


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y  
FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure, likely a saint or religious figure, surrounded by various symbols including a cross, a lion, and architectural elements like columns and a dome. The Latin motto "SIBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER CETERA" is inscribed around the perimeter of the seal.

**Actividad antibacteriana de plantas medicinales  
en cepas clínicas de enterobacterias  
productoras de beta-lactamasas de espectro  
extendido**

**Trabajo de graduación**

**Presentado por  
Ligia Maribel Castro Peláez**

**Maestría en Uso y Producción de Plantas  
Medicinales  
MUPLAM**

**Guatemala, noviembre de 2009**

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

**JUNTA DIRECTIVA**

<b>OSCAR MANUEL COBAR PINTO, PH. D</b>	<b>DECANO</b>
<b>LIC. PABLO ERNESTO OLIVA SOTO, M.A.</b>	<b>SECRETARIO</b>
<b>LICDA. LILLIAN RAQUEL IRVING ANTILLON, M.A.</b>	<b>VOCAL I</b>
<b>LICDA. LILIANA VIDES DE URIZAR</b>	<b>VOCAL II</b>
<b>LIC. LUIS ANTONIO GALVEZ SANCHINELLI</b>	<b>VOCAL III</b>
<b>BR. MARIA ESTUARDO GUERRA VALLE</b>	<b>VOCAL IV</b>
<b>BR. BERTA ALEJANDRA MORALES MERIDA</b>	<b>VOCAL V</b>

**CONSEJO ACADEMICO**

**ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**OSCAR MANUEL COBAR PINTO, PH.D.**  
**LICDA. ANNE MARIE LIERE DE GODOY, MSc.**  
**DR. JORGE LUIS DE LEÓN ARANA**  
**DR. JORGE ERWIN LÓPEZ GUTIÉRREZ**  
**LIC. FELIX RICARDO VELIZ FUENTES, MSc.**

## ACTO QUE DEDICO

- A Dios** Por ser mi guía, protector y estar a mi lado en todos los momentos de mi vida.
- A mis padres** Alirio Castro Chávez y Ligia Peláez de Castro. Por su amor, apoyo y comprensión incondicional, así como la educación, responsabilidad y valores inculcados en mi.
- A mi hermano** Carlos Fernando Castro Peláez, por tu apoyo en mis decisiones que he tomado en la vida.
- A mis abuelos** Carlos Peláez Marroquín (QEPD) y María Asunción Vda. De Peláez por su amor y crianza durante toda mi vida.
- A mi abuela** Cleotilde Chávez (QEPD) por darle la vida y educación un gran hombre, mi padre.
- A mis tíos, primos y familia** por su cariño incondicional.
- A mis amigos** Marilyn Franco, Lucía Roesch (y sus familias), Cecy, Karlita, Kareen, Rebe, Keila e Isa por la amistad incondicional y desinteresada que siempre me brindaron. Así como a Juan Pablo, Julio, Nadya, Pedro Pablo, Karla Lange, Margarita Paz, Carmen, Claudita, Rox, Flory. Gracias a todos por los consejos y buenos momentos que hemos compartido.
- A Marlon Rojas** Por su compañía, cariño, amor, apoyo, comprensión, momentos de felicidad y momentos difíciles durante todo el tiempo de conocernos.
- A mis compañeros** Natha, Jenny, Lic. Diana, Isa, Keila y Christian.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Universidad de San Carlos de Guatemala**

Por acogerme en sus instalaciones para formarme como profesional en esta magnífica casa de estudios.

### **Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia**

Por todos los conocimientos que me brindó para poder llegar a ser profesional.

### **Escuela de Química Biológica**

Por permitirme recibir los conocimientos impartidos por dicha escuela y formarme como profesional.

### **Mi asesor**

Lic. Armando Cáceres por sus conocimientos, consejos y apoyo que me brindó durante la realización de esta investigación y durante el transcurso de la maestría. Muchas gracias.

### **Mi Revisora**

Dalia Lau, QB. PhD por el tiempo y dedicación para realizar valiosos aportes en este trabajo.

### **Hospital General San Juan de Dios**

En especial al Laboratorio Clínico (Microbiología) por aportar valiosa colaboración para la realización de esta investigación.

### **Mis catedráticos**

Por sus conocimientos y enseñanzas. Especialmente a Armando Cáceres, Shenny Paredes, Benito Soler, Vicente Martínez y demás catedráticos que brindaron sus conocimientos para mi formación.

### **Depto. Citohistología**

Por permitirme realizar mi investigación en sus instalaciones.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
1. Resumen	4
2. Introducción	6
3. Planteamiento del problema	7
4. Justificación	9
5. Marco Teórico	11
5.1 Enterobacterias	11
5.1.1 Morfología	11
5.1.2 Géneros y especies	11
5.1.3 Enterobacterias más comunes productoras de infecciones	11
5.2 Mecanismos de resistencia	14
5.2.1 Las enzimas Beta-lactamasas	14
5.3 Epidemiología de la multiresistencia	17
5.3.1 Epidemiología de las BLEA	17
5.3.2 Epidemiología de las BLEE	18
5.4 Métodos de detección de resistencia antibiótica	21
5.4.1 Dilución en agar	21
5.4.2 Dilución en caldo	21
5.4.3 Difusión en disco	22
5.4.4 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM o MIC) por la técnica de microdilución en placa	22
5.4.5 Pruebas para la detección o identificación de beta-lactamasas	27
5.5 Tratamiento de infecciones con quimioterapia antibacteriana	29
5.5.1 Antibacterianos que afectan la síntesis de pared celular	30
5.5.2 Acción antimicrobiana por inhibición de las funciones de la membrana celular	33
5.5.3 Acción antimicrobiana por síntesis de las proteínas	33
5.5.4 Acción antimicrobiana por inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos	35

5.6 Plantas medicinales con actividad antibacteriana	37
5.6.1 Nance, <i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) HBK	37
5.6.2 Madre cacao, <i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.) Steud.	40
5.6.3 Orégano mexicano, <i>Lippia graveolens</i> HBK	42
5.6.4 Copalchí, <i>Croton guatemalensis</i> Lotsy	44
5.6.5 Pericón, <i>Tagetes lucida</i> Cav	46
5.6.6 Zarzaparrilla, <i>Smilax dominguensis</i> Willd	48
5.6.7 Mangle rojo, <i>Rhizophora mangle</i> L.	50
5.6.8 Guayabo, <i>Psidium guajava</i> L.	53
5.6.9 Cordoncillo, <i>Piper jacquemontianum</i> Kunth	55
6. Objetivos	57
6.1 Objetivo general	57
6.2 Objetivos específicos	57
7. Hipótesis	58
8. Marco metodológico	59
8.1 Población	59
8.2 Muestra	59
8.3 Materiales y equipo	59
8.3.1 Equipo	59
8.3.2 Materiales	59
8.3.3 Reactivos	60
8.4 Métodos	61
8.4.1 Estandarización de la técnica de microdilución en placa (Actividad antibacteriana)	61
8.4.2 Obtención de extractos vegetales	63
8.4.3 Obtención de cepas bacterianas	64
8.4.4 Determinación de la concentración inhibitoria mínima por la técnica de microdilución en placa	64
8.5 Diseño de investigación	65
8.5.1 Población	65
8.5.2 Tamaño de muestra	65

8.5.3 Diseño de investigación	65
8.5.4 Análisis estadístico	65
9. Resultados	66
10. Discusión	69
11. Conclusiones	75
12. Referencias	76
13. Anexos	84

## 1. RESUMEN

Las enterobacterias son el grupo más común de bacilos Gram negativo cultivados en los laboratorios clínicos y se encuentran entre las bacterias patógenas más comunes dentro de los hospitales. Las bacterias patógenas más frecuentes en Guatemala son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* y para contrarrestarlas se han utilizado antibióticos betalactámicos para los cuales estas enterobacterias han desarrollado diversos mecanismos de defensa, siendo la producción de enzimas de tipo beta-lactamasa el más frecuentes (Brooks, 1999, Coyle, 2006, Itzep, 2005).

Las beta-lactamasas son enzimas producidas por bacterias que inactivan los antibióticos betalactámicos al hidrolizar el anillo beta-lactámico de los mismos, siendo este el mecanismo de defensa más efectivo de las enterobacterias contra estos antibióticos. Por lo tanto las enzimas beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas que fenotípicamente se caracterizan por conferir resistencia a penicilinas, cefalosporinas (incluyendo tercera y cuarta generación) y monobactames, pueden ser inhibidas por inhibidores de beta-lactamasas, son capaces de hidrolizar las oxiaminocefalosporinas (cefotaxima, el ceftazidima y la ceftriaxona) y son inhibidas por el ácido clavulánico (Coyle, 2006).

La proyección de generar nuevas opciones para contrarrestar las infecciones producidas por este tipo de bacterias multiresistentes conlleva a pensar en la posibilidad de utilizar medicina alternativa, como la fitoterapia, para poder atacar a este tipo de microorganismos. Guatemala es un país muy rico en la flora medicinal, razón por la cual se han realizado diversos estudios en donde se ha demostrado que plantas como el pericón, el nance, la guayaba, la mejorana, zarzaparrilla, entre otras tienen actividad antibacteriana satisfactoria.

El objetivo del presente estudio fue contribuir con posibles alternativas de tratamiento antibiótico natural para las infecciones que son causadas por enterobacterias productoras de BLEE; así mismo proponer y estandarizar la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) por la técnica de la microdilución en placa utilizando como revelador de viabilidad bacteriana el reactivo MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-



difeniltetrazolium) y de esta forma poder evaluar cepas clínicas productoras de BLEE contra extractos de 9 plantas nativas de la región y determinar la CIM de los mismos.

Para la estandarización del método se utilizó un estándar de ampicilina y se enfrentó a cepas de 24 horas de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922. Después de una incubación de 16-18 horas a 37°C se reveló la viabilidad bacteriana con MTT a una absorbancia de 492nm. Se realizó una curva de acumulación de medias para obtener los valores finales de la técnica y se determinó que el punto de corte es de  $-0.020 \pm 0.04$  nm.

Con lo que respecta a la evaluación de los extractos alcohólicos de las plantas, todos los extractos seleccionados para el estudio presentaron actividad antibacteriana en estudios previos con una CIM menor a 250 mg/dl. Para la técnica de microdilución en placa se utilizó una concentración de 200µg/ml de extracto. Ninguno de los 9 extractos evaluados presentó actividad antibacteriana contra las cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* provenientes de asilamientos clínicos y productoras de BLEE. Es importante que se realice este ensayo con una concentración de extracto más alta, ya que es probable que no pudo detectarse la actividad de los mismos por evaluarse en una concentración demasiado baja, aunque dada la naturaleza de multiresistencia de estas bacterias no extraña un resultado negativo.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las enterobacterias son un grupo de bacterias Gram negativo que producen una gran cantidad de infecciones en el cuerpo, pueden causar desde una infección urinaria hasta una bacteremia y llevar a complicaciones severas al paciente si no se les diagnostica correctamente y se les da el tratamiento adecuado. Los antibióticos betalactámicos son los medicamentos que se utilizan como tratamiento de elección para infecciones producidas por enterobacterias, debido a que son medicamentos con baja toxicidad y amplio espectro. Sin embargo, las enterobacterias al estar expuestas ante estos antibióticos han desarrollado diferentes mecanismos de resistencia, entre los cuales se encuentran las enzimas beta-lactamasas. Estas enzimas son producidas por bacterias que inactivan los antibióticos beta-lactámicos al hidrolizar el anillo beta-lactámico de los mismos.

Debido a que las enterobacterias cada vez desarrollan nuevos mecanismos de resistencia contra los antibióticos más utilizados, el hombre se ve obligado a desarrollar nuevos medicamentos antibióticos de espectro más amplio sin embargo esto conlleva que el medicamento sea más tóxico y más costoso para el paciente.

La medicina tradicional abarca una amplia variedad de terapias y prácticas que varían entre países y entre regiones. En algunos países se denomina medicina «alternativa» o «complementaria». La medicina tradicional se viene utilizando desde hace miles de años, y sus practicantes han contribuido enormemente a la salud humana, en particular como proveedores de atención primaria de salud al nivel de la comunidad. Dentro de esta medicina se encuentran plantas que se utilizan con propiedades antibióticas y las cuales se les ha demostrado científicamente actividad antibacteriana.

Guatemala es un país muy rico por su diversidad en la flora que posee y muchas de las plantas que se cultivan o se encuentran en territorio guatemalteco pueden ser una nueva opción como un tratamiento antibiótico alternativo o combinado contra las bacterias que en este país causan la mayor cantidad de infecciones en pacientes. Se evaluaron 9 extractos de plantas nativas contra cepas de enterobacterias clínicas multiresistentes y no se encontró actividad antibacteriana de las mismas.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enterobacterias son un grupo de bacterias Gram negativo que producen una gran cantidad de infecciones en todo el cuerpo a pesar que uno de los hábitat naturales es el intestino de humanos. Los antibióticos betalactámicos son los medicamentos utilizados como tratamiento de elección para estas infecciones. Dentro de este grupo de medicamentos se encuentran las penicilinas y cefalosporinas; dentro de este grupo de antibióticos de encuentran las penicilinas y cefalosporinas. Sin embargo, las enterobacterias al entrar en contacto con estos antibióticos desarrollan mecanismos de defensa (resistencia) en donde el más importante es la producción de enzimas beta-lactamasas.

Las beta-lactamasas son enzimas que inactivan el grupo de antibióticos beta-lactámicos al hidrolizar el anillo beta-lactámico de los mismos. Estas enzimas se describieron inicialmente en Alemania y Francia, hace más de 20 años. En la actualidad se denominan betalactamasas de espectro extendido (BLEE), a las enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar cefalosporinas de tercera y cuarta generación.

En Guatemala, existen plantas con actividad antibacteriana comprobada. Sin embargo, los estudios realizados para evaluar esta actividad, se han hecho únicamente con cepas de bacterias Gram negativo de referencia y no con aislamientos clínicos y mucho menos con bacterias multiresistentes. Existe diferencias entre las características y comportamiento de las cepas de referencia y las obtenidas de aislamientos clínicos debido a que las cepas que se encuentran expuestas a tratamiento antibiótico y otros factores externos desarrollan mutaciones genéticas para defenderse contra las adversidades. *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* son enterobacterias de importancia clínica además de ser las tres principales enterobacterias que más infecciones causan a nivel de país.

En esta investigación se evaluó la actividad de los extractos de diversas plantas contra aislamientos clínicos de bacterias Gram negativo. La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) de los extractos se realizó por medio de la técnica de microdilución. A pesar que esta técnica es una de las más exactas para este tipo de estudios, aún no ha sido estandarizada

en Guatemala, por lo tanto, primeramente se estandarizó con cepas de referencia y antibióticos sintéticos, para luego realizar la evaluación de las cepas clínicas contra los extractos de las plantas.

La investigación de alternativas naturales, tales como el estudio de extractos de plantas medicinales con actividad antibacteriana demostrada, contra aislamientos clínicos de bacterias Gram negativo es de gran utilidad en será de gran utilidad en el ámbito terapéutico, ya que se han hecho estudios evaluando esta actividad pero con compuestos aislados de plantas medicinales y no han dado resultados satisfactorios. Debido a que las plantas son un complejo de metabolitos, el mecanismo de acción contra las bacterias puede ser diferente al de los antibióticos sintéticos. Por lo que se espera que alguno de los extractos posea actividad contra cepas clínicas.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

La importancia de este estudio es determinar si alguna de las 9 especies de plantas medicinales nativas, de uso popular, con actividad antibiótica demostrada, posee actividad sobre cepas clínicas de enterobacterias productoras de enzimas BLEE. Este es el mecanismo de resistencia más común de este grupo de bacterias contra los antibióticos: penicilinas, cefalosporinas y aztreonam. Estos antibióticos son utilizados a nivel intra como extrahospitalario como tratamientos de elección contra las infecciones.

Se han evaluado compuestos aislados de plantas contra este tipo de bacterias, sin embargo los resultados no han sido satisfactorios. En este estudio se evaluarán los extractos de las plantas, como un complejo de metabolitos, con actividad antibacteriana comprobada en un número mayor de cepas clínicas de enterobacterias productoras de BLEE.

Se han evaluado compuestos aislados de plantas contra este tipo de bacterias y los resultados no han sido satisfactorios, se evaluarán los extractos de las plantas, como un complejo de metabolitos, con actividad antibacteriana comprobada en un número mayor de cepas clínicas de enterobacterias productoras de BLEE.

Por otra parte, la estandarización de la técnica por microdilución en placa para determinar la CIM servirá para investigaciones posteriores que se realicen dentro del país ya que es un método más confiable que el tradicional en placas de agar Muller Hinton. Asimismo, los resultados obtenidos de esas investigaciones tendrán mayor validez para poder darlos a conocer en revistas científicas tanto de fitoterapia como de microbiología.

Si alguna de las plantas que se evalúe presenta actividad antibacteriana contra cepas productoras de BLEE, esta investigación servirá como el primer paso para la formulación de productos fitoterapéuticos como un tratamiento alternativo y natural, accesible y económico para la población guatemalteca contra infecciones causadas por estas bacterias.

Esta investigación permitirá demostrar la actividad antibacteriana de especies vegetales para el tratamiento de las infecciones causadas por enterobacterias productoras de beta-lactamasas y así proponer alternativas menos tóxicas y efectivas para los pacientes que se vean afectados. También proporcionará las bases de nuevas investigaciones para poder realizar productos fitoterapéuticos a partir de ellas y aportar nuevas alternativas terapéuticas para el médico y los pacientes.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 Enterobacterias

Las enterobacterias son un grupo heterogéneo de bacilos Gram negativo, no esporoformadores, inmóviles o móviles (por medio de flagelos peritricos), crecen en condiciones aerobias o anaerobias (son anaerobios facultativos), crecen sobre peptona o medios con extracto de carne sin suplementos, también crecen en Agar MacConkey, son fermentadores de azúcares, con frecuencia producen gas, reducen nitratos a nitritos y su hábitat natural es el intestino de humanos y animales, sin embargo puede intervenir en ocasiones en procesos patógenos intra o extraintestinales. Se caracterizan por ser poco exigentes en sus necesidades nutritivas y relativamente resistentes a la acción de los agentes externos (Brooks, 1999, Gillies *et al.*, 1965, Madigan, 2003, Murria *et al.*, 1995, Pamarola, 1998).

#### 5.1.1 Morfología.

Bacilos cortos que cuando crecen *in vitro* la morfología de la colonia es variable. Las colonias típicas son lisas, circulares, convexas, con bordes bien diferenciados, la mucosidad es variable y depende del tamaño de la cápsula (Danis *et al.*, 1996, Pamarola, 1998, Zwadyc, 1983).

#### 5.1.2 Géneros y especies.

Se han definido más de 25 géneros y 110 especies de estas bacterias; sin embargo, las de importancia clínica comprenden de 20 a 25 especies. Entre los géneros de las enterobacterias se encuentran: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Proteus*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Yersinia*, entre otros. Algunas de estas bacterias, como *Escherichia coli*, forman parte de la microbiota normal e incidentalmente causan enfermedad, en tanto que otros, *Salmonella* y *Shigella*, con gran frecuencia son patógenas humanas y todas estas bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia contra los antibióticos más frecuentemente utilizados (Brooks, 1999, Danis *et al.*, 1996, Soonenwirth, 1987, Zwadyc, 1983).

#### 5.1.3 Enterobacterias más comunes productoras de infecciones.

Entre las especies de enterobacterias patógenas más comunes se encuentran:

5.1.3.1 *Escherichia coli*. Son bacterias aerobias y anaerobias facultativas, está dotada de motilidad por flagelos peritricos, son no esporoformadores. Las colonias son poco elevadas, convexas, lisa, incolora, color opaco, no viscosas, borde entero, algunas tienen forma de cúpula y en agar sangre algunas cepas producen beta hemólisis. Por lo general es indol positivo, lisina descarboxilasa positivo, fermenta el manitol, lactosa, maltosa, otros azúcares y produce gas a partir de glucosa. Se encuentra usualmente como organismo predominante del intestino del hombre y de los animales. Hasta hace poco se subestimó la importancia de esta bacteria como agente etiológico de enfermedad. En la actualidad se reconoce que este organismo puede causar tres condiciones:

- Infecciones esporádicas de órganos internos, por ejemplo es causa importante de infección en el aparato urinario y es responsable casi del 90% de las infecciones urinarias primarias en mujeres jóvenes, abscesos en órganos internos, septicemia, endocarditis y meningitis.
- Diarrea epidémica grave en niños.
- Diarrea no epidémica (Gillies *et al.*, 1965, Smith *et al.*, 1960).

5.1.3.2 *Klebsiella pneumoniae*. También llamado bacilo de Friedländer. Se presentan como bacilos cortos o coco bacilos Gram negativo o coco bacilo Gram negativo con extremos redondeados. Aerobios o anaerobios facultativos, se encuentran sueltos o apareados, no tienen movilidad y no esporulan. Se desarrolla fácilmente en todos los medios de cultivo usuales de laboratorio, produciendo después de 24 horas de incubación colonias blanco-grisáceas de tamaño mediano, con aspecto mucoso y semilíquido debido a que posee una cápsula de polisacáridos bastante grande. Fermenta la lactosa rápidamente al igual que la sacarosa, salicinol, inositol y produce ácido y gas a partir de glucosa. Por lo general es positivo para las pruebas de lisina descarboxilasa, citrato y urea (Koneman 1999).

Esta bacteria se encuentra en la nasofaringe y en las heces de casi 5% de las personas sanas y se ha encontrado asociado en enfermedades de los pulmones, bronquios (como neumonías bacterianas y condensación necrosante hemorrágica extensa del pulmón), aparato genitourinario, conducto gastrointestinal, hígado, vías biliares, piel, vagina y útero. Su forma de transmisión es



por contacto directo. *Klebsiella pneumoniae* es común en infecciones nosocomiales (Zinder 1997).

5.1.3.3 *Enterobacter cloacae*. Son bacterias que producen colonias elevadas, sin brillo metálico y más viscosas que las de *Escherichia coli*. Reaccionan positivo para citrato y ornitina descarboxilasa, producen gas a partir de la glucosa y no sintetizan ADNasa (enzima que degrada ácido desoxiribonucleico, ADN) (Brooks, 1999, Danis *et al.*, 1996).

En las personas sanas, la mayoría de especies se encuentran como comensales del tubo digestivo, pero en los enfermos hospitalizados pueden colonizar otras mucosas, de manera que su aislamiento aún en cultivo puro no permite diferenciar una colonización de la infección. Pueden producir ocasionalmente infecciones oportunistas en el tracto urinario, vías respiratorias, heridas, bacteriemias y sepsis por la administración de soluciones glucosadas contaminadas en perfusión intravenosa (Jawetz, 1987).

## 5.2 Mecanismos de Resistencia

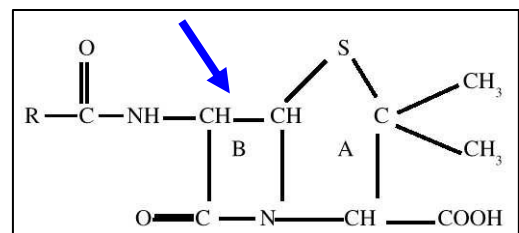
Se puede considerar a la resistencia antimicrobiana como la pérdida de la sensibilidad de un microorganismo a un antibiótico al que originalmente era susceptible. Este hecho involucra necesariamente la aparición de un cambio permanente en el material genético del microorganismo, que se transmite a sus descendientes, los que por este motivo resultan también resistentes al antibiótico en cuestión. Los cambios genéticos producidos dan lugar a diversos tipos de alteraciones bioquímicas en el metabolismo bacteriano, las cuales pueden ser de tres tipos generales:

- Cambios en el sitio de acción del antibiótico.
- Producción de enzimas que modifiquen a la droga.
- Disminución de la captación del antibiótico (Abarca *et al.*, 2001, Davis *et al.*, 1990, Nordase, 1998).

Las bacterias son capaces de producir enzimas llamadas beta-lactamasas las cuales son la causa más común de la resistencia bacteriana hacia los agentes antibióticos beta-lactámicos. Mediante mutaciones en el ADN han sido capaces de generar nuevas enzimas beta-lactamasas que inactivan a nuevos fármacos utilizados en su contra. Estas propiedades son transferidas mediante plásmidos, no sólo a la descendencia de una especie bacteriana, sino incluso a otras especies bacterianas. Estas enzimas inactivan los medicamentos beta-lactámicos al hidrolizar el anillo beta-lactámico de los mismos y actúan sobre la mayoría de penicilinas o cefalosporinas, aunque en algunas ocasiones, ambos tipos de antibióticos resultan inactivos. En las bacterias Gram negativo las enzimas permanecen dentro de la célula e inactivan los antibióticos beta-lactámicos en el espacio periplásmico, esto es, en el espacio entre la membrana externa y la membrana citoplásmica (Coyle, 2006, Gobernado, 2005, Livermore, 1995).

### 5.2.1 Las enzimas Beta-lactamasas.

Las beta-lactamasas son una familia de enzimas que hidrolizan el enlace amida cíclico de la penicilina G y otros beta-lactámicos, inactivando al antibiótico. En la actualidad se conocen alrededor de 300 enzimas



diferentes. La especificidad de la beta-lactamasa por un antibiótico beta-lactámico determinará la eficiencia con la cual la bacteria hidroliza al antibiótico. Estas pueden ser BLEE o beta-lactamasas de amplio espectro (BLEA) (Bush *et al.*, 2004, Morales, 2004, Navarro-Navarro *et al.*, 2005, Rosales, 1997, Wong-Bennger, 2001).

Los genes que codifican a las beta-lactamasas pueden ubicarse en el cromosoma bacteriano (por mutación), plásmidos o elementos de transposición (por transducción, transformación o conjugación). Los plásmidos y elementos de transposición refuerzan la diseminación de genes de beta-lactamasas entre una variedad de especies bacterianas (Bush *et al.*, 2004, Morales, 2004, Ramos *et al.*, 2006).

5.2.1.1 BLEA. Estas enzimas se han originado de las enzimas TEM-1, TEM-2 o SHV-1 tras sufrir diversas mutaciones que les confiere a las bacterias cierta resistencia a cefotaxima, ceftazidima y otras cefalosporinas de amplio espectro y aztreoman, pero no aportan resistencia a la acción de las cefamicinas o imipenem. Estas enzimas se encuentran codificadas en plásmidos, lo que les otorga una capacidad de diseminación entre distintas cepas. En las bacterias Gram negativo las más importantes de estas beta-lactamasas ligadas a plásmidos son la TEM-1 y en menor grado la SHV-1 (en *Klebsiella pneumoniae*) y la PSE-1 (en *Pseudomonas aeruginosa*) (Casellas *et al.*, 2005, Machado *et al.*, 2005, Mugnaioli *et al.*, 2006).

5.2.1.2 BLEE. Son enzimas que fenotípicamente se caracterizan por conferir resistencia a penicilinas, cefalosporinas (incluyendo tercera y cuarta generación) y monobactames, pueden ser inhibidas por inhibidores de beta-lactamasas, son capaces de hidrolizar las oximainocefalosporinas (cefotaxima, el ceftazidima y la ceftriaxona) y son inhibidas por el ácido clavulánico. Las cepas que producen BLEE, en su mayoría son enterobacterias (en particular *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*) su transferencia ocurre a través de plásmidos. Entre los microorganismos que producen beta-lactamasas cromosómicas se encuentran *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter diversus*, entre otros. El control genético de la producción de beta-lactamasas es inducido por un plásmido o cromosoma. Una gran cantidad de plásmidos provienen de las enzimas TEM-1, TEM-2 y SHV-1 con genes mutados, estas enzimas

confieren resistencia a penicilinas pero no a las nuevas cefalosporinas (Jones *et al.*, 2005, Giamarellou, 2005, Nordase, 1998, Rosales, 1997).

Bristianou *et al* (2008) en su trabajo “El impacto de la resistencia a multidroga y la patogenicidad de *Escherichia coli*: un estudio experimental” hacen énfasis en los resultados tan controversiales de los estudios clínicos sobre la mortalidad de la resistencia a múltiples fármacos. Emplearon monocitos aislados de donantes sanos contra cepas de *Escherichia coli* (10 cepas sensibles y 10 cepas multiresistentes y productoras de BLEE). Se indujo pielonefritis aguda en 48 conejos tras la inoculación de 4 cepas sensibles y 4 cepas multirresistentes. Se aislaron los monocitos de la sangre y se incubaron para estimar la liberación *ex vivo* del factor de necrosis tumoral alfa y otras citoquinas pro-inflamatorias. La conclusión del estudio fue que tanto las cepas sensibles como las multidroga resistente de *Escherichia coli* estimulan la liberación de monocitos y citoquinas pro-inflamatorias.

Conejo *et al* (2008) evaluaron la capacidad de 57 laboratorios de microbiología de España para la detección y notificación de los fenotipos de resistencia de los antibióticos betalactámicos en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Los laboratorios recibieron 6 aislamientos de cepas de *Escherichia coli* bien caracterizados productoras de BLEE en España (4 tipo CTX-M, 1 tipo TEM y 1 tipo SHV), 3 aislamientos de cepas productoras de enzimas tipo AmpC (2 mediada por plásmidos y 1 con hiperproducción mediada por cromosomas) y 3 cepas de control de calidad. El 90% de los laboratorios reconoce a todas las cepas productoras de BLEE correctamente, y por lo tanto, se observaron bajas tasas de error en las pruebas de cefalosporinas y aztreonam. Las mayores tasas de error fueron observadas con la combinación de penicilina e inhibidores de beta-lactamasas, aunque más del 60% de los casos se debieron a la interpretación hecha por los microbiólogos. Hubo un adecuado reconocimiento de todas las cepas productoras de beta-lactamasas tipo AmpC en solo el 47.4% de los laboratorios.

### 5.3 Epidemiología de la multiresistencia

#### 5.3.1 Epidemiología de las BLEA.

En 1963 se identificó por primera vez una beta-lactamasa de tipo TEM, la TEM-1, en una cepa clínica aislada en Grecia. En 1969 se identificó la TEM-2 y durante los 15 años siguientes no se encontraron nuevas TEM. Uno de los primeros países en detectar los primeros aislamientos clínicos de BLEA fue Alemania (1983), encontrándose *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación y sensibles a cefoxitina. Posteriores análisis demostraron que la resistencia de dichas cepas era debida a la producción de una beta-lactamasa plasmídica transferible derivada de SHV-1 que se denominó SHV-2. El brote nosocomial más importante descrito hasta el momento, tuvo lugar entre los años 1993-1995 en el Hospital de Bellvitge, España, el cual fue debido a la diseminación clonal de una cepa de *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEA. Este brote afectó a 150 pacientes, de los cuales el 69.9% estaban ingresados en la unidad de cuidados intensivos (Ardanuy, 2004).

De 1978 a 1986 fueron desarrollados nuevos beta-lactámicos, como las cefalosporinas de tercera generación, los monobactames y los inhibidores de beta-lactamasas. Las enzimas TEM-1 y TEM-2 eran incapaces de hidrolizar estos nuevos sustratos. En 1984 fue descrita la TEM-3, una variante de la TEM-2 que contiene tres cambios en su secuencia de aminoácidos y que es capaz de hidrolizar cefalosporinas de tercera generación. Estas nuevas enzimas constituyen una nueva clase que se conoce con el nombre de beta-lactamasas plasmídicas de espectro ampliado. Durante los siguientes siete años, se produjo una diversidad de beta-lactamasas de tipo TEM (Ardanuy, 2004).

En 1990, comenzaron a aislarse variantes de TEM con menor sensibilidad a los inhibidores de beta-lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam). Tras el uso tentativo de varias denominaciones, en la actualidad parece ampliamente aceptado el nombre de IRT (Inhibitor Resistant TEM) para estas nuevas enzimas, durante los últimos seis años las IRT y TEM de espectro ampliado han coexistido sin mezclar sus mutaciones (Ardanuy, 2004).

En 2005 se realizó un estudio en Guatemala en el Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS) en donde se determinó que el porcentaje de BLEAs encontrado (62%) fue más de cuatro veces mayor al porcentaje de BLEEs (14%) obtenido en el total de aislamientos, en donde *Escherichia coli* fue la enterobacteria con mayor porcentaje de aislamientos positivos para BLEA (42%) y BLEE (14%) de un total de 382 aislamientos (Nájera, 2005).

### 5.3.2 Epidemiología de las BLEE.

Las primeras cepas reportadas como productoras de BLEE pertenecían a las especies de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* y fueron causantes de brotes de infección nosocomial en los Estados Unidos de América. Estas cepas han ocasionado brotes de infección intrahospitalaria con multirresistencia a los antibióticos, dificultando el tratamiento y aumentando la morbi-mortalidad nosocomial. Los factores de riesgo para la colonización o infección son la duración del tiempo de exposición a una cepa epidémica, estancia hospitalaria prolongada, ingreso a la unidad de cuidados intensivos, cateterización arterial y urinaria, administración de cefalosporinas de tercera generación y la frecuencia del contacto con personal sanitario (Aliaga, 2001, Fuster *et al.*, 2003, Gold *et al.*, 1996).

Un estudio realizado en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España, entre 1997 y 1999 demostró la presencia de enterobacterias productoras de BLEE y cefamicinasas (por el método de disco de difusión), con los siguientes resultados: 35 cepas de *Escherichia coli*, 9 de *Klebsiella pneumoniae*, 2 cepas de *Salmonella enterica* y una de *Proteus mirabilis*, portadoras de las enzimas investigadas (n=13 800 cepas de enterobacterias). Las *Escherichia coli* productoras de BLEE fueron 27 cepas de CTX-M-9, 6 cepas de SHV-2, 1 cepa de TEM-10 y 1 cepa de TEM-12. La CTX-M-9 actualmente predominante ha aumentado su incidencia cinco veces respecto al trienio anterior (1994-1996) (Pérez, 1999).

Un estudio sobre cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE realizado en la comarca de Bierzo España, entre 2001 y 2002 señaló que la frecuencia de producción de BLEE en *Escherichia coli* encontrada en dicha área de salud fue baja (0.6%) y similar a la media (0.5%) obtenida en un estudio multicéntrico español. Varios estudios realizados en España, indican que la incidencia ha oscilado entre un 0 y 2.4%. La mayor parte de cepas (85%) ha sido de

procedencia extrahospitalaria, porcentaje mayor al obtenido en otros estudios. Es este sentido, en los últimos años se viene observando un incremento importante en la frecuencia de aislamientos extrahospitalarios, hecho destacable ya que inicialmente el hallazgo de estas cepas se limitaba al ámbito hospitalario (Fuster *et al.*, 2003).

Otro estudio realizado en Perú, durante los meses de octubre y noviembre del año 2000 se determinó la diversidad genética de 10 aislamientos bacterianos provenientes de pacientes hospitalizados y muestras ambientales procedentes de una unidad de cuidados intensivos de neonatos de un hospital de Lima, utilizando el patrón de banda de ADN ribosomal y plasmídico. Posteriormente, se caracterizó la resistencia antimicrobiana y sus principales factores utilizando electroforesis de punto isoeléctrico, Southern blotting y PCR. Finalmente se evaluó la capacidad de transferencia de la resistencia mediante ensayos de conjugación bacteriana. En todos los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* se observó el mismo perfil plasmídico. Los aislamientos de *Enterobacter cloacae* mostraron un mismo patrón genético, además se encontraron cuatro genotipos distintos de *Klebsiella pneumoniae* altamente relacionados. Todos los aislamientos produjeron BLEE de tipo SHV-5 transferible a otras especies (Aliaga, 2001).

En abril de 2001 a abril de 2002, un estudio realizado en Colombia en el Hospital Universitario Clínica San Rafael de Bogotá, se caracterizaron microbiológicamente y molecularmente aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE. Se tipificaron 15 aislamientos por electroforesis en gel del campo pulsado (PFGE) y por amplificación de secuencias de ADN repetidas (REP-PCR). La susceptibilidad antimicrobiana y la producción de BLEE se determinaron de acuerdo con las normas de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Las beta-lactamasas se evaluaron por isoelectroenfoque y PCR. El 80% de estos aislamientos se asociaron con infección nosocomial y de éstos, el 91.7% provenía de unidades de cuidados intensivos. En la mayoría de los aislamientos se detectó producción simultánea de beta-lactamasas del tipo TEM y SHV y el 93.3% produjo ceftazidimasa de punto isoeléctrico 8.2 del tipo SHV-5; los 15 aislamientos fueron agrupados por PFGE y REP-PCR en 11 y 12 patrones electroforéticos respectivamente (Wong-Beringer, 2001).

En Guatemala en el año 2005 se realizó un estudio en uno de los hospitales nacionales, Hospital General San Juan de Dios (HGSJD), en donde se detectó un alto porcentaje de cepas productoras de BLEE, 69.6%, siendo *Klebsiella pneumoniae* la bacteria que se aisló en mayor proporción que *Klebsiella oxytoca* (5:1). Las salas en donde se presentó un mayor porcentaje de cepas productoras de estas enzimas fueron las Unidades de Cuidados Intensivos de Neonatos (UCIN) y la Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP), siendo las muestras en donde se encontraban con mayor frecuencia los aspirados orotraqueales y orina (Itzep, 2005).



## 5.4 Métodos de detección de resistencia antibiótica

Los métodos de susceptibilidad antimicrobiana o antibiogramas son métodos *in vitro* que determinan la susceptibilidad de los microorganismos a una variedad de agentes antimicrobianos, bajo condiciones de laboratorio específicas y estandarizadas. La meta principal del estudio de susceptibilidad es proveer al clínico algunas recomendaciones sobre la terapia que puede ser más apropiada en pacientes con una infección específica. No obstante, la correlación exacta entre los resultados *in vitro* y la respuesta clínica es muchas veces difícil de predecir, ya que existen numerosos factores que influyen la interacción de agentes antimicrobianos y microorganismos en un determinado paciente. La metodología usada para realizar el estudio de susceptibilidad toma en consideración algunos de estos factores para determinar más eficientemente cómo un microorganismo podría responder *in vivo* a un determinado antibiótico (Palavecino, 1997).

### 5.4.1 Dilución en agar.

Es considerado el método de referencia. En este método, placas conteniendo una determinada concentración de un antibiótico son inoculadas con el microorganismo en estudio y luego incubadas por 16 a 18 horas. Después de la incubación, se examina si el organismo crece o no en cada una de las placas, con lo cual se determina la CIM para el antibiótico. Por ejemplo, si una cepa de *Staphylococcus aureus* crece en una placa que contiene una concentración de oxacilina de 0,06 ug/ml pero no crece en una placa con una concentración de oxacilina 0,12 ug/ml, significa que la CIM de oxacilina que se requiere para inhibir a ese organismo es 0,12 ug/ml (Palavecino, 1997).

### 5.4.2 Dilución en caldo.

En este caso, tubos (macrodilución) o microplacas (microdilución) contienen concentraciones crecientes de un determinado antibiótico. El microorganismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pocillos de la microplaca y la CIM es determinada después de la incubación, de la misma forma descrita anteriormente para el método de la dilución en agar (Palavecino, 1997).

#### 5.4.3 Difusión en disco.

El principio de las pruebas de difusión por disco ha sido utilizado por más de 70 años en los laboratorios de microbiología. Los doctores Bauer, Kirby, Sherris y Turck en 1966 publicaron su estudio cimero describiendo la prueba que se usa en la actualidad. El CLSI adoptó los pasos básicos del procedimiento descritos en el estudio de Bauer como el método de referencia para difusión por disco (Coyle, 2006).

Lamy *et al* (2004) indican que las pruebas de sensibilidad antibiótica en disco deben ser eficaces ya que en un contexto clínico deben predecir el régimen de antibióticos eficaces para la bacteria. Este enfoque implica que la prevalencia de susceptibilidad afecta el valor predictivo de susceptibilidad reportada. Por lo que se cuantificó la influencia de la prevalencia de susceptibilidad con respecto al rendimiento del método de difusión en disco. Sin embargo, las consecuencias sobre la determinación de éstos resultados se discuten. Los investigadores sugieren examinar con mayor rigor la prevalencia de susceptibilidad en los estudios en la determinación del diámetro de la zona de inhibición, volver a evaluar la consistencia de punto de interrupción de difusión en disco y la estimación de las consecuencias de un consenso internacional sobre la predicción de un punto de corte basado en calidad y la gestión adecuada.

#### 5.4.4 Determinación de la CIM por la técnica de microdilución en placa.

La CIM es la mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba. Se determina la concentración en el laboratorio incubando una cantidad conocida de bacterias con diluciones definidas del agente antimicrobiano. Utilizando los criterios de interpretación del CLSI y los resultados son interpretados como susceptible, intermedio o resistente. Las pruebas de la CIM pueden ser realizadas usando como medios de cultivo en caldo o agar, pero la microdilución en caldo es el método más utilizado en los laboratorios clínicos (Coyle, 2006).

Existen varios estudios en donde se ha utilizado este método para determinar la actividad antibacteriana, incluyendo estudios con plantas, entre estos se pueden mencionar los siguientes:

- Torres-Rodríguez *et al* (1997) analizaron la sensibilidad *in vitro* de 40 cepas pertenecientes al género *Candida* y 10 de *Hansenula anomala* determinando las CIM con el E-

test y con el micrométodo de referencia en medio líquido estandarizado según las recomendaciones del CLSI y utilizando cepas de referencia como control de calidad. Utilizaron microplacas de 96 pocillos, estériles y de fondo plano. El medio de cultivo utilizado fue el RPMI + 2% de glucosa. Las concentraciones de los antifúngicos fueron de 0,03 a 64 µg/ml excepto en el pocillo número 12 que fue utilizado para el control de crecimiento. Se emplearon cultivos de 24 h en medio de agar glucosado de Sabouraud y se realizó suspensión en solución para una densidad equivalente al 0,5 de la escala McFarland. Las placas se incubaron a 37°C y las lecturas se hicieron a las 24 y 48 h en un espectrofotómetro a 492 nm para los azoles y 5-fluorocitosina y a 610 nm para la anfotericina B. Las CIMs se determinaron como el 80% de crecimiento en relación al pocillo control. Todas las pruebas se efectuaron por duplicado. En este estudio se comprobó que la concordancia entre el micrométodo de referencia y el E-test es elevada pero variable dependiendo del antifúngico y la especie de levadura considerada. En un número importante de cepas las CIM del E-test resultaron inferiores a las proporcionadas por el micrométodo de dilución en medio líquido.

- Morales *et al* (2001) determinaron la susceptibilidad antibiótica de *Streptococcus pneumoniae* por medio de la técnica de microdilución en placa. Este estudio fue descriptivo de *S. pneumoniae*, se evaluaron cepas aisladas de niños menores de 5 años procedentes de diferentes hospitales del país. La CIM se realizó para penicilina, cloranfenicol y cotrimazol siguiendo las pautas establecidas por la CLSI. Se observó susceptibilidad disminuida a penicilina en 26.7%, sensibilidad intermedia en 13.3% y resistencia alta en 13.3%. En 21 aislamientos (70%) observó resistencia a dos antimicrobianos y multiresistencia en 2 (6.7%); por lo que al finalizar el estudio determinaron la presencia de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina y a otros antimicrobianos, lo que nos obliga a mantener su vigilancia epidemiológica.

- Zampini *et al* (2007) evaluó la actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico resistentes, en donde el propósito del estudio fue determinar la potencia antimicrobiana de extractos alcohólicos de plantas utilizadas popularmente en Argentina como antisépticos y antiinflamatorios: *Dasyphyllum diaconthoides*, *Erythrina cristagalli*, *Larrea cuneifolia*, *Larrea divaricata*, *Phytolacca dioica*, *Pithecoctenium cynanchoides*, *Prosopanche americana*, *Schinus molle*, *Schkuhria pinnata*, *Senna aphylla* y *Solidago chilensis*. La inhibición

del crecimiento bacteriano se determinó a través de ensayos de difusión en agar, macrodilución en medio sólido y microdilución en medio líquido frente a 47 aislamientos clínicos multirresistentes a antibióticos, obtenidos de pacientes de un hospital de Tucumán, Argentina: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*.

Por el método de microdilución en medio líquido se determinaron los valores de CIM y concentración bactericida mínima (CBM) de los fitocomplejos en estudio contra los organismos de prueba, siguiendo recomendaciones del CLSI 2006. Los extractos fueron transferidos a pocillos de policubetas estériles de modo de obtener una dilución seriada al doble (25 a 1.000  $\mu\text{g}$  de compuestos fenólicos/mL). 100 $\mu\text{L}$  de cada suspensión bacteriana ( $5 \times 10^5$  UFC) se colocaron en cada uno de los pocillos. Se realizaron controles de esterilidad, viabilidad bacteriana, controles positivos con los agentes antimicrobianos comerciales y controles negativos. Las placas se incubaron aeróbicamente a 35°C durante 16-20 h. Al término de la incubación, el crecimiento bacteriano fue evaluado espectrofotométricamente midiendo los valores de absorbancia a 625 nm mediante un lector de ELISA (BioRad). Los valores de CIM fueron determinados para levofloxacin, piperacilina/tazobactam, imipenem, meropenem, ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima, cefuroxima, cefepima, amikacina y ampicilina/sulbactam frente a bacterias gram negativas.

De acuerdo con los valores de CIM, tres de las once especies ensayadas fueron las más activas: *Larrea divaricata*, *Larrea cuneifolia*, y *Senna aphylla* (CIM de 25 a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia* fueron las cepas más susceptibles con valores de CIM entre 25 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  seguido por *Pseudomonas aeruginosa* con valores de CIM de 50 a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$

- Pesewu *et al* (2008) publican la actividad antibacteriana de plantas utilizadas como medicina tradicional en Ghana con particular referencia a *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA), en donde un estudio etnobotánico realizado en el distrito de Akwapim-norte de la República de Ghana, reporta que 25 especies de plantas son utilizadas en medicina

tradicional para tratar enfermedades de la piel. Utilizaron extractos acuosos, clorofórmicos y etanólicos y realizaron las pruebas de difusión, CIM y CBM. De los 13 extractos utilizados inhibieron uno o más de las bacterias evaluadas (MRSA, *Staphylococcus aureus* sensible, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus vulgaris*) y 11 de estos 13 extractos inhibió el crecimiento de 3 o más cepas clínicas de MRSA.

- Muraina *et al* (2009) desarrollaron un método reproducible para la determinación de la CIM de extractos de plantas contra micoplasmas de crecimiento lento en donde los micoplasmas son microorganismos exigentes que requieren medios especializados para su crecimiento, aislamiento e identificación. No existen pruebas estandarizadas para evaluar la susceptibilidad *in vitro* de los micoplasmas a los extractos de plantas medicinales. Se realizó la determinación de la CIM adaptada y evaluada contra un extracto cetónico de *Anoigeissus leiocarpus* contra aislamientos de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* y se desarrollo el método que hace posible evaluar los extractos de varias especies de plantas contra la actividad antimicoplasmal.

- Bär *et al* (2009) publicaron su investigación en donde desarrollaron un método rápido para la determinación de la CBM de antibióticos por medio de la técnica de la microdilución en placa con fluorescencia. Ellos utilizaron cepas de referencia de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, además de aislamientos clínicos de las mismas especies de bacterias. Tomaron el método de la guía de la CLSI modificado por Hacek *et al* en 1999. Tomaron 100 µl de cultivo fresco de bacterias los cuales fueron añadidos en cada pozo en una concentración de  $2.5 \times 10^5$  UFC. Se incubó la microplaca por toda la noche. Las UFC fueron determinadas mediante la dilución de cada pozo en diluciones “tenfold”. De cada dilución, se tomaron alícuotas y se transfirieron a placas de agar y se incubaron durante la noche. Al día siguiente, se evaluó el número de colonias, fue evaluado y calculado retrospectivamente por las UFC iniciales. En donde determinaron que este método si es comparable con el de referencia, excepto en algunos antibióticos para cepas de *Escherichia coli*.

- Askun *et al* (2009) determinaron la composición fenólica de 2 especies de tomillo (Lamiaceae), *Origanum minutiflorum* O. Schwarz y P.H. Davis y *Thymbra spicata* L. var. *spicata*. Evaluaron su actividad antibacteriana y antimicobacteriana en donde la actividad de los extractos

de metanol de estas plantas se da por primera vez y se realizó la determinación de la CIM por el método de microdilución de acuerdo con las directrices de la norma del CLSI y Koo *et al* (2000), se utilizaron microplacas estériles 96 pozos para el ensayo. *Thymbra spicata* var *spicata* mostró un alto nivel de actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis* (CIM 196 lg/ml), y actividad moderada (CIM 640 lg/ml) contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter aerogenes* y *Staphylococcus epidermidis*. Carvacrol, ácido rosmarínico, hesperidina y naringenina fueron identificados como los principales compuestos fenólicos para *Thymbra spicata* var *spicata*. Carvacrol, ácido rosmarínico, eriodictiol y luteolina fueron identificados como los principales compuestos fenólicos para *Origanum minutiflorum*.

- Coutinho *et al* (2009) realizaron la evaluación de terapia natural asociada a la terapia antibiótica como una potenciación de la actividad antibiótica contra MRSA utilizando *Turnera ulmifolia* L. Utilizaron un extracto etanólico de *Turnera ulmifolia* y del aminoglucósido clorpromazina para comprobar su actividad independiente o combinada frente a las cepas de MRSA. La sinergia del extracto etanólico y los aminoglucósidos fueron verificados por el método de microdilución utilizando caldo BHI y suspensiones bacterianas de 10<sup>5</sup> UFC/ml y un rango de concentración de las drogas de 1024 a 1 mg/ml (duplicado). Se encontró un efecto sinérgico del extracto con la kanamicina y la gentamicina. Del mismo modo, se demostró un efecto potenciador de la clorpromazina sobre la kanamicina, gentamicina y la neomicina, lo que indica la participación de un sistema de bombas de eflujo para la resistencia a los aminoglucósidos. Por lo que se sugiere que los extractos de *Turnera ulmifolia* podría utilizarse como una fuente natural que modifican la actividad de la resistencia de estas bacterias.

#### 5.4.5 Pruebas para la detección o identificación de beta-lactamasas.

La mayoría de los métodos descritos para detectar bacterias productoras de BLEE han sido diseñados para enterobacterias y se fundamentan en el carácter inhibible de estas enzimas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de beta-lactamasas. Existen también otros métodos basados en bioensayos, en el análisis del perfil de sustrato o en técnicas moleculares, aunque son más propios para su caracterización (Oliver *et al.*, 2000).

5.4.5.1 Métodos de detección basados en la utilización de inhibidores de beta-lactamasas. Son los métodos más sencillos y más difundidos en los laboratorios clínicos, el cual es denominado aproximación de discos o también de doble difusión con discos. Consiste en la disposición de un disco convencional de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg) en el centro de una placa a una distancia de 20 mm de otros con ceftazima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), aztreonam (30 µg) y cefepima. La ampliación de alguno de los halos de inhibición manifiesta la producción de la BLEE (Itzep, 2005, Livermore, 1995, Machado *et al.*, 2005).

5.4.5.2 Diferentes sistemas comerciales basados en la utilización de inhibidores de beta-lactamasas.

- Pruebas de detección “Tamizaje” de BLEE. Para identificar potenciales productoras de BLEE utilizando los nuevos límites de difusión por disco y CIM (Abarca *et al.*, 2001, Camacho-Molina *et al.*, 2004).

- Pruebas confirmatorias de BLEE. Las potenciales productoras de BLEE son analizadas tanto con cefotaxima y ceftazidima solas en combinación con ácido clavulánico (Itzep, 2005, Machado *et al.*, 2005, Mulvey *et al.*, 2005).

- Tiras de E-test®. Contienen en una parte de ellas concentraciones decrecientes de la cefalosporina y en la otra la misma cefalosporina con una concentración fija de ácido clavulánico (2 µg por cada concentración (Abarca *et al.*, 2001, Camacho-Molina *et al.*, 2004)

- Sistemas automáticos. Determinan la sensibilidad a los antimicrobianos que han recogido esta experiencia y tienden a incluir simultáneamente cefotaxima y ceftazidima con ácido clavulánico (Oliver *et al.*, 2000).

- Prueba de Masuda. Consiste en la disposición de un microorganismo indicador sensible (*Escherichia coli* ATCC 25922) a los substratos hidrolizados (cefotaxima, ceftazidima o aztreonam) por la beta-lactamasa que se pretende detectar. Estos substratos se colocan en un disco (sirven los discos comerciales) y en las zonas marginales del halo de inhibición, discos de papel impregnados con el extracto, generalmente obtenido por sonicación, del microorganismo a

estudiar. La distorsión de halo de inhibición en el microorganismo censor nos indica la presencia de la BLEE (Oliver *et al.*, 2000).

- Método tridimensional. Es engorroso de realizar pero tiene la ventaja de utilizar diferentes sustratos, este hecho permite, al menos cualitativamente, determinar el perfil de sustrato del enzima presente en el microorganismo a estudiar. La distorsión de los halos de inhibición nos indicará el perfil de sustrato de la enzima (Oliver *et al.*, 2000).



## 5.5 Tratamiento de infecciones con quimioterapia antibacteriana

Desde el siglo XVII se emplean fármacos para el tratamiento de enfermedades infecciosas, sin embargo la quimioterapia como ciencia se inició con Paul Erlich en el primer decenio del siglo XX. Ehrlich formuló los principios de la toxicidad selectiva e identificó relaciones químicas específicas entre microorganismos patógenos y fármacos, el desarrollo de la resistencia a fármacos y la función terapéutica combinada (Hardman *et al.*, 2003).

Los antibióticos son sustancias producidas por diversas especies de microorganismos que suprimen el crecimiento de otros microorganismos. El uso común a menudo extiende el término antibiótico para incluir antimicrobianos sintéticos, como sulfonamidas y quinolonas. Los antibióticos muestran diferencias notables en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en sus espectros de acción y mecanismos de acción (Hardman *et al.*, 2003).

Un antimicrobiano ideal muestra toxicidad selectiva. Este término indica que el antibiótico es nocivo para un parásito sin dañar al huésped. La toxicidad selectiva casi siempre es relativa y no absoluta; esto significa que un fármaco en concentración tolerada por el huésped puede dañar a un microorganismo infectante (Hardman *et al.*, 2003).

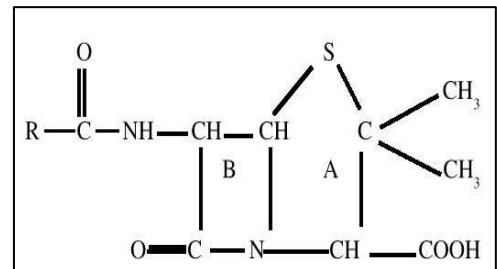
La clasificación más común se ha basado en la estructura química y el mecanismo de acción propuesto y así se consideran:

- Afectan la síntesis de pared celular: entre ellos están penicilinas y cefalosporinas, que guardan semejanza estructural.
- Inhibición de las funciones de la membrana celular: afectan su permeabilidad y permiten la fuga de compuestos intracelulares, entre ellos están los detergentes, como polimixina y los antimicóticos poliénicos.
- Inhibición de la síntesis de las proteínas: afectan las subunidades ribosómicas 30S o 50S y causan inhibición reversible de la síntesis proteínica.
- Inhibición de la síntesis de los Ácidos nucleicos: como las rifampicinas que bloquean a la polimerasa ARN, y las quinolonas que inhiben a las topoisomerasas (Hardman *et al.*, 2003).

### 5.5.1 Antibacterianos que afectan la síntesis de pared celular.

Los antibióticos beta-lactámicos son productos útiles que se recetan frecuentemente y comparte una estructura y un mecanismo de acción comunes, es decir, la inhibición de la síntesis de la pared de peptidoglucano de la bacteria. Entre sus clases importantes cabe referir a las penicilinas G y V, muy activas contra cocos Gram positivo sensibles; penicilinas resistentes a penicilinasa como la nafcilina, con efectos contra *Staphylococcus aureus* productores de penicilinasa. Las cefalosporinas se clasifican por “generaciones”; la primera incluyo compuestos con actividad contra microorganismos Gram positivo, pero moderada contra Gram negativo; la segunda comprendió productos con actividad un poco mayor contra Gram negativo y algunos medicamentos con efectos contra anaerobios; la tercera tiene compuestos con menor actividad contra Gram positivo y posee acción mucho más intensa contra *Enterobacteriaceae*, y un subgrupo activo contra *Pseudomonas aeruginosa*; la cuarta generación tiene entre sus miembros productos con un espectro semejante al de la tercera, pero una mayor estabilidad a la hidrólisis por beta-lactamasas. La resistencia bacteriana a los betalactámicos sigue en aumento con un ritmo impresionante. Entre los mecanismos de resistencia están, no solamente la producción de beta-lactamasa que destruyen los antibióticos, sino alteraciones en las proteínas que se ligan a penicilina, lo mismo que disminuciones de: a) la penetración activa del antibiótico a la célula, y b) la salida activa de la misma (Brooks, 1999, Hardman *et al.*, 2003).

5.5.1.1 Penicilina. Las penicilinas constituyen uno de los grupos de antibióticos de mayor importancia. Desde que fue posible contar con la primera penicilina, han surgido otros antimicrobianos, pero sigue siendo uno de los más importantes y de mayor uso, y se siguen sintetizando nuevos derivados del núcleo penicilínico básico. La estructura básica de las penicilinas, incluye



un anillo de tiazolidina unido a otro anillo betalactámico que esta unido a una cadena lateral. El propio núcleo de penicilina es el elemento estructura fundamental de actividad biológica; la transformación metabólica de la alteración química de esa parte de la molécula hace que se pierda toda acción bacteriana importante. Se han producido por penicilinas naturales con base en la composición química del medio de fermentación utilizado en el cultivo de *Penicillium*. La

penicilina G (bencilica) es la que presenta mayor actividad antimicrobiana de todas y la única penicilina natural que se utiliza en clínica (Hardman *et al.*, 2003, Murria, 1995).

5.5.1.2 Cefalosporinas. Son compuestos beta-lactámicos con núcleo de ácido 7-aminocefalosporano, las cefalosporinas naturales tiene poca actividad antibacteriana. El mecanismo de acción de acción de las cefalosporinas es análogo al de las penicilinas:

- Unión a PBPs específicas sobre las bacterias que sirven como receptores del fármaco.
- Inhibición de la síntesis de la pared celular al impedir la transpeptidación de los peptidoglucanos.
- Activación de las enzimas autolíticas en la pared celular que pueden provocar lesiones mortales para la bacteria (Hardman *et al.*, 2003).

Las cefalosporinas tienden a ser resistentes a las beta-lactamasas producidas a los estafilococos y las bacterias Gram negativo comunes que hidrolizan e inactivan muchas penicilinas (Hardman *et al.*, 2003).

Para referirse con facilidad a las cefalosporinas se les clasifica en 3 grupos principales o generaciones:

- Cefalosporinas de primera generación: Aparecieron en la década de los 60 (1964-1969). Son muy activas contra cocos Gram positivo, excepto enterococos y estafilococos resistentes a la meticilina, y moderadamente activos contra algunos bacilos Gram negativo.
- Cefalosporinas de segunda generación: Aparecieron en la década del 70 (1970-79). Todas son activas contra microorganismos susceptibles a fármacos de la primera generación pero tiene mayor cobertura contara bacilos Gram negativo.
- Cefalosporinas de tercera generación: Aparecieron en la década del 80 (1980- 89). Algunas muestran menor actividad contra los cocos Gram positivo. La mayor parte de éstas son activas contra los estafilococos pero la ceftacidima es débilmente activa. Una ventaja es su mayor actividad contra los bacilos Gram negativo.
- Cefalosporinas de cuarta generación: La cefepima es la única cefalosporina de cuarta generación de uso clínico en la actualidad. La actividad contra los estafilococos y los

estreptococos susceptibles a la nafcilina es mayor que la ceftacidima y comparable a otros compuestos de la tercera generación (Hardman *et al.*, 2003, Jawtz, 1987).

5.5.1.3 Inhibidores de beta-lactamasas. Algunas moléculas se ligan a las Beta-lactamasas, las inactivan y así evitan la destrucción de los antibióticos betalactámicos que sirven de sustratos para dichas enzimas. Los inhibidores de la beta-lactamasa tienen mayor acción contra Beta-lactamasas codificadas por plásmidos, pero son inactivas a las concentraciones que se alcanzan en seres humanos contra beta-lactamasas cromosómicas de tipo I inducidas en bacilos Gram negativo por medio de tratamiento con cefalosporinas de segunda y tercera generación (Brooks *et al.*, 1999)

El ácido clavulánico tiene muy poca actividad antimicrobiana intrínseca, pero es un inhibidor suicida de beta-lactamasas producidas por muy diversos microorganismos Gram positivo y Gram negativo. La combinación de amoxicilina y clavulanato es eficaz contra cepas de estafilococos productoras de beta-lactamasas, *Haemophyllus influenzae*, gonococos y *Escherichia coli*. (Brooks *et al.*, 1999)

El ácido clavulánico es el inhibidor de  $\beta$ -lactamasas más estudiado y caracterizado y tiene escasa actividad antibacteriana. Aunque tiene buena actividad frente a *Neisseria gonorrhoeae* y *Legionella pneumophila*, productores de penicilinas por afinidad a las PBP2, tiene una pobre actividad frente a miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, así como frente a anaerobios y Gram positivo. Es un buen inhibidor de las penicilinas plasmídicas y cromosómicas de las clases II a la V de la clasificación de Richmond; también es activo frente a unas pocas cefalosporinas producidas por *Bacteroides* spp., *Proteus vulgaris* y *Pseudomonas*. Tiene baja afinidad por las enzimas de la clase I (Brooks *et al.*, 1999).

Se han descrito fallos en el tratamiento clínico debidos a la inducción de la actividad  $\beta$ -lactamasa en organismos previamente sensibles al ácido clavulánico. El ácido clavulánico, en combinación con la ampicilina, reduce la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la ampicilina para *Staphylococcus aureus* meticilin resistente y *Staphylococcus epidermidis*. *Bacteroides fragilis*, *Mycobacterium tuberculosis* y Nocardiosis (Brooks *et al.*, 1999).

### 5.5.2 Acción antimicrobiana por inhibición de las funciones de la membrana celular.

El citoplasma de toda célula viviente esta unida a la membrana citoplásmica que sirve como barrera de permeabilidad selectiva y actúa como transporte activo y por tanto, controla la composición interna de la célula (Brooks, 1999, Hardman *et al.*, 2003).

5.5.2.1 Polimixina B y colistina. La polimixina B y colistina son semejantes, en acción y se limitan a bacterias Gram negativo. Las polimixinas son medicamentos antipáticos tensoactivos que contienen grupos lipófilos y lipófilos dentro de la molécula. Interactúan potencialmente con fosfolípidos y penetran en la estructura de membranas de bacterias que finaliza en lisis. La sensibilidad a la polimixina B depende del contenido fosfolipídico del complejo membrana-pared bacteriana. La pared celular de algunas bacterias resistentes puede impedir la penetración del fármaco en la membrana. En este mecanismo, las polimixinas actúan sobre las bacterias Gram negativo, y los polienos con acción sobre hongos. Los polienos requieren enlazarse a un esteroles presente en la membrana celular del hongo pero ausente en la membrana celular de bacterias (Brooks *et al.*, 1999, Hardman *et al.*, 2003).

### 5.5.3 Acción antimicrobiana por síntesis de las proteínas.

Se ha establecido que el cloranfenicol las tetraciclinas, aminoglicosidos, eritromicinas y lincomicinas pueden inhibir la síntesis de proteínas en las bacterias (Hardman *et al.*, 2003).

5.5.3.1 Aminoglucósidos. Son bactericidas rápidos que se difunden por medio de canales acuosos formados por porinas, proteínas que se encuentran en la membrana externa de bacterias Gram negativo y penetran al espacio periplásmico. La primera etapa es la unión del aminoglucósido a una proteína receptora específica sobre la subunidad 30s del ribosoma microbiano. Segunda, el aminoglucósido interrumpe la actividad del complejo de inicio, de la formación del heptodo. Tercera: en la región del reconocimiento sobre el ribosoma el mensaje del mRNA se lee de manera errónea, en consecuencia se introduce un aminoácido equivocado en el péptido y como resultado se produce una proteína no funcional. Cuarto: la unión del aminoglucósido rompe los polisomas y los separa en monosomas incapaces de sintetizar proteínas. Estas reacciones ocurren de manera casi simultánea. Y el efecto total en general es un

efecto irreversible: la muerte de la bacteria. Las alteraciones de estas moléculas afectan sobremanera la unión y acción ulterior de dicho antibiótico. Los aminoglucósidos perturban el ciclo normal de la función ribosómica al interferir en el inicio de la síntesis proteínica y así se acumulan complejos anormales de inicio o monosomas de estreptomicina. Otro efecto de estos antibióticos es su capacidad de inducir lectura errónea de la plantilla de ARNm, ya que con ello se incorporan aminoácidos incorrectos en las cadenas polipépticas en crecimiento. Entre los aminoglucósidos más comunes se encuentran: gentamicina, estreptomicina, tobramicina, amikacina, neftilmicina, kanamicina y neomicina (Brooks *et al.*, 1999, Hardman *et al.*, 2003, Jawetz, 1987).

5.5.3.2 Tetraciclinas. Tienen una gran gama de acción contra bacterias Gram negativo y Gram positivo aerobias y anaerobias. Son también eficaces contra algunos microorganismos resistentes a antimicrobianos activos contra la pared bacteriana. Inhiben la síntesis de proteína al ligarse al ribosoma bacteriano 30S e impedir la adhesión del RNA aminoacilo cargado por tanto evitan introducción de aminoácidos nuevos a la porción naciente del péptido. Entran a las bacterias Gram negativo por difusión pasiva a través de los canales hidrófilos formados por porinas, proteínas de la membrana externa del patógeno y transporte activo por un sistema que depende de energía y que bombea todas las tetraciclinas a través de la membrana citoplasmática. En concentraciones elevadas alteran la síntesis de proteínas en células de mamíferos. La resistencia en las tetraciclinas se debe a cambios en la permeabilidad de la envoltura de la célula microbiana (Brooks *et al.*, 1999).

5.5.3.3 Cloranfenicol. Inhibe la síntesis de proteínas en bacterias y en menor grado en células eucariotas. Penetra fácilmente a la célula, tal vez por difusión facilitada y actúa al unirse de manera reversible a la subunidad ribosómica 50s que interfiere con la unión de nuevos aminoácidos sobre la cadena naciente del péptido, principalmente por que inhibe la peptidiltransferasa. Éste evita la unión del extremo con el aminoácido al sitio aceptor en la subunidad ribosómica 50S. De esta manera no produce la interacción entre la peptidil transferasa y su aminoácido que actúa como sustrato y tampoco se forma el enlace peptídico. El cloranfenicol es bacteriostático y el crecimiento de los microorganismos se reestablece cuando se

interrumpe la administración del fármaco. Los microorganismos resistentes producen la enzima cloranfenicol aciltransferasa que suprime su actividad (Brooks *et al.*, 1999).

5.5.3.4 Macrólidos. Son compuestos bacteriostáticos que inhiben la síntesis de proteínas al ligarse en forma reversible a subunidades ribosómicas 50S de microorganismos sensibles. Pueden interferir con la formación de los complejos de inicio para la síntesis de las cadenas del péptido o con las reacciones de translocación del aminoacilo. Las bacterias resistentes carecen del receptor asociado sobre el ribosoma, esto puede estar bajo control del plásmido o de ribosomas. Los diferentes macrólidos son eritromicina, claritromicina y azitromicina (Murria *et al.*, 1995).

5.5.4 Acción antimicrobiana por inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos.

5.5.4.1 Rifampicina. Son un grupo de antibióticos macrocíclicos complejos con estructuras semejantes a las producidas por *Streptomyces mediterranei*. Un derivado semisintético es la rifampicina B. La rifampicina inhibe el crecimiento bacteriano al enlazar fuertemente a la ARN polimerasa dependiente de ADN de la bacteria, así se inhibe la síntesis de ARN bacteriano. El sitio de acción de la rifampicina es la subunidad beta de este complejo enzimático. Este antibiótico bloquea la síntesis de ARN en la mitocondria de mamíferos, pero se necesitan concentraciones mucho mayores para inhibir la enzima bacteriana. Es bactericida para microorganismos intra y extracelulares. La resistencia a la rifampicina se debe al cambio en la RNA polimerasa causado por una mutación cromosomita muy frecuente (Jawetz, 1987 Murria *et al.*, 1995).

5.5.4.2 Quinolonas y fluoroquinolonas. Todas las quinolonas y fluoroquinolonas inhiben la síntesis de ADN microbiano al bloquear la ADN girasa. Estos antibióticos están dirigidos contra la ADN girasa y la topoisomerasa IV bacterianas. Para muchas bacterias la topoisomerasa IV es la actividad primaria inhibida por las quinolonas. En contraste, para muchas bacterias Gram negativo la girasa de ADN es el blanco primario de la quinolona. Entre las quinolonas se encuentran la ciprofolxacina y la ofloxacin. Estos productos tienen pequeña importancia por su limitada utilidad terapéutica y la aparición rápida de resistencia bacteriana. El uso de fluoroquinolonas al parecer se acompaña de un número relativamente menor de efectos adversos

y la resistencia microbiana por su acción no surge con rapidez (Brooks *et al.*, 1999, Coyle, 2006, Hardman *et al.*, 2003).

5.5.4.3 Sulfonamidas. Fueron los primeros quimioterapéuticos eficaces que se utilizaron por vía sistémica para evitar y curar infecciones bacterianas en seres humanos. Las sulfonamidas pueden entrar en la reacción y competir por el centro activo de la enzima. Son análogos y antagonistas competitivos del ácido para-aminobenzoico (PABA) e impiden que la bacteria utilice de manera normal el PABA en la síntesis de ácido fólico. Las sulfonamidas son inhibidores competitivos de la sintetasa de dihidropteroato, la enzima bacteriana que incorpora el PABA en el ácido dihidropteroico, precursor del ácido fólico. La bacteriostasis inducida por sulfonamidas es antagonizada en forma competitiva por PABA. Las sulfonamidas no afectan las células de mamífero por este mecanismo porque estas células necesitan ácido fólico preformado y no lo sintetizan; por tal razón, son similares a las bacterias no sensibles a sulfonamidas que utilizan ácido fólico preformado (Brooks *et al.*, 1999, Hardman *et al.*, 2003).

5.5.4.4 Trimetroprim sulfametoxazol. El trimetroprim inhibe la ácido dihidrofolicoreductasa, que reduce el ácido dihidrofólico a tetrahidrofólico, una etapa en la secuencia que conduce a la síntesis de las purinas y en último término de ADN. Las sulfonamidas y el trimetroprim pueden usarse por separado para inhibir crecimiento bacteriano. La actividad antimicrobiana de la combinación de trimetroprim sulfametoxazol es consecuencia de su acción en dos fases de la vía enzimática en la síntesis de ácido tetrahidrofólico. La sulfonamida inhibe la incorporación de PABA en el ácido fólico y el trimetroprim evita la reducción del dihidrofolato a tetrahidrofolato que es esencial para las reacciones de transferencia de un solo carbono (Brooks *et al.*, 1999, Hardman *et al.*, 2003).



## 5.6 Plantas medicinales con actividad antibacteriana

### 5.6.1 *Byrsonima crassifolia* (L.) HBK.

5.6.1.1 Otros nombres científicos: *Byrsonima cinerea*, *Byrsonima cubensis*, *Birsonima karwinskiana*.

5.6.1.2 Nombre comunes: Chi, Carbo, Nanche, Tapal.

5.6.1.3 Descripción botánica: Árbol de 3-10 m de alto, copa redondeada o extendida e irregular, tronco recto, corteza café que se desprende en placas cuando adulto, rugosa y rosada por dentro. Ramillas nuevas con pubescencia herrumbrosa. Hojas siempre verdes, opuestas, ovaladas o elípticas, 5-20 cm de largo, puntiagudas, con el envés pubescente. La nerviación es marcada y la textura es coriácea. Racimos terminales erectos de 5-15 cm de longitud, con el eje tomentoso. Flores de 5 pétalos, amarillas o anaranjadas, 1-2 cm de ancho con pétalos unguiculados., numerosas en grupos. Frutos con drupa carnosa 8-22 mm de diámetro, con el cáliz persistente, portados aisladamente o en racimos de 2-15, piel delicada, amarilla, carnaza blanca, gruesa, jugosa, ácida y olor peculiar. Semilla negra y muy dura (Cáceres, 1996, Standley; Steyermark, 1946).

5.6.1.4 Hábitat: Nativo de México a Sur América y Caribe en bosques secos y tropicales hasta 1,800 msnm. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chiquimula, El Progreso, Quiche, Escuintla, Huehuetenango, Izabal, Jalapa, Jutiapa, Peten (Cáceres, 1996, Standley; Steyermark, 1946).

5.6.1.5 Usos populares: El cocimiento de cortezas y flores se usa por vía oral para tratar afecciones respiratorias, digestivas, dolor de muelas, hemorragias, mordeduras de serpiente, parásitos y favorece el parto y la expulsión de la placenta. Por vía tópica se usa para tratar afecciones dermatomucosas (estomatitis, leucorrea, piodermia, tinea, úlcera, vaginitis), tumores y apretar los dientes (Cáceres, 1996, Germosén-Robineau, 2005).

El fruto se come fresco, el mesocarpio representa hasta el 40% del fruto y se prepara en numerosas formas (dulce, jalea, helado y refresco) (Berger, 1971).

Se le atribuye propiedad acaricida, antifúngica, antineurálgica, antitusiva, astringente, cicatrizante, desinflamante, digestiva, emenagoga, febrífuga y tónica (Cáceres, 2006, Tebd, 1993).

5.6.1.6 Farmacología: La actividad antibacteriana *in vitro* demuestra que el extracto acuoso de hojas, corteza y raíz es activo contra *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus*. La tintura de corteza es activa contra *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Candida krusei* (Cáceres, 1993, Cáceres, 2006) con una CIM de 1-2 mg/kg. Los mejores disolventes son etanol y acetona. La decocción es activa contra *Epidermophytum floccosum*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Trichophytum mentagrophytes* y *Trichophytum rubrum* (Cáceres, 1991). El extracto metanólico de hojas es activo contra trofozoitos de *Giardia lamblia* (CI<sub>50</sub> 15µg/ml) (Peraza-Sánchez *et al.*, 2005)

De 5 órganos del árbol se demostró que la corteza es la más activa contra bacterias y el etanol es el mejor disolvente por bioactividad y rendimiento (6.8%), las bacterias más sensibles fueron *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri* y *Streptococcus pyogenes* (Cáceres, 1996).

5.6.1.7 Composición química: La corteza contiene grasa, taninos (20-30%), ácido oxálico (2.7%), glucósidos, flavanoides, saponinas, sesquiterpenlactonas y triterpenos ( $\beta$ -amirina). Las hojas contienen saponinas, esteroides insaturados ( $\beta$ -sitosterol), cardenólidos, bufadienólicos, flavonoides (catequina, apicatequina, guayaverina, viperina, quercetina, galoilgalactósido), leucoantocianinas, taninos, polifenoles, triterpenoides (dirsonimol); terpenos (betulinaldehído, betulina, lupeol), éster aromático (metilgalato) y glicolípidos (Béjar; Malone, 1993, Cáceres, 1996, Glasby, 1991, Rastrelli, 1996)

5.6.1.8 Toxicología: A la corteza se le atribuye cierta toxicidad, pero no hay estudios específicos. Los extractos acuoso y etanólico de hojas, corteza y raíz son tóxicos a peces del género *Mollinesia*. La infusión de corteza por vía oral en ratón no tiene toxicidad aguda en dosis de 1-5 g/Kg (Cáceres, 2006, Duke, 1985)

### 5.6.2 *Gliricida sepium* (Jacq.) Steud.

5.6.2.1 Otros nombres científicos: *Robinia rosea*, *Robinia veriegata*, *Londhocarpus maculatus*

5.6.2.2 Nombre comunes: Madrecacao, Kante, Canísima, Madera negra, Madriado, Matasarna.

5.6.2.3 Descripción botánica: Árbol de 10 m de alto, copa extendida o piramidal, tronco de 30 cm de diámetro, corteza café oscuro, ramas puberulentas de jóvenes, luego grabas. Hojas deciduas, lanceoladas, 3-7 cm de largo, pinnadas 2-15 foliolos, verde en la parte superior y mancha púrpura en la inferior, muy aromática. Hojas deciduas, lanceoladas, 3-7 cm de largo, pinnadas, 2-15 foliolos. Flores en racimo, 5-10 cm de largo, densamente floreado, cáliz purulento o glabro, corola de 1.5-2 cm de largo, rosadas a blancas. Vaina de la semilla café oscuro, glabra, oblonga plana, 10-12 cm de largo y 1-2 cm de ancho. Semillas lenticulares, café oscuro (Cáceres, 2006, Standley; Steyermark, 1946).

5.6.2.4 Hábitat: Nativo de la América tropical, crece en laderas hasta 1,600 msnm, se ha introducido y se cultiva en todo el mundo tropical. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chiquimula, Escuintla, Huehuetenango, Izabal, Jalapa, Jutiapa, Peten, Retalhuleu, Zacapa, Santa Rosa y Suchitepquez (Standley; Steyermark, 1946).

5.6.2.5 Usos populares: El cocimiento de las hojas y corteza se usan por vía oral para tratar afecciones gastrointestinales, respiratorias, de la piel (erupciones, erisipela, impétigo, gangrena, granos, jiote, gonorrea, quemaduras, picaduras de insectos, úlceras), paludismo y paperas. La decocción de hojas se usa en el tratamiento de hipertensión (Morton, 1981, Ronquillo *et al.*, 1988).

El cocimiento de las raíces se toma para aliviar el dolor de garganta, afecciones del riñón, ictericia y edema. Tópicamente las hojas y corteza, frescas o cocidas, se aplican como lavados, compresas, emplastos o sobados sobre empeines, erisipela, impétigo, intertrigo, jiote, granos, raspones, salpullido, sarna, úlcera y otras enfermedades de la piel; como baños se aplica para el tratamiento de alergias (Cáceres, 1996, Nelson, 1986).

Se le atribuyen propiedades antihistamínicas, antimalárica, antiséptica, antifúngica, cicatrizante, diurética, expectorante, febrífuga, hipotensora e insecticida (Cáceres, 1996).

5.6.2.6 Farmacología: La actividad antibacteriana demuestra que el extracto hidroalcohólico de hojas (25 µg/ml) es inactivo contra microorganismos patógenos (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*). La tintura de hojas y corteza no inhibe enterobacterias patógenas (*Escherichia coli* y *Salmonella typhi*). La tintura de las hojas es activa contra *Neisseria gonorrhoeae* con un espectro de inhibición de 80% de cepas patógenas; la decocción contra *M. canis* y *Trichophytom mentagrophytes* con actividad fungicida y fungiestática. Los órganos con mayor actividad son la corteza, flores y raíz; el mejor disolvente es el etanol (Cáceres, 1991, Rahalison *et al.*, 1993).

5.6.2.7 Composición Química: Las hojas y corteza contienen flavonoides (2'-*o*-metilsepiol, sepiol, robinetina), carbohidratos (pinitol), cumarinas y ácido *o*-cumarínico y melilótico (Glasby, 1991, Rastrelli *et al.*, 1998a).

5.6.2.8 Toxicología: El extracto acuoso de semillas no es tóxico a peces dorados; sin embargo, la canavanina de las semillas es tóxica a mamíferos. L-canaverina induce ciertos cambios hematológicos y anormalidades serológicas en monos que asemejan el lupus eritematoso sistémico. La corteza, raíz y semillas son tóxicas a ratones pero no a ratas (Dhawan *et al.*, 1977).

### 5.6.3 *Lippia graveolens* HBK.

5.6.3.1 Otros nombres científicos: *Lantana origanoides*, *Lantana berlandieri*

5.6.3.2 Nombre comunes: Mejorana, orégano de monte, orégano mexicano

5.6.3.3 Descripción botánica: Arbusto delgado hasta de 2 m de alto, ramas con pubescencia cortamente pilosa. Hojas en pecíolos 5-10 mm de largo, oblongadas o elípticas, 2-4 cm de largo, obtusas o redondas en el ápice, subcordadas a la base, densamente pilosas, suaves al tacto, densamente tomentosas. Flores subglobosas a oblongas, 4-12 mm de largo, brácteas ovado-lanceoladas, agudas; cáliz 1-2 mm de largo, glandular, corola blanca, 3-6 mm de largo (Cáceres, 1996, Standley; Steyermark, 1946).

5.6.3.4 Hábitat: Es nativa del sur de Texas a Nicaragua, se encuentra en bosques secos y montes espinosos subtropicales, en pendientes pedregosas muy secas, en matorrales húmedos o secos y planicies hasta 350 msnm. En Guatemala se ha descrito en El Progreso, Petén y Zacapa (Standley; Steyermark, 1946).

5.6.3.5 Usos populares: La decocción o infusión de hojas se usa para tratar anemia, afecciones gastrointestinales (amebiasis, cólico, diarrea, disentería), afecciones respiratorias (asma, bronquitis, catarro), hidropesía, ictericia, amenorrea, dismenorrea y reumatismo. La decocción en leche se usa para tratar asma y bronquitis; un jarabe de las hojas se usa para tratar la diabetes, disentería, catarro y resfríos (Martínez, 1992, Ocampo; Maffioli, 1987, Ronquillo, 1988).

Tópicamente la decocción se aplica para combatir la tinea y en la cicatrización de heridas, llagas e inflamación de la garganta; en baños se usa para fortalecer niños debilitados, combatir la gripe y para aliviar el prurito y la sarna; en cataplasma para madurar abscesos, calmar neuralgias y aliviar induraciones, cáncer y tumores; en fricciones y baños se usa como calmante. La planta fresca macerada en aceite se aplica a los dolores reumáticos (Cáceres, 2006)

Se le atribuye propiedad antioxidante, antiséptica, aromática, calmante, carminativa, desinflamante, digestiva, diurética, emenagoga, espasmolítica, estimulante, expectorante, pectoral, sudorífica y tónica (Cáceres, 1996).

5.6.3.6 Farmacología: La tintura e infusión de hojas son activas contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* (Domínguez, 1989, Salgueiro, 2003).

La actividad antibacteriana *in vitro* demuestra que la tintura de las hojas es activa contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* pero inactiva contra *Haemophilus influenzae*; la infusión de las hojas demostró actividad contra los mismos microorganismos. La CIM del extracto diclorometánico contra bacterias es de 10 mg/ml y del etanol es 1.75 mg/ml (Cáceres, 1996)

5.6.3.7 Composición química: Las hojas contienen aceite esencial (1.8%), glucósidos saponínicos, taninos y triterpenos, celulosa, pigmento y elementos minerales; la corteza y raíz contienen glicósidos saponínicos, aceite esencial y taninos. Las hojas contienen además flavononas (pinocebrina, naringenina), lapachenol e iridoides (loganina, sacologanina, ácido carioptósido y logánico, lippiósido) (Rastrelli *et al.*, 1998b)

5.6.3.8 Toxicología: Los extractos acuosos y etanólico de hojas (500 ppm) presentan cierta toxicidad dosis-dependiente contra peces del género *Mollinesia*. El lapachenol tiene actividad carcinogénica y podría explicar cierta actividad antifertilidad atribuida (Mena, 1994).

#### 5.6.4 *Croton guatemalensis* Lotsy

##### 5.6.4.1 Otros nombres científicos: *Croton eluterioides*

5.6.4.2 Nombre comunes: Copalchi, Sangre de Drago, Caché, Chul, Guanacaste, Hoja amarga, Perexcutz, Quina, Sasafrás, Zicché

5.6.4.3 Descripción botánica: Es un árbol o arbusto delgado hasta 8 m de alto. Hojas firmes membranosas, en largos o cortos pecíolos delgados, ovadas o anchamente triangulares, 7 – 15 cm de largo. Acuminadas, cordadas o truncadas en la base, enteras, verdes en la superficie superior, glabradas con el tiempo, densamente lepidotas por debajo, plateado blanquecinas (Leinmuller, 1991, Linares *et al.*, 1999, Standley; Steyermark, 1946).

5.6.4.4 Hábitat: Nativo de Mesoamerica en bosques secos o húmedos, frecuentes en colinas pedregosas hasta 1,800 msnm, a veces lantados como rompevientos en plantaciones de café. En Guatemala se puede encontrar en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Escuintla, Guatemala, Quetzaltenango, Quiché, Retalhuleu, Sacatepquez, Santa Rosa y Suchitepquez (Cáceres, 1996, Standley; Steyermark, 1946).

5.6.4.5 Usos populares: Se siembra como sombra del café. La corteza se utiliza para darle sabor a una bebida de maíz. Sus hojas secas se venden con fines medicinales, la decocción se usa como desinflamante. Se le atribuye propiedad analgésica, antimalárica, desinfectante, diurética, emoliente, febrífuga y tónica (Rzedowski *et al.*, 2001).

5.6.4.6 Farmacología: Generalmente se usan la corteza y las hojas secas. De la corteza se ha aislado un alcaloide (copalchoidina) al que se le atribuyen propiedades similares a la quinina como antimalárico y tónico (Cáceres, 1996).

5.6.4.7 Composición química: Las hojas y corteza contienen alcaloides, aceites esenciales, taninos, triterpenos y mucílago, y la raíz contiene alcaloides (Cáceres, 1996).



5.6.4.8 Toxicología: Los extractos acuosos y etanólicos de hojas y corteza (50 ppm) son tóxicos a peces del género *Mollinesia* se recomienda no ingerir el látex. La administración oral de 3 g/Kg de la infusión acuosa al 10% liofilizada no produjo ningún efecto tóxico (Cáceres, 1996).

### 5.6.5 *Tagetes lucida* Cav

5.6.5.1 Otros nombres científicos: No presenta

5.6.5.2 Nombre comunes: Pericón, I'yá, Jolomocox, Ucá

5.6.5.3 Descripción botánica: Hierba perenne aromática, glabra, erecta, 30-95 cm de alto, se levanta desde una base corta, gruesa y leñosa, cimosamente ramificada; ramas escasas, resinosa al secarse. Hojas opuestas, sésiles, oblongo-lanceoladas, puntiagudas, dentadas, con numerosas glándulas oleosas. Flores amarillas en pequeñas cabezuelas terminales; receptáculo cilíndrico; 5-7 filarios tubulados en el ápice. Aquenios estriados, papus escamoso (House *et al.*, 1995, Nash, 1976).

5.6.5.4 Hábitat: Nativa de México a Honduras en bosques de encino y laderas de 1,000 – 2,000 msnm. Es abundante en la época de lluvia, desaparece en época seca. En Guatemala se puede encontrar en Chimaltenango, El Quiché, Jalapa, Guatemala, Huehuetenango, Petén, Quetzaltenango, Sacatepéquez y San Marcos (Nash, 1976).

5.6.5.5 Usos medicinales y populares: La infusión de flores y hojas se usa por vía oral para aliviar el parto, tratar anemia, inflamación de los ojos, afecciones nerviosas, gastrointestinales y respiratorias, dolor menstrual, hepatitis, paludismo, reumatismo, retención urinaria, afecciones nerviosas, tumores y úlcera. El humo de las hojas y flores se utiliza para ahuyentar mosquitos. Las flores y hojas se usan para aromatizar los elotes conocidos (Logan, 1973, Ortiz; Brower, 1985).

Se le atribuye propiedad antiinflamatoria, antioxidante, antiséptica, aromática, carminativa, digestiva, diurética, espasmolítica y galactogoga (Ortiz; Brower, 1985, Neher, 1968).

5.6.5.6 Farmacología: La tintura y el extracto acuoso de hojas son activos contra *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus pneumoniae*,

*Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans* y *Neisseria gonorrhoea*. Diversos extractos inhiben el crecimiento de *Vibrio cholerae* (Cáceres, 1991, Cáceres, 1996).

5.6.5.7 Composición química: Las hojas y flores contienen aceites esenciales (limoneno,  $\beta$ -cimeno,  $\beta$ -cariofileno, mirceno, anetol, alilaisol, esdragol, metieugenol, linalool), alcaloides cuaternarios, flavonoides (quercetagetina, patuletina, isorhamnetina), saponinas, taninos, leucoantocianinas, ácido gálico, poliacetilenos, glicósidos cianogénicos, cumarinas (herniarina o 7-metoxicumarina), derivados de tiofeno,  $\alpha$  tertienilo, poliacetilenos, goma, dextrina, grasas, pectina, resinas ácidas y sales minerales (Abdala, 1999Cáceres, 1999, Martínez, 1992).

5.6.5.8 Toxicología: La  $DL_{50}$  del extracto con actividad espasmolítica por vía oral es  $>100$  mg/Kg de peso. El  $\alpha$ -tertienilo puede ser fototóxico en presencia de luz ultravioleta cercana y producir una fotodermatitis por n mecanismo que no depende de la peroxidación lipídica de la membrana (Yamamoto, 1984).

Se le atribuye propiedad abortiva. El extracto alcohólico provoca en algunas personas síntomas cardiovasculares. El alfa tertienilo puede ser fototóxico en presencia de la luz ultravioleta y puede producir una fotodermatitis (Cáceres, 1996).

### 5.6.6 *Smilax domingensis* Willd

5.6.6.1 Otros nombres científicos: No presenta

5.6.6.2 Nombre comunes: Bejuco de membrillo, Zarzaparrilla

5.6.6.3 Descripción botánica: Bejuco leñoso, dioico, trepando por zarcillos; más de 200 especies, varias usadas en medicina. Se distinguen dos grupos, de rizoma leñoso y raíz filiforme. Es glabra, tallo rollizo con agujones recurvados. Hojas 1-6 veces más largas que anchas, ovadas, 5 nervios desde la base. Umbelas estaminadas y postiladas solitarias, pedúnculo más corto que el pecíolo. Bayas 7-10 mm, rojas. Rizoma leñoso (Standley; Steyermark, 1952).

5.6.6.4 Hábitat: En Mesoamérica existen unas 26 especies y en Guatemala al menos 12 especies, las cuales se usan indistintamente con fines medicinales. Nativa de las Antillas y desde México hasta Panamá en bosques húmedos y espesuras hasta de 2,100 msnm. Existen varios herbarios con estos especímenes en Colombia, Ecuador y Perú. En Guatemala, se han descrito en Alta Verapaz, Guatemala, Huehuetenango, Izabal, Jutiapa, Peten, Quetzaltenango, Retalhuleu, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa (Standley; Steyermark, 1952).

5.6.6.5 Usos populares: Por vía oral el cocimiento se usa para tratar anemia, afecciones digestivas, hinchazón, malaria, dolor de riñones, enfermedades de la sangre y venéreas, hepatitis, reumatismo y tumores. Se aplica tópicamente para tratar afecciones dermatomucosas (alergias, eccema, liquen plano, tinea y psoriasis) (Cáceres, 1996).

Las raíces de este género se han utilizado como colorantes de refrescos o como componentes de arreglos florales. Se les atribuye propiedades antiinflamatorias, antifúngicas, antipruríticas, antirreumáticas, antiséptica, cicatrizante, depurativa, sudorífica y tónica (Cáceres, 1996).

5.6.6.6 Farmacología: Estudios antibacterianos demuestran que la tintura de las raíces son activas contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* y *Streptococcus pyogenes*, e inactiva contra *Vibrio cholerae*. Estudios del

espectro de inhibición bacteriana en 20 cepas provenientes de pacientes demuestran que inhibe el 85% de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, 80% de *Salmonella Typhi* y 70% de *Staphylococcus aureus*. La actividad antimicrobiana se atribuye a las saponinas, en particular a sarsasapogenina y parillina (Cáceres, 1996, Pérez, 2003).

5.6.6.7 Composición química: Contienen alcaloides, aceite esencial, esteroides insaturados, glicósidos esteroidales (saponinas, cardenólidos, bufadienólicos), flavonoides, leucoantocianinas, taninos, polifenoles, resinas, azúcares y grasas; además agliconas esteroidales (parrillita, sarsapogenina, smilagenina),  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, ácido sarsápico, polinas tanina y ácido paroapárico (Bérdy *et al.*, 1982)

5.6.6.8 Toxicología: La administración de 0.5-3.0 mg/Kg de extracto no produce efectos tóxicos en ratones, la administración crónica 100 mg/Kg durante 90 días produjo síntomas de toxicidad ni cambios sanguíneos sugestivos de toxicidad. En dosis inusualmente grandes puede causar daño, aunque esta aprobado su uso como alimento por la FDA (Cáceres, 1996).

### 5.6.7 *Rhizophora mangle* L.

5.6.7.1 Otros nombres científicos: No presenta

5.6.7.2 Nombre comunes: Mangle Rojo, Candelón, Mangle, Mangle colorado, Mangle dulce, Mangle tinto, Tabché, Tapché, Xtabché.

5.6.7.3 Descripción botánica: Su forma es de árbol o arbusto perennifolio, halófilo, de 4 a 10 m de alto, en el tronco se encuentran apoyadas numerosas raíces aéreas simples o dicotómicamente ramificadas con numerosas lenticelas, la corteza es de color olivo pálido con manchas grises, sin embargo en el interior es de color rojizo, su textura es de lisa a levemente rugosa con apariencia fibrosa. Las hojas son simples, opuestas, pecioladas, de hoja redondeada, elípticas a oblongas, estas se aglomeran en las puntas de las ramas, su color es verde oscuro en el haz y amarillentas en el envés. Las flores son pequeñas, de 2.5 cm de diámetro con cuatro sépalos lanceados, gruesos y coriáceos. La flor tiene cuatro pétalos blancos amarillentos. Tiene de dos a cuatro flores por tallo o pedúnculo. Los frutos se presentan en forma de baya de color pardo, coriácea, dura, piriforme, farinosa. El desarrollo de las semillas se lleva a cabo en el interior del fruto por viviparidad, los propágulos son frecuentemente curvos, de color verde a pardo en la parte inferior y presentan numerosas lenticelas y por último sus raíces son fúlcreas, ramificadas, curvas y arqueadas (Fleitas, 2001).

5.6.7.4 Hábitat: Especie característica de los litorales donde forma a menudo masas puras en las zonas intermareales de lagunas costeras y esteros con influencia de agua salada. Crece en ambientes de continuo movimiento de agua y salinidad variable (hipersalino a salobre). Su mejor desarrollo es en litorales someros, con poca pendiente donde la marea entra con mayor facilidad. Se desarrolla en los sitios protegidos contra la acción del oleaje fuerte. Los manglares más productivos se desarrollan en estuarios con lodo fino, compuesto de cieno, arcilla y alto porcentaje de materia orgánica. Se le encuentra a lo largo de las costas del Golfo, el Pacífico y el Caribe, en latitudes tan extremas como Isla San Esteban en Baja California o Huixtla, en el sur de Chiapas. En la vertiente del Golfo se presenta desde Tamaulipas hasta Yucatán y Quintana Roo y en la vertiente del Pacífico desde Baja California Sur, Sonora hasta Chiapas. Altitud: nivel del

mar. En Guatemala se puede encontrar en Petén, Puerto Barrios, Santa Rosa, Escuintla, San Marcos, Suchitepéquez y todas las zonas costeras del país. Altitud Nivel del Mar (Machorro, 2007).

5.6.7.5 Usos populares: La corteza se utiliza como febrífugo, hemostático, antidiarréico, para el asma, hemoptisis, mordedura o picadura de animales marinos venenosos, diversas heridas, tuberculosis, lepra, hemorragias, disentería, elefantiasis. La hoja sirve para el escorbuto, dolor de muelas, úlceras leprosas. La raspadura de las raíces es usada por los pescadores contra mordeduras de peces y picaduras de insectos venenosos. Los embriones son ricos en taninos y se emplean machacados y cocidos como astringentes (Machorro, 2007).

La planta tiene efecto anti-hiperglicémico y podría llegar a usarse clínicamente en el control de la diabetes mellitus. Se utiliza en afecciones gástricas (úlceras), antiséptico y como promotor de cicatrización (Leinmuller *et al.*, 1991).

*Rhizophora mangle* es la especie de mangle más usada en la actualidad en programas de reforestación. Se ha utilizado como adhesivo en la fabricación de triplay. Se usa para la fabricación de bolas de boliche o de polo y artesanías en general y artículos torneados. La corteza produce un tinte azul para teñir tejidos de algodón. Es usado en México por medio de extracción de árboles juveniles de *Rhizophora mangle*, por su resistencia para ser usados como travesaños en viviendas o para la construcción de trampas para el camarón. Las hojas son empleadas en los techos rurales (Rzedowski *et al.*, 2001).

5.6.7.6 Farmacología: Se pueden usar su corteza, hojas y raíz. *Bacillus subtilis* *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Mycobacterium smegmatis*, *Candida albicans*, *Criptococcus neoformans*. La actividad biológica y farmacológica se atribuye los taninos presentes en la planta (Fleitas, 2001)

5.6.7.7 Composición química: La corteza y raíz son fuente importante de taninos. Además de grupos aminos primarios y secundarios, alcaloides en pequeña proporción (Fleitas, 2001).

5.6.7.8 Toxicología: No se ha reportado su toxicidad debido a que casi no se ha utilizado esta planta como medicinal, sin embargo, se sabe que se puede usar jarabes de sus extractos tanto de raíces como de su corteza como antidiarreicos, para el asma, y para el envenenamiento con pescados contaminados (Fleitas, 2001).



### 5.6.8 *Psidium guajava* L.

5.6.8.1 Otros nombres científicos: *Psidium guava*, *Psidium pomiferum*, *Psidium pumilum*, *Psidium pyriferum*, *Psidium pyriferum*.

5.6.8.2 Nombre comunes: Guayabo, Guayaba manzana, Shori.

5.6.8.3 Descripción botánica: Árbol de 2-10 m de alto, perenne, corteza suave, delgada, escamosa. Hojas verdes, opuestas, peciolo corto, elípticas, 5-15 cm de largo. Tallo erecto y ramificado con madera dura. La corteza gris se descama con frecuencia y presenta manchas redondas en el ápice y en la base, múltiples venas horizontales, glandulares. Las hojas son opuestas, sencillas oblongas o elípticas de color verde claro. Flores axilares, solitarias, blancas, 3-4 cm de ancho, penacho de 275 estambres. Frutos son bayas aromáticas, piriformes, 2-10 cm de largo, cáscara amarilla, carnaza rosada firme, al centro suave, con pulpa jugosa y semillas color café, 3-5 mm de largo, redondas y duras (Ministry of Health of Indonesia, 1982, Standley; Williams, 1964).

5.6.8.4 Hábitat: Nativo de América tropical, en bosques húmedos y secos; sembrado comercialmente en zonas cálidas de África y Asia hasta 1,800 msnm. Se han descrito variedades en todo el país, especialmente en Baja Verapaz, Chiquimula, Jutiapa y Santa Rosa (Standley; Williams, 1964).

5.6.8.5 Usos populares: La decocción de hojas y corteza se usa por vía oral en afecciones digestivas (amebiasis, diarrea, disentería, cólico); anemia, asma, diabetes, hemorragia, hinchazón, uretritis y resfrío. Por vía tópica se aplica en baños y lavados para enfermedades dermatomucosas y en enjuages para lengua inflamada (Germosén, 1996, Girón *et al.*, 1991).

Se les atribuye propiedad antibacteriana, antiemética, antiinflamatoria, antihelmíntica, antiséptica, antitusiva, astringente, carminativa, espasmolítica y tónica (Cáceres, 1996, Argueta *et al.*, 1994).

5.6.8.6 Farmacología: La tintura de hojas es activa contra *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*; la decocción contra *Epidermophyllum floccosum*, *Trichomonas vaginalis* (Cáceres, 1996) y rotavirus de simios (Gonçalves, 2005); el extracto etanólico contra *Escherichia coli* enterohemorrágica (Voravuthikunchai *et al.*, 2004); el extracto polar y apolar contra *Plasmodium falciparum* y es citotóxico contra líneas KB y P338 (Weenen, 1990).

5.6.8.7 Composición química: La planta es rica en taninos. Las hojas contienen grasa,  $\beta$ -sitosterol, ácido maslínico y elágico, aceite esencial, triterpenoides ( $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -bisaboleno, aromadendreno, cineol, eugenol), ácidos orgánicos (guayavólico), flavonoides de quercetina (guayaverina y avicularina). La corteza contiene además elagitaninos (telimagrandina, peduncularina, casuarinina) (Germosén, 1997).

La actividad antibacteriana se atribuye a los flavonoles acídicos (avicularina, guayaverina y quercetina); la antiprotozoa, al ácido psidiólico que además es activo contra *M. phlei* (Cáceres, 2006).

5.6.8.8 Toxicología: Los extractos etanólico y acuoso de hojas, raíces y tallos son ictiotóxicos. La infusión de corteza y hojas ensayadas en ratones por vía oral en dosis de 1-5 g/kg no presenta toxicidad aguda. Al fruto se le atribuye actividad abortiva.

### 5.6.9 *Piper jacquemontianum* Kunth

5.6.9.1 Otros nombres científicos: *Piper aeruginosibaccum*

5.6.9.2 Nombre comunes: Cordoncillo, Pooczuyaax

5.6.9.2 Descripción botánica: Arbusto comúnmente de aproximadamente 2 m de altura, las ramas jóvenes densamente hispidulosas o hírtulas, algunas veces glabras con la edad u ocasionalmente casi glabras desde el principio; pecíolos mayormente de 1 cm de largo o menos, algunas veces más largo en las hojas bajas, rígidos, densamente hispidulosos o raramente glabrados; láminas de las hojas ovado-oblongadas u ovado elípticas, mayormente de 12 a 20 cm de largo y de 4.5 a 9 cm de ancho, ápice abruptamente acuminado o largamente acuminado, muy desigual en la base y más o menos oblicua, usualmente redondeado o mas o menos cordado en un lado y obtuso en el otro, un lado más decurrente que el otro, gruesas y firmes, muy lustrosas en el haz y con frecuencia lustrosas en el envés, un poco más pálidas en el envés, cuando se secan se tornan verde grisácea o lagunas veces negruzca, con puntos pelúcidos finos, glabras en el haz, suaves al tacto, hispidulosas en el envés, especialmente en los nervios, con pelos sórdidos subadpresos, ásperos al tacto, penninervadas, usualmente 3 nervios en cada lado, nervios arqueados, ascendentes, los superiores nacen en o por arriba de la mitad de la lámina, las venas son prominentes en el envés, laxamente reticuladas; pedúnculos cortos, gruesos, densamente puberulentos o hispidulosos; espigas erectas, mayormente de 5 a 7 cm de largo y de 3 a 4 mm de grosor, obtusas, gruesas; las brácteas con pubescencia densa (Hernández, 2007).

5.6.9.3 Hábitat: Bosques o matorrales húmedos o lluviosos, algunas veces en bosque de pino o en pantanos de Mancarí. Crece a 900 msnm o menos. Su distribución geográfica es Campeche, Guatemala y Belice. En Guatemala se ha descrito en los departamentos de Alta Verapaz, Petén e Izabal (Hernández, 2007).

5.6.9.4 Usos medicinales y populares: En Guatemala se utiliza para bajar la fiebre, para granos, para la tos y para aliviar el dolor de cabeza y de cuerpo, para el dolor del corazón, para la presión (Hernández, 2007).

5.6.9.5 Farmacología: Estudios farmacológicos demuestran que el aceite esencial a 0.1 mg/ml tiene actividad contra *Mycobacterium smegmatis* y *Bacillus subtilis*, actividad citotóxica contra *Artemia salina* a 0.5 mg/ml y actividad insecticida contra *Anopheles albimanus* y *Anopheles aegypti* hasta el tercer estadio. Presentó actividad antiinflamatoria *in vivo* a dosis de 750 y 1000 mg/Kg peso (Hernández, 2007)

5.6.9.6 Composición química: Se identificó en el aceite esencial  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\delta$ -3-careno, bornileno,  $\delta$ -elemeno, 1,5 ciclodecadieno,  $\beta$ -cariofileno, D-germacrano (Hernández, 2007).

## **6. OBJETIVOS**

### 6.1 Objetivo General

6.1.1 Contribuir en alternativas de tratamiento antibiótico natural en infecciones causadas por enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido.

### 6.2 Objetivos Específicos

6.2.1 Estandarizar la técnica de micrométodo para la actividad antibiótica en bacterias.

6.2.2 Evaluar enterobacterias fermentadoras multiresistentes clínicas contra extractos de plantas medicinales con actividad antibiótica demostrada.

6.2.3 Determinar la concentración inhibitoria mínima de los extractos que presenten actividad antibiótica.

## **7. HIPÓTESIS**

Al menos una de las especies vegetales investigadas tiene actividad antibacteriana satisfactoria contra cepas clínicas de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido.

## 8. MARCO METODOLÓGICO

### 8.1 Población

Todas las plantas medicinales nativas estudiadas que posean actividad antibiótica contra diferentes bacterias.

### 8.2 Muestra

Se analizó los extractos de plantas medicinales con actividad antibacteriana comprobada con una concentración mínima inhibitoria menor a 250 mg/dl.

### 8.3 Materiales y equipo

#### 8.3.1 Equipo

- Agitador Vortex
- Autoclave
- Campana bacteriológica
- Computadora con procesador de datos
- Congelador a -20°C
- Impresora
- Incubadora a 34°C
- Mechero de Bunsen
- Incinerador para asas bacteriológicas
- Refrigerador a 4°C
- Micropipetores automáticos unicanal
- Micropiperotes automáticos multicanal
- Espectrofotómetro tipo lector de ELISA con diferentes longitudes de onda.

#### 8.3.2 Materiales

- Asa en argolla
- Cajas de petri 100 x 15 mm
- Erlenmeyer de 250ml y 500mL

- Gradillas
- Guantes desechables
- Hisopos estériles
- Hojas de papel bond tamaño carta
- Papel mayordomo
- Papel parafilm
- Pinzas
- Tubos de ensayo
- Tubos ependorf 1.5 mL
- Placas de 96 pozos estériles

### 8.3.3. Reactivos

- Aceite mineral
- Agar Mac Conkey
- Agar Müller Hinton
- Caldo Müller Hinton
- Agar Sangre de Carnero
- Caldo tripticasa soya
- Agua desionizada estéril
- Alcohol
- Cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922
- Extractos de plantas a investigar
- Estándar de MacFarland 0.5
- Estándar de ampicilina
- Etanol al 70%
- Reactivo MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium)
- Hipoclorito de sodio
- Solución salina



## 8.4. Métodos

8.4.1 Estandarización de la técnica de microdilución en placa: para bacterias utilizando cepas de referencia y antibiótico sintético.

### 8.4.1.1. Preparación del estándar de ampicilina:

- Del estándar liofilizado de ampicilina se realizó una solución Stock con una concentración 10mg/ml.
- A partir de la solución Stock, se realizó la dilución más alta de antibiótico, siendo ésta de 64µg/ml.

### 8.4.1.2 Realización de la suspensión de bacterias:

- Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 con 24 horas de incubación para la realización del estándar de MacFarland 0.5
- Se tomaron de 2 a 3 colonias de la bacteria y se suspendieron en tubos con caldo Muller Hinton.
- Se ajustó la turbidez a un estándar de MacFarland 0.5 por medio de un turbidímetro (rango de turbidez 0.09-0.10)
- Se utilizó inmediatamente después de preparado para evitar proliferación bacteriana.

### 8.4.1.3 Preparación de revelador:

- Se utilizó MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium) como revelador.
- Se utilizó una concentración de 0.4 mg/ml de MTT disuelto en un buffer de fosfatos (PBS).
- Se utilizó inmediatamente después de preparad para evitar que reaccionara con la luz.

### 8.4.1.4 Inoculación de las microplacas (ver anexo 1):

- Se elaboró un esquema de inoculación, con la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, colocando un control de crecimiento bacteriano y un control de esterilidad del caldo Muller Hinton en placas con fondo en U (distribuidas en filas designadas con letras de la A a la H y 12 columnas numeradas).

- Se añadieron 200µL de caldo Muller Hinton en la columna 1 (de la 1A a la 1H).
- Se agregó en todos los pozos 100µL de caldo Muller Hinton, con excepción en la columna 3 (de la 3A a la 3H).
  - Se agregó en la columna 3 200µL de la dilución más alta de ampicilina (64µg/ml).
  - Se arrastró de los pozos de la columna 3 (posición 3A a la 3H) 100 µL a los pozos de la columna 4 (posiciones 4A a la 4H) y así sucesivamente hasta llegar a los pozos de los de la fila 12 (NOTA: no cambiar punta de pipeta entre cada una de las diluciones).
  - Finalmente tomar 100 µL de los pozos de la fila 12 y descartarlo. De esta forma se obtendrán diluciones seriadas del antibiótico estándar con un volumen total de 100 µL.
    - Se añadieron 100 µL de la suspensión de bacterias a todos los pozos de las filas 2 a la 12.
    - Se incubó a 35°C por 16-18 horas.
    - Se agregaron 50 µL de la solución de MTT a todos los pozos de la placa.
    - Se incubó por 2 horas a 35°C en cámara húmeda y se leyó la absorbancia a 492nm.

#### 8.4.1.5 Curva de calibración de concentración bacteriana:

- Se elaboró un esquema de inoculación, con la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, colocando un control de esterilidad del caldo Muller Hinton en placas con fondo en U (distribuidas en filas designadas con letras de la A a la H y 12 columnas numeradas).
  - Se añadieron 200µL de caldo Muller Hinton en la columna 1 (de la 1A a la 1H).
  - Se añadieron 100µL de caldo Muller Hinton de la columna 2 (de la 2A a la 2H) a la columna 12 (de la 12A a la 12H).
    - Se añadieron 100 µL de la suspensión de bacterias a todos los pozos de las filas 2 a la 12.
    - Se arrastró de los pozos de la columna 2 (posición 2A a la 2H) 100 µL a los pozos de la columna 3 (posiciones 3A a la 3H) y así sucesivamente hasta llegar a los pozos de los de la fila 12 (NOTA: no cambiar punta de pipeta entre cada una de las diluciones).
    - Finalmente se tomaron 100 µL de los pozos de la fila 12 y se descartaron. De esta forma se obtendrán diluciones seriadas de la bacteria con un volumen total de 100 µL.
      - Se agregaron 50 µL de la solución de MTT a todos los pozos de la placa.
      - Se incubó por 2 horas a 35°C en cámara húmeda y se leyó la absorbancia a 492nm.

8.4.2 Obtención de extractos vegetales: Se utilizaron los extractos de las plantas seleccionadas encontrados en la Colección de extractos del Laboratorio de Bioensayos del departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

8.4.3 Obtención de cepas bacterianas: Se escogieron cepas de enterobacterias fermentadoras de lactosa aisladas de muestras clínicas en el Laboratorio Clínico del HGSJD, fenotípicamente productoras de enzimas tipo BLEE, además de poseer diferente fenotipo antibiótico entre cada una de las especies elegidas. Las cepas se recolectaron durante el primer semestre del año 2009.

8.4.4 Determinación de la concentración inhibitoria mínima por la técnica de microdilución en placa.

8.4.4.1 Preparación de extractos.

Los extractos a trabajar presentaron una concentración de 100 mg/ml, es decir, se pesan 0.100g de extracto en balanza analítica con 1 ml de PBS, para obtener una solución madre. Posteriormente se realizó la dilución más alta a evaluar de cada uno de los extractos (200 µg/ml).

8.4.4.2 Realización de la suspensión de bacterias:

- Se utilizó la cepa con 24 horas de incubación para la realización del estándar de MacFarlan 0.5
- Se tomaron de 2 a 3 colonias de la bacteria y se suspendieron en tubos con caldo Muller Hinton.
- Se ajustó la turbidez a un estándar de MacFarlan 0.5 por medio de un turbidímetro (rango de turbidez 0.09-0.10)
- Se utilizó inmediatamente después de preparado para evitar proliferación bacteriana.

8.4.4.3 Preparación de revelador:

- Se utilizó MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium) como revelador.

- Se utilizó una concentración de 0.4 mg/ml de MTT disuelto en un amortiguador de fosfatos (PBS).

Se utilizó inmediatamente después de preparad para evitar que reaccionara con la luz.

#### 8.4.4.4 Inoculación de las microplacas (ver anexo 2):

- Se elaboró un esquema de inoculación, con las cepas clínicas utilizadas , colocando un control de crecimiento bacteriano, un control de esterilidad del caldo Muller Hinton y un control de esterilidad de extracto, en placas con fondo en U (distribuidas en filas designadas con letras de la A a la H y 12 columnas numeradas).

- Se añadieron 200µL de caldo Muller Hinton en la columna 1 (de la 1A a la 1H).
- Se agregó en todos los pozos 100µL de caldo Muller Hinton, con excepción en la columna 4 (de la 4A a la 4H).
- Se agregó en la columna 4 200µL de la dilución madre de extracto (200 µg/ml).
- Se arrastró de los pozos de la columna 4 (posición 4A a la 4H) 100 µL a los pozos de la columna 5 (posiciones 5A a la 5H) y así sucesivamente hasta llegar a los pozos de los de la fila 12 (NOTA: no cambiar punta de pipeta entre cada una de las diluciones).
- Finalmente tomar 100 µL de los pozos de la fila 12 y descartarlo. De esta forma se obtendrán diluciones seriadas del extracto con un volumen total de 100 µL.
- Se añadieron 100 µL de la suspensión de bacterias a todos los pozos de las filas 2 a la 12.
- Se incubó a 35°C por 16-18 horas.
- Se agregaron 50 µL de la solución de MTT a todos los pozos de la placa.
- Se incubó por 2 horas a 35°C en cámara húmeda y se leyó la absorbancia a 492nm.

#### 8.4.4.5 Interpretación de resultados:

- Presencia de actividad antibacteriana: absorbancia  $\geq -0.020 \pm 0.04$  nm
- Ausencia de actividad antibacteriana: absorbancia  $\leq -0.293 \pm 0.04$  nm (punto de corte)
- Concentración mínima inhibitoria: concentración de extracto a la que tiene presencia de actividad antibacteriana.
- Rechazo de corrida: cuando haya oxidación del MTT (coloración morada) en los pozos de control de esterilidad de medio y control de esterilidad de extracto.

## 8.5 Diseño de investigación

### 8.5.1 Población

Todas las plantas medicinales nativas estudiadas que posean actividad antibiótica contra diferentes bacterias.

### 8.5.2 Tamaño de muestra

Se analizaron 9 extractos de plantas medicinales nativas con actividad antibacteriana comprobada.

### 8.5.3 Diseño de muestreo

No probabilístico, intencional. Los extractos de plantas medicinales tuvieron una concentración mínima inhibitoria menor a 250 mg/dl de actividad antibacteriana.

### 8.5.4 Análisis estadístico

Se utilizó regresión lineal para la calibración de la curva de concentración de bacterias vivas utilizando como revelador MTT. Se realizó por cuadruplicado y se utilizó la media de los resultados para realizar la curva.

Para la estandarización del método de microdilución en placa para bacterias se realizó una curva de acumulación de medias. Se realizaron 8 corridas diarias de la metodología por 7 días y se determinó la estabilidad, repetibilidad y reproducibilidad del método.

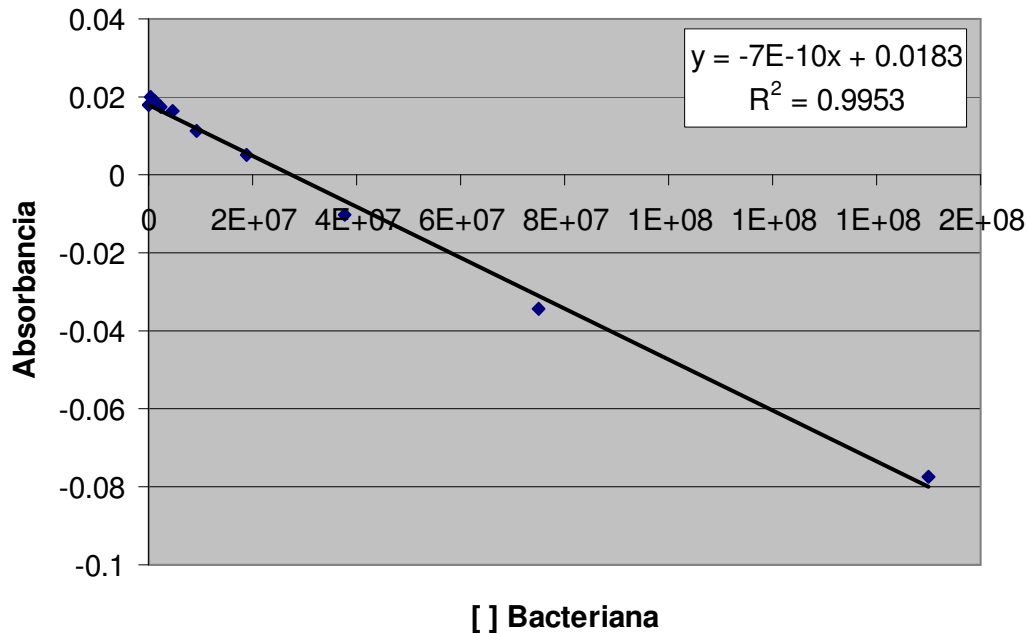
La evaluación de la actividad antibacteriana de cada uno de los extractos se realizó por triplicado y los resultados se expresaron por medio de medias en tablas.

Se utilizó el programa de computación SPSS para el análisis de los datos.

## 9. RESULTADOS

Dentro del procedimiento de estandarización de la técnica para la determinación de la concentración mínima inhibitoria por medio de la microdilución en placa se realizó una curva de calibración utilizando como caldo de enriquecimiento caldo Muller Hinton y la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922. Para dicha determinación se realizaron 8 corridas idénticas las cuales se les realizó la media de cada una de las lecturas y posteriormente se sometió a un análisis de regresión lineal en donde se determinó la ecuación de la curva de calibración ( $y = -7 \times 10^{-10} X + 0.0183$  con una  $r^2 = 0.9953$  (Gráfica 1).

**Gráfica 1.** Curva de calibración de bacterias utilizando MTT como revelador.



La estandarización del método se realizaron 8 corridas diarias (según el esquema descrito en el Anexo 1) durante 7 días diferentes, en donde se obtuvo la media de cada uno de los días con sus respectivas desviaciones estándar y luego se realizó una acumulación de medias por los 7 días que se realizó el ensayo. Se utilizó una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 para realizar la estandarización contra un estándar de ampicilina (concentración 64  $\mu\text{g/ml}$ ). Se determinó que la absorbancia del punto de corte para determinar actividad antibacteriana positiva es  $-0.020 \pm 0.04$  nm (Tabla 1)

**Tabla 1.** Estandarización de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) utilizando el método de microdilución en placa con MTT como revelador.

		día 1		día 2		día 3		día 4		día 5		día 6		día 7			
	FD	media	DS	media	DS	media	DS	media	DS	media	DS	media	DS	media	DS	Prom	DS
<b>Ctl Medio</b>		0.039	0.00	0.037	0.00	0.041	0.00	0.036	0.01	0.040	0.00	0.039	0.00	0.038	0.00	<b>0.039</b>	<b>0.00</b>
<b>Ctl MOO</b>		-0.315	0.02	-0.186	0.02	-0.167	0.03	-0.306	0.03	-0.177	0.02	-0.232	0.03	-0.173	0.07	<b>-0.222</b>	<b>0.06</b>
<b>64</b>	<b>1/1</b>	0.015	0.02	0.026	0.00	0.028	0.00	0.027	0.00	0.030	0.00	0.029	0.00	0.027	0.00	<b>0.026</b>	<b>0.01</b>
<b>32</b>	<b>1/2</b>	0.018	0.00	0.028	0.00	0.034	0.00	0.035	0.00	0.042	0.01	0.039	0.00	0.035	0.00	<b>0.033</b>	<b>0.01</b>
<b>16</b>	<b>1/4</b>	0.001	0.01	0.024	0.01	0.024	0.00	0.028	0.01	0.036	0.00	0.042	0.00	0.019	0.00	<b>0.025</b>	<b>0.01</b>
<b>8</b>	<b>1/8</b>	-0.050	0.04	0.013	0.01	-0.020	0.01	-0.017	0.01	0.006	0.00	0.015	0.01	-0.089	0.02	<b>-0.020</b>	<b>0.04</b>
<b>4</b>	<b>1/16</b>	-0.359	0.01	-0.318	0.02	-0.295	0.02	-0.276	0.02	-0.289	0.03	-0.275	0.01	-0.236	0.05	<b>-0.293</b>	<b>0.04</b>
<b>2</b>	<b>1/32</b>	-0.402	0.02	-0.311	0.03	-0.101	0.07	-0.190	0.03	-0.128	0.03	-0.094	0.03	-0.121	0.04	<b>-0.192</b>	<b>0.12</b>
<b>1</b>	<b>1/64</b>	-0.365	0.03	-0.266	0.03	-0.184	0.03	-0.281	0.04	-0.186	0.02	-0.098	0.01	-0.226	0.02	<b>-0.229</b>	<b>0.09</b>
<b>0.5</b>	<b>1/128</b>	-0.350	0.04	-0.288	0.03	-0.174	0.08	-0.305	0.03	-0.182	0.01	-0.147	0.05	-0.201	0.03	<b>-0.235</b>	<b>0.08</b>
<b>0.25</b>	<b>1/256</b>	-0.358	0.04	-0.275	0.03	-0.207	0.05	-0.311	0.03	-0.193	0.01	-0.183	0.03	-0.254	0.02	<b>-0.254</b>	<b>0.07</b>
<b>0.125</b>	<b>1/512</b>	-0.336	0.03	-0.291	0.03	-0.201	0.04	-0.295	0.04	-0.173	0.01	-0.188	0.02	-0.231	0.02	<b>-0.245</b>	<b>0.06</b>

FD: Factor de dilución; Ctl: control; MOO: microorganismo; DS: desviación estándar; Prom: Promedio

Luego de tener estandarizada la técnica, se procedió a evaluar 18 cepas de enterobacterias productoras de BLEE aisladas de muestras clínicas. Las cepas evaluadas fueron 6 *Escherichia coli*, 6 *Klebsiella pneumoniae* y 6 *Enterobacter cloacae*. Dentro de las características de cada una de las especies poseen diferente origen de muestra y diferentes fenotipificación de sensibilidad antibiótica (anexo 3). Dichas cepas se evaluaron frente a extractos de 9 plantas medicinales diferentes con actividad antibacteriana demostrada por medio de la técnica de macrométodo de la determinación de la CIM. Las plantas evaluadas fueron *Byrsonima crassifolia*, *Gliricidia sepium*, *Lippia graveolens*, *Croton guatemalensis*, *Tagetes lucida*, *Smilax domingensis*, *Rhizophora mangle*, *Psidium guajava* y *Piper jacquemontianum* (tabla 2). Después de evaluar cada uno de los extractos contra las 18 cepas de enterobacterias se determinó que ninguno de los extractos evaluados (concentración máxima de 200 µg/ml) presentó actividad antibacteriana contra cepas productoras de BLEE.

**Tabla 2.** Plantas medicinales con actividad antibacteriana evaluadas contra cepas clínicas de enterobacterias productoras de BLEE por medio de la técnica de microdilución en placa para la determinación de CIM.

Nombre de la planta (parte)	Nombre común	Parte utilizada	Solvente	Tipo de extracto
1. <i>Croton guatemalensis</i>	Copalchí	Corteza	Etanol	Crudo
2. <i>Tagetes lucida</i>	Pericón	Hoja	Etanol	Partición
3. <i>Smilax domingensis</i>	Zarzaparrilla	Hoja-rizoma	Etanol	Crudo
4. <i>Rhizophora mangle</i>	Mangle rojo	Corteza	Etanol	Crudo
5. <i>Byrsonima crassifolia</i>	Nance	Corteza	Etanol	Crudo
6. <i>Gliricidia sepium</i>	Madre cacao	Hoja	Etanol	Crudo
7. <i>Lippia graveolens</i>	Mejorana	Hoja	Etanol	Crudo
8. <i>Piper jacquemontianum</i>	Cordoncillo	Hoja	Etanol	Crudo
9. <i>Psidium guajava</i>	Guayaba	Hoja	Etanol	Crudo

Datos obtenidos de la colección de extractos del departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.



## 10. DISCUSIÓN

La estandarización del método para la detección de la CIM por medio de la microdilución en placa es una herramienta muy importante para la detección, siendo esta técnica en donde se determina el agente antimicrobiano que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba (Coyle, 2006). Además, este es el método ideal por el cual se puede determinar si un agente con posible actividad antibiótica y que concentración es la mínima necesaria para que tenga efecto y así proponerlo o utilizarlo como una opción terapéutica. Por esta razón fue de gran valor la estandarización de esta técnica realizando la modificación para su lectura con un revelador de actividad celular.

El MTT es un agente que se reduce por la acción del sistema succinato deshidrogenasa mitocondrial de células vivas para producir cristales morados de formazan insolubles en agua los cuales se solubilizan y pueden ser medidos espectrofotométricamente. La cantidad de formazan producido es directamente proporcional al número de células activas en un cultivo. Este reactivo ha sido ampliamente utilizado para evaluar la viabilidad celular en procesos de proliferación y citotoxicidad celular (Peng, 2005). Se probó utilizar el MTT como agente reductor, basándose en su principio de actividad. A pesar que las bacterias no poseen organelas, dentro de ellas mitocondrias, se pretendía demostrar que la membrana celular de las bacterias por ser el órgano que realiza la actividad oxidativa en las mismas tiene la capacidad de reducir el MTT siempre y cuando las bacterias estuvieran viables.

Es importante que la técnica se realice con los parámetros y condiciones con los que se plantean en el estudio debido a que se pueden alterar los resultados si se realizan variaciones muy drásticas. Se encontraron dos puntos críticos cuando se realizó la estandarización del método, el primero fue la concentración de MTT a utilizar, ya que se probaron varias concentraciones de MTT para hacer reaccionar a la bacteria y mientras más concentrada estaba la solución de MTT menor reducción del mismo se lograba por lo que la concentración en donde se obtuvo la mejor curva de calibración fue utilizando la concentración de 0.4 mg/ml de PBS; además se evaluó la actividad del MTT utilizando como diluyente agua desmineralizada y se obtuvieron resultados similares, sin embargo se utilizó el PBS para no afectar la osmolaridad del medio y evitar que la bacteria sufriera alguna alteración por diferencia de concentraciones a pesar que el caldo Muller

Hinton utilizado además de ser un caldo nutritivo también sirve como amortiguador dentro del ensayo.

El segundo punto crítico fue el tiempo de incubación, en donde se debe realizar la incubación dentro del rango de 16 a 18 horas únicamente ya que se encontró que si se excedía de las 18 horas de incubación al realizar la lectura con el MTT este formaba un precipitado que alteraba la lectura de la absorbancia, mientras que al realizarla dentro del rango antes mencionado se logró una suspensión homogénea de las sales de MTT reducido y permitió una lectura adecuada de la absorbancia de la enterobacteria utilizada para la estandarización.

Las enterobacterias productoras de las enzimas beta-lactamasas de espectro extendido, son bacterias que tienen la capacidad y facilidad de generar múltiples mecanismos de resistencia por lo que se vuelven cepas multirresistentes a diferentes familias de antibióticos. Dentro de los hospitales nacionales se expone de manera extrema al paciente a una gran cantidad de antibióticos para aliviar la infección por este tipo de bacterias. Sin embargo, se han reportado casos en donde las bacterias producen los mecanismos de resistencia según el antibiótico al que se ven expuestas y no se logra resolver la infección del paciente y se están buscando tratamientos alternos para poder dar opción a los médicos para que tengan una mejor opción terapéutica para esta situación.

Una opción muy prometedora para diversos tipos de acontecimientos patológicos es la medicina derivada de productos naturales, entre ellas están las plantas que tienen actividad antibacteriana demostrada en varios estudios al rededor del mundo. En Guatemala se han realizado diversas investigaciones en donde se ha demostrado la actividad bactericida de plantas nativas de la región y se han obtenido resultados satisfactorios; sin embargo, estos estudios han determinado la CIM bacteriana por medio de la técnica de macrométodo en agar, método que no es tan preciso, ni exacto y no tiene tanta cobertura de diluciones como la técnica de microdilución en placa.

En este estudio se evaluó la actividad antibacteriana de 9 extractos alcohólicos (metanol y etanol) de plantas nativas con actividad antibacteriana demostrada tanto para cepas de bacterias

Gram negativo como de Gram positivo (Cáceres, 1993, 1996, 1999). Estos extractos se enfrentaron contra cepas clínicas de enterobacterias productoras de BLEE, para dar una opción terapéutica para el tratamiento de las infecciones causadas por las mismas. Sin embargo, los resultados fueron negativos para los diferentes extractos evaluados.

Posibles razones por lo que se obtuvieron estos resultados es que las bacterias con las que se enfrentaron los extractos son cepas que se encuentran expuestas a una cantidad de agentes nocivos hacia las mismas que permite que éstas produzcan cambios o mutaciones en su información genética y puede expresar moléculas con la capacidad de atacar a estos agentes nocivos o producir cambios en la pared celular que no permiten la unión de los mismos a las bacterias.

Las BLEE son enzimas que fenotípicamente se caracterizan por conferir resistencia a penicilinas, cefalosporinas (incluyendo tercera y cuarta generación) y monobactames, pueden ser inhibidas por inhibidores de beta-lactamasas, son capaces de hidrolizar las oximinocefalosporinas (cefotaxima, el ceftazidima y la ceftriaxona) y son inhibidas por el ácido clavulánico. En su mayoría son enterobacterias (en particular *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*) en donde la naturaleza de estas enzimas es plasmídica (Abarca, 2001, Morales, 2004, Rosales, 1997, Ramos, 2006). Entre los microorganismos que producen beta-lactamasas cromosómicas se encuentran *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter diversus* y entre otros (Casellas, 2005, Machado, 2005, Nordase, 1998, Giamarellou, 2005) . Por lo tanto, el control genético de la producción de beta-lactamasas es inducido por un plásmido o cromosoma y una gran cantidad de plásmidos provienen de las enzimas TEM-1, TEM-2 y SHV-1 con genes mutados, estas enzimas le confieren resistencia a penicilinas pero no para las nuevas cefalosporinas (Jones, 2005).

Las primeras cepas reportadas como productoras de BLEE pertenecían a las especies de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* y fueron causantes de brotes de infección nosocomial en los Estados Unidos de América. Estas cepas han ocasionado brotes de infección intrahospitalaria con multiresistencia a los antibióticos alrededor del mundo, dificultando el tratamiento y aumentando la morbi-mortalidad nosocomial. Los factores de riesgo a los cuales se les atribuye el desarrollo de este tipo de resistencia son la duración del tiempo de exposición a

una cepa epidémica, estancia hospitalaria prolongada, ingreso a la unidad de cuidados intensivos, cateterización arterial y urinaria, administración de cefalosporinas de tercera generación y la frecuencia del contacto con personal sanitario (Aliaga, 1996, Gold, 1996).

En 2005 se realizaron dos estudios en Guatemala, el primero en Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS) en donde reportaron un mayor porcentaje de BLEA (62%) que de BLEE (14%), en donde la bacteria con mayor porcentaje de aislamientos fue *Escherichia coli* (BLEA 42% y BLEE 14%) (Najera, 2005). El segundo estudio se realizó en el Hospital General San Juan de Dios (HGSJD), en donde se detectó un alto porcentaje de cepas productoras de BLEE, 69.6%, en donde *Klebsiella pneumoniae* fue la bacteria que se aisló en mayor proporción con respecto a *Klebsiella oxytoca* (5:1). Las salas más afectadas fueron las Unidades de Cuidados Intensivos de Neonatos (UCIN) y la Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP) (Itzep, 2005).

En un estudio realizado por Castro (2009) se evaluaron cepas de enterobacterias provenientes de tres hospitales nacionales, en donde se encontró una frecuencia de producción de BLEE para *Klebsiella pneumoniae* del 52%, *Enterobacter cloacae* del 33% y *Escherichia coli* del 15%. En donde la caracterización fenotípica fue igual para enzimas tipo cefotaximasa como para ceftazidimasa (40% para cada tipo).

Debido a que los extractos de plantas son un complejo de metabolitos y no un compuesto químico único y específico dirigido a cierto lugar de las bacterias, era posible que tuviera una acción positiva como antibiótico, sin embargo no se presentó de la forma esperada la actividad. Esto se puede deber a que las bacterias que se someten por períodos muy largos a tratamientos antibióticos y además se encuentran en un ambiente nosocomial tienen a estar preparadas a todo tipo de agente que las pueda dañar. Producen cambios genéticos, ya sea tipo cromosomales o por plásmidos, que las protegen de cualquier agente; asimismo, tienen la capacidad de transmitir su información de forma vertical (de una generación a la siguiente) o de forma horizontal (de una bacteria a otra por medio de uniones celulares) y así la mayor parte de la población bacteriana nosocomial puede tener un pool de información contra cualquier tipo de agente nocivo.

Esta es la posible razón por la cual las plantas evaluadas no presentaron actividad antibacteriana contra cepas nosocomiales productoras de BLEE; sin embargo, pueden haber muchos factores que también influyeron en los resultados como la concentración a la cual se evaluaron los extractos pudo ser muy baja para las mismas ya que en este estudio se utilizó una concentración de 200µg/ml y en los estudios previos con la técnica de macrodilución en agar se utilizó 1mg/ml de concentración. El motivo por el cual se utilizó dicha concentración es que para que se pueda proponer una nueva opción de droga terapéutica de síntesis se debe utilizar *in vitro* una concentración de 64µg/dl y utilizar una concentración tan baja con los extractos pudo ser una razón de la falta de actividad por lo que se sugiere que se realicen estudios utilizando concentraciones más altas de extracto para su evaluación por este método. Otra limitación con la que se contó al realizar esta investigación fue el tiempo ya que se pudo haber realizado la evaluación de la CIM utilizando concentraciones más altas y con una muestra más grande de bacterias nosocomiales.

Sin embargo, estos resultados no le restan validez a los estudios anteriores en donde se demostró su actividad antibacteriana de las plantas utilizadas en este estudio. Por el contrario, estos resultados hacen inspirar nuevas ideas de alternativas terapéuticas como por ejemplo realizar la evaluación antibacteriana de combinaciones de extractos de plantas que con anterioridad hallan presentado actividad antibacteriana o evaluar si existe algún tipo de sinergia entre algún antibiótico de síntesis junto con un preparado de plantas medicinales y así potenciar efectos y proponer nuevas alternativas menos tóxicas y más eficaces para contrarrestar las infecciones causadas por las bacterias multirresistentes.

Por otro lado, se recomienda que la técnica de determinación de la CIM por medio del macrométodo se realice como una prueba de tamizaje de actividad antibacteriana y no como una prueba definitiva ya que con ella no se realizan una cantidad de diluciones seriadas para la determinación real de la concentración a la cual tiene actividad el extracto. Posterior a este tamizaje realizar la evaluación por medio de la técnica que se estandarizó en este estudio.

Es importante continuar con investigaciones futuras con una población más grande así como de otro tipo de bacterias nosocomiales, tanto Gram negativo fermentadoras como no

fermentadoras así como bacterias Gram positivo. Ya que el problema en salud pública de las infecciones nosocomiales se va incrementando cada día más y se está extendiendo las infecciones comunitarias por el mal uso de antibióticos por parte de los médicos como de la población en general y que mejor utilizar recursos naturales que Guatemala posee para proponer nuevas opciones terapéuticas con base científica para mejorar la salud de la población.

## 11. CONCLUSIONES

1. El punto de corte para la determinación de la CIM por la técnica de microdilución en placa es de  $-0.020 \pm 0.04$  nm a una longitud de onda de 492 nm utilizando como revelador MTT.
2. La membrana bacteriana tiene la capacidad interactuar con MTT y así demostrarse la viabilidad bacteriana.
3. Ninguno de los 9 extractos evaluados presentó actividad antibacteriana contra cepas clínicas de enterobacterias productoras de beta-lactamasa de espectro extendido.

## 12. REFERENCIAS

- Abarca G; Herrera M. 2001. Beta-lactamasas: Su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. Revista médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera. CR. 36(1-2):77-104.
- Abdala, L. 1999. Flavonoids of the aerial parts of *Tagetes lucida* (Asteraceae). Biochem. System. Ecol. 27:753-754.
1. Aliaga R. 2001. Caracterización de las beta-lactamasas de espectro extendido y cefamicinasas en enterobacterias aisladas entre 1997 y 1999 en Barcelona. España. Disponible en : [www.phac-asp.gc.ca/publicat/ceqa-pcee/esebl98-e.htm](http://www.phac-asp.gc.ca/publicat/ceqa-pcee/esebl98-e.htm)
- Ardanuy C. 2004. Beta-lactamasas plasmídicas de espectro ampliado. Servicio de Microbiología, Control de Calidad SEIMC. Hospital de Bellvitge. Es. Disponible en: [www.seimc.org/control/revi\\_bacte/kpbpea.htm](http://www.seimc.org/control/revi_bacte/kpbpea.htm)
- Argueta, A *et al.* 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto indigenista. Tomos I, II, III.
- Askun, T *et al.* 2009. In vitro activity of methanol extracts of plants used as spices against *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria. Food Chemistry 116: 289–294
- Bär, W *et al.* 2009. Rapid method for detection of minimal bactericidal concentration of antibiotics. Journal of Microbiological Methods 77:85–89.
- Béjar, E; Malone, M. 1993. Pharmacological and Chemicals screening of *Byrsoma crassifolia*, a medicinal tree from México. Part I. Journal of Ethnopharmacology. 39:141-158.
- Bérdy, I *et al.* 1982. CRC Handbook of antibiotic compounds. Boca Raton, CRC Press. 1:410. 2:429.
- Berger, W. 1971. Flora costaricensis. Grupo Consultado Feldiana Botany. 35:146.
- Beta-lactamasas de amplio espectro. Microbiología clínica. Disponible en <http://www.microbiologiaclinica.com/beta-lactamasas2.htm>
- Bristianou, M *et al.* The impact of multidrug resistance on the pathogenicity
- Brooks G *et al.* 1999. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Mx. 16 ed. Editorial Manual Moderno.
- Bush K, Jacoby G y Medeiros A. 2004. A Funcios Classification Echeme For b-lactamasas and Its Correlation with Molecular Structure. American Society for Microbiology. 39(6):1211-1233.



- Cáceres, A *et al.* 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening for antimycotic activity of 44 plants extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 31:263-276.
- Cáceres, A *et al.* 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders: Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 38:31-38.
- Cáceres, A. 1996. *Plantas de Uso Medicinal en Guatemala*. Gt. Editorial Universitaria.
- Cáceres, A. 1999. Manual de procedimientos del proyecto biodiversidad tropical centroamericana. OEA. p. 9-12.
- Camacho-Molina, L *et al.* 2004. Métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 24 (1-2).
- Carmona, M. 2003. Prevención de la resistencia bacteriana a antimicrobianos. Aspectos farmacológicos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. Venezuela. 23(1).
- Casellas, J *et al.* 2005. Estudio de un brote debido a aislados de *Klebsiella pneumoniae* productores de beta-lactamasas de espectro extendido en un centro asistencial de Rosario-Argentina. *Revista Panamericana de Infectología*. 7(4):21-27.
- Castro, L. 2009. Fenotipificación de beta-lactamasas en cepas de enterobacterias más comunmente aisladas en los hospitales nacionales de Guatemala. Tesis licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Chirinos J. Los Mecanismos de Resistencia Microbiana. *Revista Médica del C.I.E.M. Facultades de Medicina de la Universidad Católica de Santa María y de San Agustín*. Arequipa, Perú.
- Conejo, M *et al.* 2008. Detection and reporting  $\beta$ -lactam resistance phenotypes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: a multicenter proficiency study in Spain. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 62:317–325
- Coutinho, H *et al.* 2009. Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 9:13
- Coyle M. 2006. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. Departamento de laboratorio clínico y microbiológico. Universidad de Washington. American Society of Microbiology. Organización Panamericana de la Salud. Capítulo 2 Betalactamasas.

- Danis B. *et al.* 1996. Tratado de Microbiología. 4 Ed. Editorial Masson, S.A. Barcelona, Es. p. 541-5604.
- Davis B. *et al.* 1990. Tratado de Microbiología. 2 Ed. Editorial Salvat Editores SA. Barcelona, Es. p. 190.
- Dhawan K; *et al* 1977. Screening of Indian plants for biological activity. VI. Ind. J. Exp. Biol. 15:208.
- Domínguez, X *et al.* 1989. Chemical constituents of *Lippia graveolens*. Planta Med. 55:208-209.
- Duke, J. 1985. CRC Handbook of medicinal Herbs. Boca Raton, EU. CRC Press.
- Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: a multicenter proficiency study in Spain. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 62:317–325
- Fleitas, G. 2001. Obtención de formas farmacéuticas sólidas preliminares de extracto de *Rhizophora mangle* L. M.Sc. Cu. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. Facultad de Ingeniería. P. 11-13
- Frobisher, J *et al.* 1995. Microbiología y Patología para enfermedad. 5ª ed. Mx. Editorial Interamericana.
- Fuster C; Raya R y López C. 2003. Beta-lactamasas de espectro extendido en aislamientos clínicos de *Escherichia coli* en La Comarca de El Bierzo. Sociedad Castellano-Leonesa de Microbiología. Bierzo. Es.
- Germosén-Robineau, L. 1996. Farmacopea vegetal caribeña. Santo Domingo, TRAMIL. 256-260.
- Giamarellou H. 2005. Resistencia a los Múltiples Antibióticos a las bacterias Gram negativo que producen BLEE. Clinical Microbiology and Infection. 11(4):1-16.
- Gillies R; Dodds T. 1965. Bacteriology Illustrated. E. & S. Livingston LDT. Edinburch and London. p. 78-91.
- Girón, L *et al.* 1991. Ethnobotanical Surrey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. J. Ethnopharmacol. 34:173-187.
- Glasby, J. 1991. Dictionary of plants containing secondary metabolites. London, Taylor & Francis.
- Gobernado, M. 2005. Beta-lactamasas de espectro extendido. Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Fe, Valencia. Revista Española de Quimioterapia. 18(2):115-117.
- Gold H; Moellering RC Jr. 1996. Antimicrobial-Drug Resistance. New England Journal of Medicine; 1335-1445.
- Gonçalves, J *et al.* 2005. In Vitro antirotavirus activity of some medicinal plantas used in Brazil against diarrhea. J. Ethnopharmacol. 99:403-407.
- Gunsalus, I; Satiner, R. 1960. The bacteria a treatise on structure and function. Vol 1. Academic Press: Estados Unidos de América. 328-330.

- Hardman, J; *et al.* 2003. Goodman y Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10ª ed. Mx. Editorial McGraw-Hill Interamericana editores, S.A. de C.V.: México. Vol. 2
- Hernández, I. 2007. Validación farmacológica del efecto antiinflamatorio de hoja de *Solanum hartwegii* Benth. (huiz), de hoja de *Litsea guatemalensis* Mez. (laurel) y de hoja de *Piper jacquemontianum* Kunth. (cordoncillo). Tesis de licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de CCQQ y Farmacia.
- House P *et al.* 1995. Plantas medicinales comunes de Honduras. Tegucigalpa, UNAH/CIMNH/CID/CIIR/GTZ.
- Itzep V. 2005. Detección de beta-lactamasas de espectro extendido en *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* aislado de pacientes del Hospital General San Juan de Dios. Tesis licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Jawetz E. 1987. Manual de Microbiología Médica. 3 Ed. Mx. El Manual Moderno. 636.
- Jones L. *et al.* 2005. The *aadB* Gene Cassette Is Associated with *bla<sub>SHV</sub>* Genes in *Klebsiella* Species Producing Extended-Spectrum beta-Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49(2):794-797.
- Koneman EW. 1999. Diagnóstico microbiológico. 5 Ed. EU. Editorial Médica Panamericana. p 1359.
- Lamy, B *et al.* 2004. How does susceptibility prevalence impact on the performance of disk diffusion susceptibility testing? *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 49:131–139.
- Leinmuller, E. *et.al.* 1991. Tannins in Ruminant Feedstuffs. *German Universities*. 33:9- 62.
- Linares, E. *et al.* 1999. Plantas Medicinales de México. Usos y remedios tradicionales. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Livermore D. 1995. B-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance, UK. *Clinical Microbiology Reviews*. 8(4):557-584.
- Machado E *et al.* 2005. Integron Content of Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains over 12 Years in a Single Hospital in Madrid, Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49(5):1823-1829.
- Madigan M *et al.* 2003. Biología de los Microorganismos. 10 Ed.. Es. Editorial Pearson Prentice Hall.
- Mahalim, G. 1995. 270 plantas medicinales Iberoamericanas. Primera edición. Colombia. 617 pp.

- Marchorro, S. 2007. Detección de la actividad inhibitoria de extractos etanólicos de seis plantas contra *Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi* Guatemala. Tesis de licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. p. 13-17.
- Martínez, M. 1992. Las plantas medicinales de México. México, Ed. Botas.
- Mena, G. 1994. Obtención y aprovechamiento de extractos vegetales de la flora salvadoreña. Sa. Editorial Universitaria.
- Ministry of Health of Indonesia. 1982. Utilization of medicinal plants. Jakarta, ID. Ministry of Health of Indonesia.
- Morales, R. 2004. Terapia de Bacterias Productoras de beta-lactamasas de Espectro Extendido. Ch. Revisión de Infectología.
- Morales, S *et al.* 2001. Susceptibilidad antibacteriana del *Streptococcus pneumoniae* determinando la concentración mínima inhibitoria en 1999. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 18(1-2):35-37.
- Morton, J. 1981. Atlas of medicinal plants of middle America. Springfield, US.
- Mugnaioli, C *et al.* 2006. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. Antimicrobial agents and chemotherapy. 50(8):2700-2706.
- Mulvey, M *et al.* 2005. Molecular characterization of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* from Canadian hospitals. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 49(1):358-365.
- Muraina, I *et al.* (2009). Development of a reproducible method to determine minimum inhibitory concentration (MIC) of plant extract against a slow-growing mycoplasma organism I.A. Muraina. Phytomedicine 16:262–264.
- Murria, P *et al.* 1995. Microbiología Médica. Trad. Servicios Integrales de Edición. España: Mosby. p. 725
- Nájera A. 2005. Determinación de beta-lactamasas de amplio espectro y beta-lactamasas de espectro extendido en enterobacterias provenientes de la unidad periférica del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social de la zona 11. Tesis de licenciatura. Carrera de Química Biológica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Gt.
- Nash, D; Williams L. 1976. Flora of Guatemala. Fieldiana Botany 24(11)

- Navarro-Navarro M; Bolado-Martinez E. 2005. Beta-lactamasas de Espectro Extendido. Boletín Clínico Hospital General del Estado, en Hermosillo, Sonora, México. Disponible en: <http://actamedicasonora.com/beta-lactamasas.htm>
- Neher, R. 1968. The ethnobotany of *Tagetes*. Econ. Bot. 22:317-325
- Nelson, C. 1986. Plantas Comunes de Honduras. Tegucigalpa, Hn. Editorial Universitaria.
- Nodarse, R. 1998. Monitoreo de la resistencia bacteriana *in vitro* a los antimicrobianos durante 5 años. Instituto Superior de Medicina Militar “Dr. Luis Díaz Soto”. Laboratorio de Microbiología. Revista Cubana de Medicina Militar La Habana, Cuba. 27(1)
- Ocampo, R; Malffioli, A. 1987. El uso de algunas plantas medicinales en Costa Rica. San José, CR. Trejos Hnos.
- of *Escherichia coli*: an experimental study. International Journal of Antimicrobial Agents 31:(2008) 216–223
- Oliver, A; Cantón, R. 2000. Enterobacterias productoras de beta-lactamasas plasmídicas de espectro extendido. Servicios de Microbiología. Hospital Universitario San Dureta, Palma Mallorca, y Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid, España. [http://www.seimc.org/control/revi\\_Bacte/Blees.htm](http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/Blees.htm)
- Ortiz, B; Brower, C. 1985. Chemical bases for medicinal plant use in Oaxaca, Mexico. J. ethnoharmacol. 13:57-88.
- Palavecino, E. 1997. Interpretación de los Estudios de Susceptibilidad Antimicrobiana. Boletín de la Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile. 26(3).
- Pamarola, A. *et al.* 1998. Microbiología y Parasitología Médica. 2 Ed. Barcelona, Es. Editorial Masson S.A. p. 413-442.
- Peranza-Sánchez *et al.* 2005. Screening of native plants from Yucatan for anti-*Giardia lamblia* activity. Pharmaceutical Biology. 43:594-598.
- Pérez J. 1999. Beta-lactamasa plasmídica de espectro ampliado. Experiencias del Programa de Control de Calidad: dos años después. Boletín de control de calidad SEIMC.
- Pérez, K. 2003. Comparación de la Actividad Biológica de 10 extractos Vegetales y 5 Fármacos utilizando Tres Bioensayos Toxicológicos. Gt. Tesis de licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Pp. 48-55.
- Pesewu, G *et al.* 2008. Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA. Journal of Ethnopharmacology 116:102–111.

- Rahalison *et al* 1993. Screening for antifungal activity of Panamenian plants. *Int. J. Pharmacog.* 31:68-76.
- Ramos, A *et al.* 2006. Detección precoz de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido en pacientes graves. *Revista Cubana de Medicina Intensiva y Emergencias.* 5(1).
- Rastrelli, L *et al.* 1998. Iridoids from *Lippia graveolens*. *Phytochemistry* 49:1829-1832.
- Rastrelli, L *et al.* 1998. New 12a-hydroxyrotenoids from *Gliricidia sepium* bark. *Journal of Natural Products.* 62:188-190.
- Rastrelli, L *et al.* 1996. Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytochemistry.* 45:647-650.
- Ronquillo, F *et al.* 1988. Especies vegetales de uso actual y potencial en alimentación y medicina de las zonas semiáridas del nororiente de Guatemala. *Gt. Cuadernos DIGI* 5-88.
- Rosales E. 1997. Interpretación de Estudios de Susceptibilidad Antimicrobiana. *Boletín Escuela de Median Pontificia Universidad Católica de Chile.* 26: 156-160.
- Rzedowski, G *et al* 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Michoacán, Mx. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Sakoulas, G *et al.* 2004. Relationship of MIC and bactericidal activity of efficacy of vancomycin for treatment of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology.* 42(6) .
- Salgueiro, L *et al.* 2003. Antimicrobial activity and chemicals composition of the essentials oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. *Planta Med.* 69:80-83.
- Salle, A. *Bacteriología.* 4 Ed. Barcelona, Es. Editorial Gustavo Gili, S.A. p. 749-754.
- Smith, D. *et al.* 1960. *Bacteriología de Zinsser.* 2 ed. Mx. Unión Tipográfica Editorial Hispanoamericana. p. 477-489.
- Sonnenwirth, A. *Bacilos Entéricos y Bacteroides.* (En Davis BD, *et al*, comps. *Tratado de Microbiología.* 3 Ed. Bragulat JC, trad Barcelona: Salvat Editores SA, 1987, p. 6-36) P. 529-551.
- Standley, P; Steyermark J. 1952. *Flora of Guatemala.* *Fieldiana: Botany* 24(3):24-23.
- Standley, P; Steyermark J. 1946. *Flora of Guayemala.* *Fieldiana: Botany* 24(4):35-41.
- Standley, P; Williams L. 1964. *Flora of Guatemala.* *Fieldiana: Botany* 24(7):56-58.
- Tebbd, M. 1993. Revision of piper in the New World. The taxonomy of piper sections *Lepianthen* and *Redula.* *Buletin of the Natural History Museum London.* *Botany* 23:42.

- Torres-Rodríguez, J *et al.* 1997. Concentraciones mínimas inhibitorias de levaduras a cinco antifúngicos utilizando un micrométodo de dilución estandarizado y el E-test- Revista Iberoamericana de Microbiología. 14:115-118.
- Voravuthikunchai, S *et al.* 2004. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J. Ethnopharmacol. 94:49-54.
- Weenen, A *et al.* 1990. Antimalarial activity of Tanzanian medicinal plants. Planta Med. 56:368-370.
- Wong-Beringer, A. 2001. Therapeutic Challenges Associated with Extended-spectrum, beta-lactamase produce *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Pharmacotherapy. 21(5):583-592.
- Yamamoto, E *et al.* 1984. Photodynamic hemolysis caused by  $\alpha$ -terthienyl. Planta Med. 50:124.
- Zampini, I *et al.* 2007. Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 41(3):385-393.
- Zinder J. 1997. Microbiología. 20 Ed. Ar. Panamericana. p 1696.
- Zinsser, H *et al.* 1939. A textbook of bacteriology. Century Company: USA.
- Zwadyc P. Enterobacteriaceae: Características Generales. (En Joklik WK, Wilett HP, Amos B, comps. Zinsser Microbiología. 13 Ed. LaHabana: Científico Técnica, -vol. 2, 1983. P.1413) P. 673-683.

## 13. ANEXOS

Anexo 1. Esquema de inoculación de microplacas para estandarización de la concentración mínima inhibitoria por la técnica de microdilución en placa con MTT como revelador de crecimiento bacteriano.

Reactivo		A	B	C	D	E	F	G	H	Cantidad	
Ctl. Neg.	Esterilidad del medio	○	○	○	○	○	○	○	○	200 $\mu$ L medio	
Ctl. pos	Bacteria	○	○	○	○	○	○	○	○	100 $\mu$ L medio	+ 100 $\mu$ L bacteria
ATB	Dilución 1 Dilución 2 Dilución 3 Dilución 4 Dilución 5 Dilución 6 Dilución 7 Dilución 8 Dilución 9 Dilución 10	○	○	○	○	○	○	○	○	200 $\mu$ L D1	100 $\mu$ L bacteria
										100 $\mu$ L D2	
										100 $\mu$ L D3	
										100 $\mu$ L D4	
										100 $\mu$ L D5	
										100 $\mu$ L D6	
										100 $\mu$ L D7	
										100 $\mu$ L D8	
										100 $\mu$ L D9	
										100 $\mu$ L D10	
		50 $\mu$ L MTT							100 $\mu$ L descartar		

Ctl. neg: control negativo, Ctl. Pos: control positivo, ATB: antibiótico



Anexo 2. Esquema de inoculación de microplacas para la determinación de la concentración mínima inhibitoria por la técnica de microdilución en placa con MTT como revelador de crecimiento bacteriano.

Reactivo		A	B	C	D	E	F	G	H	Cantidad	
Ctl. neg.	Esterilidad del medio	○	○	○	○	○	○	○	○	200 $\mu$ L medio	
Ctl.	Esterilidad extracto	○	○	○	○	○	○	○	○	100 $\mu$ L medio	100 $\mu$ L extracto
Ctl. pos	Bacteria	○	○	○	○	○	○	○	○	100 $\mu$ L medio	+ 100 $\mu$ L bacteria
extracto	Dilución 1	○	○	○	○	○	○	○	○	200 $\mu$ L D1	+ 100 $\mu$ L bacteria
	Dilución 2	○	○	○	○	○	○	○	○	100 $\mu$ L D2	
	Dilución 3	○	○	○	○	○	○	○	○	100 $\mu$ L D3	
	Dilución 4	○	○	○	○	○	○	○	○	100 $\mu$ L D4	
	Dilución 5	○	○	○	○	○	○	○	○	100 $\mu$ L D5	
	Dilución 6	○	○	○	○	○	○	○	○	100 $\mu$ L D6	
	Dilución 7	○	○	○	○	○	○	○	○	100 $\mu$ L D7	
	Dilución 8	○	○	○	○	○	○	○	○	100 $\mu$ L D8	
	Dilución 9	○	○	○	○	○	○	○	○	100 $\mu$ L D9	
	Dilución 10	○	○	○	○	○	○	○	○	100 $\mu$ L D10	
		50 $\mu$ L MTT								100 $\mu$ L descartar	

Ctl. neg: control negativo, Ctl. Pos: control positivo, ATB: antibiótico.

## Anexo 3. Susceptibilidad de cada una de las enterobacterias productoras de BLEE evaluadas contra los extractos de plantas.

Muestra	Origen	Servicio	Ciprofloxacina	Ertapenem	Gatifloxacina	Gemifloxacina	Gentamicina	Imipenem	Levofloxacina	Meropenem	Moxifloxacina	Nitrofurantoina	Piperazilina/ Tazobactam	Tetraciclina	Ticarcilina / Ác. Clavulánico	Tobramicina	Trimetoprim sulfametoxazol
<i>Escherichia coli</i>																	
Eco1	Área cruenta	CH	R	-	-	-	S	R	R	I	R	-	S	-	S	R	R
Eco2	Tejido	MH	R	-	R	R	S	S	R	-	-	-	S	-	-	R	R
Eco3	LCR	UCC	R	-	R	R	R	S	R	-	-	-	I	-	-	I	R
Eco4	LP	CT	R	-	-	-	R	S	R	S	R	-	R	-	I	R	R
Eco5	Secreción	EMA	R	-	-	-	S	S	R	S	R	-	S	-	S	R	R
Eco6	Urocultivo	COEX	R	S	R	R	R	-	R	-	-	S	S	R	I	R	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>																	
Kpn1	LCR	UCIN	S	-	-	-	R	S	S	S	S	-	S	-	I	R	S
Kpn2	Herida operatoria	SEPTICO	R	I	R	R	S	S	R	-	-	-	R	-	-	R	S
Kpn3	AOT	UCP	S	-	-	-	R	S	S	S	S	-	S	-	-	R	R
Kpn4	Secreción	UCI	R	-	-	-	R	S	R	-	-	-	R	-	R	R	R
Kpn5	AOT	UCIN	I	-	-	-	S	S	S	S	S	-	R	-	R	R	R
Kpn6	Herida operatoria	Nutrición	S	-	S	S	R	S	S	-	-	-	S	-	-	R	S
<i>Enterobacter cloacae</i>																	
Ecl1	Urocultivo	COEX	S	S	S	S	R	-	S	-	-	S	S	R	I	R	R
Ecl2	Tejido	UV	R	S	R	R	R	R	R	-	-	-	R	-	-	R	R
Ecl3	Secreción	TM	R	I	R	R	S	S	R	-	-	-	R	-	-	R	R
Ecl4	Abdomen	UV	S	-	-	R	-	R	S	R	R	-	I	-	R	R	R
Ecl5	Catéter	EP	R	S	R	R	R	S	R	-	-	-	S	-	-	R	R
Ecl6	Secreción	EP	R	-	-	-	R	S	R	S	R	-	S	-	S	R	R

LCR: Líquido cefalorraquídeo. LP: Líquido peritoneal. AOT: aspirado orotraqueal. CH: Cirugía de hombres. MH: Medicina de hombres. UCC: Unidad de cuidados coronarios. UCP: unidad de cuidados progresivos. CT: Cirugía de tórax. EMA: Emergencia de medicina de adultos. UCIN: Unidad de cuidados intensivos neonatales. UCI: Unidad de cuidados intensivos. COEX: Consulta externa. UV: Unidad V: operados de emergencia. TM: Trauma de mujeres. EP: Emergencia de pediatría. No se incluyen los antibióticos betalactámicos debido a que todas las cepas son productoras de BLEE.

---

Ligia Maribel Castro Peláez  
Tesisista

---

Licenciado Armando Cáceres  
Asesor

---

Dalia Lau, QB, PhD  
Revisora

---

MSc. Anne Marie Liere de Godoy  
Directora de Escuela de Post grados

---

Dr. Óscar Cobar Pinto, Ph.D.  
Decano