>	> 10	10	> 10	10	10
<i>S. americanum</i>	> 10	> 10	> 10	> 10	10
<i>C. occidentalis</i>	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10

A: *C. albicans*, B: *F. aeruginosa*, C: *S. typhi*, D: *S. flexneri*, E.: *S. aureus*

9. DISCUSION DE RESULTADOS

El primer aspecto importante a considerar para analizar los resultados obtenidos lo constituye la metodología utilizada en el presente estudio. Anteriormente la metodología que se venía empleando para realizar este tipo de estudios era la difusión en agar (Bauer-Kirby) para las bacterias y levaduras, que consistía en impregnar discos de papel secante con los extractos de las plantas a estudiar luego se colocaban sobre el agar Mueller-Hinton previamente inoculado con los microorganismos, posteriormente se medían los halos de inhibición a las 24 horas de incubación.

Sin embargo en éste estudio se realizó una modificación del método y se utilizó el descrito por Mitscher et al. ya que existía la probabilidad de disminuir el costo y determinar la CIM de un extracto vegetal contra 6 u 8 microorganismos al mismo tiempo. En esta prueba se añadió el extracto vegetal al medio aún líquido, luego se vertió en cajas de petri se dejó solidificar y se inoculó en estria con la bacteria a ensayar.

En cuanto a la determinación de la CIM de los extractos vegetales se emplearon concentraciones de 10, 9 y 8 mg/ml de cada extracto. El extracto de *P. guajava* presentó actividad a una concentración de 10 mg/ml contra *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

T. lucida no presentó actividad contra ninguno de los microorganismos utilizados en el ensayo.

S. regelli presentó actividad a una concentración de 9 mg/ml contra *C. albicans*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, y a una

concentración de 10 mg/ml contra *S. flexneri*

B. crasifolia presentó actividad a 10 mg/ml contra *P. aeruginosa*, *S. flexneri* y *S. aureus*.

Observamos que los extractos de *T. lucida*, *S. americanum* y *C. occidentalis* no tienen actividad a 10 mg/ml, esto no significa que no sean activas a concentraciones mayores pero esta actividad no tiene ningún valor práctico ya que la cantidad necesaria de materia prima es alta y se corre el riesgo de toxicidad.

Abajo de la concentración de 9 mg/ml ninguno de los extractos presentó actividad por lo que no fueron probadas concentraciones menores de 8 mg/ml.

Se puede apreciar que en los resultados anteriores hay cierta pérdida de actividad de los extractos en relación a las pruebas de tamizaje preliminar, referidas bibliográficamente, por lo que la hipótesis de este trabajo se cumple parcialmente.

10. CONCLUSIONES

10.1 Los extractos obtenidos en rotavapor y utilizados en pruebas de tamisaje preliminar, demuestran tener mejor actividad antimicrobiana in vitro.

10.2 La extracción en planta piloto interfiere en los principios activos del extracto vegetal disminuyendo o anulando su actividad inhibitoria in vitro.

10.3 Los extractos de *P. guajava*, *T. lucida*, *B. crasifolia*, *S. americanum*, y *C. occidentalis* obtenidos en planta piloto presentan actividad antimicrobiana menor a la que se observa en extractos de las mismas plantas, obtenidos en extracción con rotavapor.

10.4 El extracto de *S. regelli* presentó actividad contra *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *S. flexneri* y *S. aureus*.

11. RECOMENDACIONES

11.1 Investigar sobre los factores que afectan los principios activos de los extractos vegetales obtenidos en la planta piloto.

11.2 Realizar ensayos in vitro de la toxicidad de los extractos vegetales estudiados en la presente tesis.

11.3 Continuar el estudio para demostrar la CIM de los extractos vegetales utilizados en este trabajo, empleando otras cepas de diferentes bacterias.

11.4 Iniciar los estudios fitoquímicos de fraccionamiento bioguiado tendientes a la elucidación estructural del principio activo responsable de la actividad antimicrobiana.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Jawetz, E., Melnick, J., Aldelberg, E. Microbiología Médica. 10a. ed. Fraga E., Trad. México: El Manual Moderno, 1983. 583 p. (p. 239-240, 242-243).
2. Joklik, W.K., Willett, H.P., Amos, D.B. Zinsser Microbiología. 18 ed. Meeroff N.G., Trad. Buenos Aires: Panamericana S.A., 1986. 1454 p.
3. Lennette, E.H., Spaulding, E.H., Traut J.P., Manual of Clinical Microbiology. Washington: American Society for Microbiology, 1979. 928 p.
4. Mata, L.J., Gangarosa, E.J., Cáceres, A., Perera, D.R. & Mejicanos, M.L. (1970) Epidemic Shiga bacillus dysentery in Central America. I. Etiologic investigación in Guatemala, 1969. J. Infect. Dis. 122: 170:180.
5. Mondai J. Antibióticos. Trib. Med. 1982; Tomo XXXII No. 5 p. 33-38.
6. Blanco, R.A., Rodríguez, S.T., Síndrome Diarréico Agudo en la infancia. Guatemala: Editorial B.R., 1984. 130 p. (p.124-126).
7. Solórzano. S.F., Leños, B.M. & Guiscafré, H.G.(1987). Resistencia actual de Salmonella typhi, Salmonella enteritidis y Shigella spp. Bol. Med. Hosp. Inf. México 44:448-455.
8. Murray, B.E. (1986) Resistance of Shigella, Salmonella and other enteric pathogens to antimicrobial agents. Rev. Inf. Dis. 8. (p. 172-182).

9. Roy, S.K., Speelman, P., Butler, T., Nath, S., Rahman, H. & Stoll, B.L. (1985) Diarrhea associated with typhoid fever. *J. Infect. Dis.* 151: 1138-1142.
10. Carpenter, P.L., *Microbiología*. 4a ed. Blengio J.R., Espinosa, R., Folch, A. Trad. México: Interamericana, 1982. XIII + 518 p.
11. Alvarez, A.V., Inhibición de Streptococcus pyogenes y Staphylococcus aureus por extractos vegetales usados en el tratamiento de afecciones respiratorias. Guatemala: USAC, Tesis de Graduación, Facultad de CC QQ y Farmacia, 1987. 47 p.
12. Finegold, S.M., Baron E.J., Bailey & Scott's. *Microbiology*. 7a ed. Philadelphia: The C.V. Mosby Company, 1986. XVII + 914 p.
13. Shepherd, M.G., Poulter, R., Sullivan, P. Candida albicans: Biology, Genetics and Pathogenicity. *Ann Rev Microbiol* 1985;39: 579-614.
14. Robertsón W.H. Mycology of Vulvovaginitis. *J. Obstet Gynecol* 1988, 158 (4): 989-991.
15. Rippón J.W., *Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and The Pathogenic Actinomycetes*. Filadelfia: W.B. Saunders, 1974. X + 587 p. (p. 175-204).
16. Roberts, S.O. Treatment of Superficial and Subcutaneous Mycoses. p. 225-283. En: *Antifungal Chemotherapy*. Londres: Academic Press, 1980.
17. Mas, J., Piña, E. Las cepas de *Candida* resistentes a la Nistatina se vuelven sensibles al cultivarlas con Ergosterol. *Ach. Invest. Med.* 1985; 16:145.

18. Haller, I. Mode of acción of Clotrimazole: Implications for therapy. *Am J. Obstet Gynecol*, 1985; 152: 939-944.
19. Mc Vaugh, R. (1963) *Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany* 24 (7,3): 285-394.
20. Mendieta, R.M. & Del Amo, S. (1981) *Plantas Medicinales del Estado de Yucatán. Xalapa, Instituto Nacional de Investigaciones sobre recursos Bioticos*, 428 p.
21. Morton, J.F. (1981) *Atlas of Medicinal Plants of Middle America. Springfield, Charles C. Thomas*, 1420 p.
22. CEMAT-IMEPLAN (1980) *Informe del Primer Taller sobre Botánica Medicinal Guatemalteca. CEMAT e Instituto Mexicano para el Estudio de Plantas Medicinales, Guatemala*, 51 p.
23. Instituto Indigenista Nacional (1971) *Aspecto de la Medicina Popular en el Area Rural de Guatemala. Guatemala Indígena* 6:1-330.
24. Cáceres, A., Girón, L.M. & Alvarado, S.R. (1986) *Acción Antibacteriana de plantas de uso Medicinal en Guatemala. Memorias. III Congreso Nacional de Microbiología, Guatemala*, pp. 89-96.
25. Cáceres, A., Alvarez, A.V., Ovando, A.E. & Samayoa, B. (1991) *Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against Gram-positive bacteria. J. Ethnopharmacol.* 31: 193-208.

26. Cáceres, A., Cano, O., Samayoa, B. & Aguilar, L. (1990) Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. *J. Ethnopharmacol.* 30: 55-73.
27. Standley, P.C. & Steyermark, J.A. *Flora de Guatemala. Feiddiana: Botany, Vol 24, Prt V. Chicago. 1946. 468 p.*
28. Cáceres et al (1990) Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. screening of 84 plants against enterobacteria. *J. Ethnopharmacol.* 30: 55-67.
29. Cáceres et al (1990) Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. screening of 46 plants against Gram positive bacteria. *J. Ethnopharmacol.*
30. Cáceres, A. et al. (1990). Plants used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal infections. 1. Screening of 36 plants extracts for anticandidal activity. *J. Ethnopharmacol.*
31. Ramírez, O. (1988) Espectro de inhibición de bacterias patógenas por extractos vegetales. Tesis de Graduación. Facultad de CC QQ y farmacia. USAC.
32. Bérdy, J. et al (1982) *CRC Handbook of Antibiotic Compounds. vol VIII: 2 Boca Ratón, CRC press, pp 225.*
33. Nash, D.L. & Williams, L.O. (1976) *Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany 24(12): 96-97, 177-208, 362-426.*
34. Dieseldorft, E.P. (1940) *Las Plantas Medicinales del Departamento de Alta Verapaz. An. Soc. Geog. Hist. Guatemala 16: 92-105, 191-206.*

35. Logan, M.H. (1973) Digestive disorders and plants medicinales in Highland Guatemala. *Arthorpos* 68: 537-547.
36. Neher, R. T. (1968) The ethnobotany of Tagetes. *E. con. Bot.* 22: 317-325.
37. Camba, P.J. (1984) Inventario sobre plantas medicinales de Honduras. *Memorias. I seminario sobre Medicina Tradicional, Tegucigalpa*, pp 79-131.
38. Martinez, M. (1969) *Las Plantas medicinales de México*, Ediciones Bota, 656 P.
39. Alcántara, M.R. (1987) Actividad antimicrobiana del género Tagetes. Tesis de Graduación. Facultad de CC QQ y Farmacia, USAC, Guatemala.
40. Cano, J.O. (1985) Susceptibilidad bacteriana *in vitro* a extractos de vegetales utilizados popularmente en el tratamiento de infecciones gastrointestinales. Tesis de Graduación. Facultad de Ciencias Médicas. USAC.
41. Lozaya, X. & Lozaya, M. (1982) *Flora Medicinal de México. Primera parte. Plantas Indígenas de México*, Instituto Mexicano de Seguridad Social, 309 p.
42. Oliva, A.M. (1979) Recopilación Botánica y Análisis Químico Cuantitativo de algunas especies de Plantas Medicinales de Guatemala. Tesis de Graduación. Guatemala, Fac. de CC QQ y Farmacia, USAC.
43. FAO (1987) *Especies forestales productoras de fruta y otros alimentos. 3. Ejemplos de America Latina*. Roma, FAO, pp 49-51.

44. Ronquillo, F.A. et al. (1989) Especies vegetales de uso actual y potencial en alimentación y medicina de las zonas subáricas del Nororiente de Guatemala. Guatemala, USAC. DIGI, pp. 37-40.
45. Nuñez, E. (1978) Plantas medicinales de Costa Rica y su folklore. San José, Universidad de Costa Rica. pp. 184.
46. Arnason, T. et al (1980) Maya medicinal plants of San José Succotz, Belize. J. Ethnopharmacol. 21: 345-364.
47. Cáceres, A. & Samayoa, B. (1989). Tamizaje de la actividad antibacteriana de plantas usadas en Guatemala, para el tratamiento de afecciones gastrointestinales. Cuadernos de investigación No. 6-89. Guatemala. DIGI/USAC, 138 p.
48. Diaz, J.L. (1977) Usos de plantas medicinales en México, IMEPLAN, PP. 22.
49. Escobar, N. (1972) Flora Tóxica de Panamá. Panamá, Ed. Universitaria, pp. 170.
50. Altschul, S. (1983) Drugs and foods from little-known plants. Cambridge Harvard University Press, pp. 141-142.
51. Cáceres, A., Samayoa, B. & Fletes, L. (1990) Actividad antimicrobiana de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de infecciones. Cuaderno de Investigación No.4-90. Guatemala, DIGI/USAC, 98 p.
52. Girón, L.M. et al (1991) Ethnobotanical Survey of the Medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. J. Ethnopharmacol. 34:173-187.

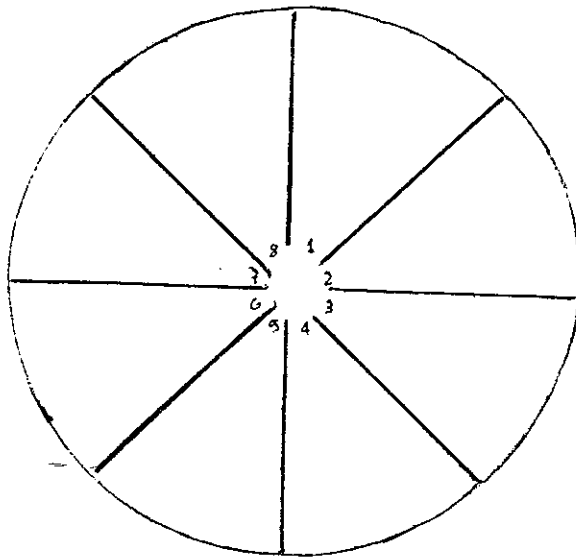
53. Hartwell, J.L. (1982) Plants used against Cancer. Lawrence, Quaterman Pub., pp. 169.
54. Mellen, G.A. (1974) El uso de las plantas medicinales en Guatemala. Guatemala Indigena. 9:99-179.
55. Maradiaga. A.L. (1992) Inhibición in vitro de Streptococcus pyogenes y Streptococcus pneumoniae por extracto etanólico de las plantas Bougainvillea glabra choisy, Byrsonima crassifolia, Capraria biflora, Funica gramartum, Ruta chalepensis, Sida rhombifolia y Solanum torvum. Tesis de Graduación. Facultad de CC QQ y Farmacia, USAC, 53 p.
56. Cáceres, A. et al (1991) Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening for antimycotic activity of 44 plants extracts. J. Ethnopharmacol. 31:263-276.
57. López, M.B. (1992) Demostración de la actividad antimicrobiana de Byrsonima crassifolia y Malpighia glabra. Tesis de Graduación, Guatemala, Facultad de CC QQ y Farmacia, USAC, 66 p.
58. Glasby, J.S. (1991) Dictionary of Plants Contains Secondary Metabolites. London, Taylor & Francis, 488 p.
59. Mejía, J.V. (1927) Geografía de la República de Guatemala, Guatemala, Tipografía Nacional, pp. 157.
60. Girón L.M. (1983) Investigación de la inhibición de Q. albicans por preparaciones de plantas usadas en Medicina Popular. Tesis de Graduación, Guatemala, Facultad de CC QQ y Farmacia, USAC, 48 p.

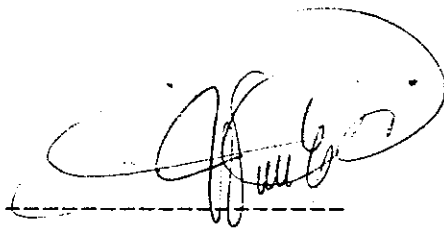
61. Cooney, G. (1991) Fungicidal activity of a Solanum plants extract from Guatemala, C.A. Abstracts. Washington, Pharmacy World Congress. pp.52.
62. Veporte, et al. Medicinal Plants of Surinam I. Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants. *Etnopharmacol.* 1982; p. 221-226.
63. Girón, J.I.A. Aspectos de la Flora útil de Guatemala. Guatemala: Tipografía Nacional, 1966. 383 p.
64. Ministerio de Salud Nicaraguense. Rescate de la Medicina Popular, 1er informe sobre las 74 plantas más usadas medicinalmente en la región de Las Segovias. Nicaragua. Ministerio de Salud.
65. Tiwari, R. & Singh, J. 1977, *Phytochemistry*, 16 (7), 1107-1108.
66. Lal, J. & Gupta, A. 1973, *Phytochemistry*, 12 (5), 1186.
67. Kim, H.L. et al. 1971, *J. Agr. Food Chem*, 19 (1), 198-199.
68. Rios, J.L., Recio, M.C., Villar, A. Screening methods of natural products with Antimicrobial Activity: a Review of Literature. p (127-149) (In *Journal of Ethnopharmacology*. Ireland: Elsevier Scientific Publisher Ireland vol. 25, vol.23, 1988).
69. Prueba Internacional Para Antimicrobianos. USA: Schering Corporation, Doc. Tec. No.2, 1983. 8 p.
70. Holt, R.J. Laboratory test of Antifungal drugs. *J.Clin Path*, 1974; 28:767-774.

71. Barry, A.L., Thornsberry, C. Susceptibility test: Difusión test procedures. p.(978-987 In: Lennette E.H., et al. Manual of Clinical Microbiology. 4 ed. Washington: American Society for Microbiology, 1985. 1149 p.
72. Raddish, P.G. Methods of testing antiseptic. J. Lab. Clin. Med. 1973; 14: 649-653 p.
73. Mitscher, L.A., Drakes, Golapudi. A modern look of folkloric use anti- infective agents. J. Nat. Prod. 1987; 50:1025-1041.

ANEXO No. 1


PLANTILLA PATRON DE OCHO PARTES





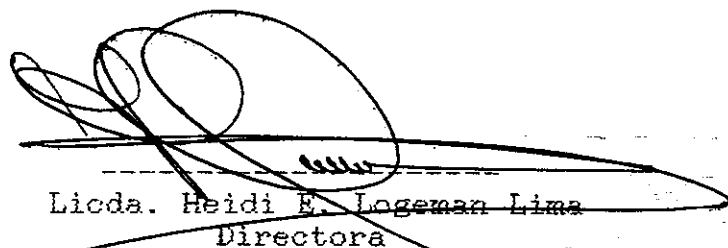
Walter Rodrigo Contreras Escobar

Autor

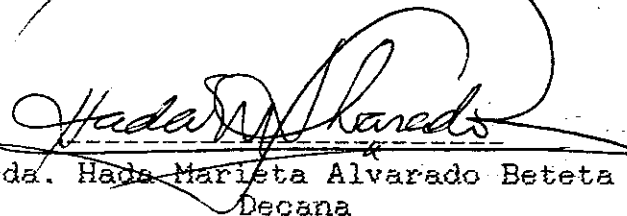


Lic. Armando Cáceres Estrada

Asesor



Licda. Heidi E. Logeman Lima
Directora



Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta
Decana