

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

**“Inhibición por extractos vegetales de uso medicinal de
Pseudomonas aeruginosa y *Acinetobacter baumannii*
multi-resistentes”**

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

Milvia Roxana Arana Barrera

Nely Janira Ortiz Ramírez

Químicas Biólogas

Guatemala, Julio 2012

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

**“Inhibición por extractos vegetales de uso medicinal de
Pseudomonas aeruginosa y *Acinetobacter baumannii*
multi-resistentes”**

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

Presentado por:

Milvia Roxana Arana Barrera

Nely Janira Ortiz Ramírez

Para optar al título de:

Químicas Biólogas

Guatemala, Julio 2012

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Fausto René Beber García	Vocal IV
Br. Carlos Francisco Porra López	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

Universidad de San Carlos de Guatemala

A esta magnífica casa de estudios, por darnos la oportunidad de formarnos como profesionales.

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

La cual nos albergó en sus aulas, donde nuestra formación académica nos fue formando poco a poco en profesionales.

Escuela de Química Biológica

Por brindarnos todos los conocimientos necesarios para llegar a convertirnos en Químicas Biólogas.

Nuestro Asesor

Lic. Armando Cáceres por sus conocimientos, apoyo, comprensión, tiempo y dedicación durante la realización de la investigación. Además de brindarnos su confianza y amistad durante el transcurso de la carrera. Mil Gracias.

Nuestro Revisor

MSc. Martin Gil por su tiempo y valiosos aportes realizados a nuestra investigación.

Licda. Ligia Castro

Por brindarnos su confianza y tener la paciencia de enseñarnos paso a paso como lograr resultados en nuestra investigación y por atendernos en cada momento que lo requerimos. Muchas Gracias.

Licda. Isabel Gaitán

Por toda su ayuda y apoyo durante la realización de nuestra investigación.

Hospital General San Juan de Dios

Por su colaboración para la realización de esta investigación.

Nuestros Catedráticos

Por todos sus conocimientos y enseñanzas impartidos para nuestra formación académica. En Especial al Lic. Armando Cáceres, Licda. Isabel Gaitán, Licda. Karla Lange, Licda. Shenny Paredes.

Depto. Citohistología

Por permitirnos realizar nuestra investigación en sus instalaciones.

ACTO QUE DEDICO

- A Dios** Por brindarme la vida y estar conmigo en cada momento, y por enseñarme a tener paciencia y confianza en Él sobre todas las cosas.
- A mis Padres** José Alberto Ortiz y Nely Leticia Ramírez de Ortiz, porque siempre creyeron en mí y me apoyaron en cada paso que di en la vida, reprendiendo y comprendiendo mis equivocaciones. Además por todo lo que me enseñaron con esmero, dedicación y tanto amor. Y sus consejos que me hacen ser lo que ahora soy. Los Amo.
- A mis hermanos** Wagner Alberto y Martha Leticia Ortiz Ramírez, por estar siempre conmigo, por darme ánimo y su apoyo incondicional. Los amo hermanitos.
- A mi Esposo** Lusvin de León, porque desde que nos conocimos ha estado conmigo en los bueno y en los malos momentos. Gracias por decidir compartir la vida conmigo. Mis logros son tus logros y los tuyos los míos. Te Amo.
- A mis Abuelos** Marco Aurelio Ramírez, Marta Manuela de Ramírez (QEPD), Antonio Ortiz y Feliciano de Ortiz, por darles la vida a mis padres y por todos sus cuidados y amor durante toda mi vida.
- A mis tíos, primos y demás familia**
Por su apoyo y cariño incondicional.
- A Roxana Arana** Por permitirme trabajar con ella y apoyarnos en los momentos en los cuales nos faltaban las ganas y las fuerzas para continuar, brindarme su valiosa amistad.
- A mis Amigos** Débora, Nidia, Astrid, Enna, Clarita, Nancy, Crista, Clau, Bonier, Doren, David Marcos, Marco Tulio, Sandrita Corado (y su familia), Gudiel, Griss, Axel, Henry López, Licda. Taracena, Irra, Keren, Carmen. A todos porque han compartido buenos momentos, consejos y cariño especial conmigo.

Nely

ACTO QUE DEDICO

- A Dios** Por estar conmigo en todo momento, por ser mi confianza, soporte, refugio y fiel amigo y por enseñarme que con fe todo es posible.
- A mis Padres** Margarito Israel Arana Ruano y Milvia Ercila Barrera Ortiz, porque siempre han estado ahí para mí; creyendo, confiando y apoyándome. Gracias por su amor, esfuerzo, sacrificio y dedicación, gracias por ser mi ejemplo, mi orgullo, mis consejeros y mis amigos. Este logro no es solo mío es de ustedes también. Los AMO.
- A mis hermanos** Emilio y José Pablo por su amor, por estar siempre ahí para mí y por ayudar a formar quien soy hoy. Los AMO.
- A mis Abuelos** Sotero Barrera (QEPD) y Albertina Ortiz, Buenaventura Arana (QEPD) y Eufemia Ruano, por su amor, por sus oraciones y por siempre estar pendiente de mí en todo momento, Gracias.
- A mis tíos, primos y demás familia**
Por su apoyo y cariño incondicional.
- A Nely Ortiz** Por su apoyo, por su amistad, por acompañarme en esta hermosa aventura; por ser las fuerzas y el optimismo que muchas veces a mí me faltaban; y por todos los buenos recuerdos que nos quedaron y por todos aquellos que seguiremos cosechando juntas a lo largo de la vida.
- A mis Amigos** Nancy, Darío, Danny, Betsy, Olguita, Esteban, Cony, Chinito, Andrés, Hugo, Mincho, Naty, Nydia, Clarita, Débora, Astrid, Enna, Doren, Crista, Claudia, Ruby, Jorge, Alex, Heidi por su amistad, porque muchos de ustedes han sido más que amigos han sido como hermanos para mí; Gracias por enseñarme que es la verdadera amistad.

INDICE

CONTENIDO	No. PAGINA
1. Ámbito de la investigación	1
2. Resumen	2
3. Generalidades	3
3.1 Generalidades	3
3.2 Enfermedades ocasionadas	4
3.3 Mecanismo de resistencia	5
3.4 Epidemiología de la multi-resistencia	7
3.5 Métodos de determinación de antibiograma	10
3.6 Tratamiento de infecciones con quimioterapia antibacteriana	16
3.7 Actividad antimicrobiana de las plantas	18
3.8 Monografía de plantas	
3.8.1 <i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) HBK.	19
3.8.2 <i>Cornutia grandifolia</i> Schauer	21
3.8.3 <i>Croton guatemalensis</i> Lotsy	22
3.8.4 <i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.) Steud.	23
3.8.5 <i>Lippia graveolens</i> HBK.	25
3.8.6 <i>Piper jacquemontianum</i> Kunth	26
3.8.7 <i>Psidium guajava</i> L	28
3.8.8 <i>Rhizophora mangle</i> L.	29
3.8.9 <i>Smilax domingensis</i> Willd	31
3.8.10 <i>Tagetes lucida</i> Cav	33
4. Justificación	35

5. Objetivos	36
6. Hipótesis	37
7. Materiales y Métodos	38
8. Resultados	47
9. Discusión	53
10. Conclusiones	56
11. Recomendaciones	57
12. Referencias	58
13. Anexos	70

1. AMBITO DE LA INVESTIGACION

En la última década, la resistencia bacteriana a los antibióticos ha aumentado de manera notable, un claro ejemplo de ello son los hospitales nacionales que reportan un incremento de la resistencia bacteriana la cual ha sido notoria hasta el punto que la Organización Mundial de la Salud considera a las infecciones nosocomiales ocasionadas por microorganismos multi-resistentes, como enfermedades emergentes. Actualmente, una gran parte de los antibióticos disponibles no son aptos para el tratamiento de patógenos resistentes pertenecientes al importante grupo de bacterias Gram negativo y se ha observado un incremento progresivo de la incidencia de cepas resistentes a diversos antibióticos de última generación, como por ejemplo el imipenem, así como de cepas que presentan una sensibilidad disminuida simultáneamente a diversos grupos de antibióticos como penicilinas, cefalosporinas, quinolonas y aminoglicósidos, situación que ha agravado notablemente la dificultad terapéutica que habitualmente se usan para las infecciones causadas por estos patógenos. La resistencia de bacterias de tipo nosocomial a los antimicrobianos es un fenómeno con graves repercusiones en la morbilidad y mortalidad hospitalarias, particularmente en las salas de cuidados intensivos.

En los últimos años en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala se han realizado una serie de estudios donde se han hecho pruebas para determinar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas nativas y sus diferentes componentes contra diferentes especies de bacterias convencionales tanto Gram negativo como Gram positivo, estandarizando métodos y determinando que plantas poseen actividad antimicrobiana. En la presente investigación se pretende utilizar dichos métodos y especies vegetales nativas contra cepas multi-resistentes y así poder encontrar nuevas alternativas terapéuticas naturales. Los resultados generan nuevas pautas de investigación con base a los extractos de plantas para obtener mejores resultados en los tratamientos, dirigidos por el departamento de Citohistología de la Facultad y contribuir a manejar el problema en los hospitales.

2. RESUMEN

En la actualidad en nuestros hospitales las bacterias Gram negativo han tomado mucha importancia en cuanto a infecciones nosocomiales, de las cuales las más preocupantes y peligrosas son *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. Esto es debido a que en nuestro país, generalmente los médicos al detectar una infección nosocomial, administran altas dosis de antibióticos de amplio espectro, sin haber identificado el agente causal, lo que favorece a la aparición de multi-resistencia. Guatemala es un país rico en flora medicinal y nuestros antepasados la han utilizado desde tiempos remotos, por lo cual hoy en día se realizan diversos estudios en donde se ha demostrado que plantas como el pericón (*Tagetes lucida*), el nance (*Byrsonima crassifolia*), la guayaba (*Psidium guajava*), entre otras, tienen actividad antibacteriana comprobada.

El objetivo del presente estudio fue estandarizar la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) por la técnica de microdilución en placa utilizando como revelador de viabilidad bacteriana el reactivo MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), así mismo contribuir con posibles alternativas de tratamiento antibiótico natural para las infecciones causadas por estos dos agentes, evaluando cepas clínicas multi-resistentes contra 10 extractos de plantas nativas de la región y determinando la CIM de los mismos.

Para la estandarización se utilizó un estándar de imipenem y se enfrentó a cepas de 24 h de crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC 27853. Se realizó una curva de calibración con acumulación de medidas para obtener los valores finales de la técnica y se determinó el punto de corte el cual es de -0.020 ± 0.04 nm. Además se evaluaron tiempos de incubación para las cepas clínicas, determinándose un tiempo de 20 y 8 h para *A. baumannii* y *P. aeruginosa* respectivamente a 37°C y se reveló la actividad bacteriana por reducción del MTT y se leyó a una absorbancia de 492 nm con un filtro diferencial de 630 nm.

Se determinó que de los 10 extractos alcohólicos de las plantas seleccionadas 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 400 µg/mL de los cuales *B. crassifolia* fue el que tuvo mayor actividad antibacteriana en las diferentes cepas; cuatro de *P. aeruginosa* (dos de las cepas a 400 µg/mL y dos cepas a 200 µg/mL) y tres de *A. baumannii* (dos de las cepas a 400 µg/mL y una cepa a 200 µg/mL) y *P. guajava* que tuvo actividad a una concentración de 400 µg/mL en únicamente una cepa de *A. baumannii*.

3. ANTECEDENTES

Las bacterias Gram negativo, como *Pseudomonas* sp. y *Acinetobacter* sp., las cuales están implicadas en la mayoría de infecciones nosocomiales. En Guatemala, generalmente los médicos al detectar que un paciente padece de una infección nosocomial, administran altas dosis de antibióticos de amplio espectro, sin haber identificado el agente causal, lo que favorece a la aparición de multiresistencia en estos microorganismos (Rosales, 2005).

3.1 Generalidades

3.1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

El género *Pseudomonas*, pertenece a la familia de *Pseudomonadaceae*, es un género de especies capaces de utilizar un amplio rango de compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, y capaces de vivir bajo muy diversas condiciones ambientales. Debido a estas condiciones estos microorganismos son ubicuos, y los podemos encontrar tanto en la tierra como en el agua (Palleroni, 1992; Scroth, Hildebrand y Panopoulous, 1992).

En general crecen rápidamente y presentan gran habilidad para metabolizar una amplia variedad de substratos, incluyendo compuestos orgánicos tóxicos, como hidrocarburos alifáticos y aromáticos. Las cepas de *Pseudomonas* sp. son frecuentemente resistentes a antibióticos, desinfectantes, detergentes, metales pesados y disolventes orgánicos (Ruiz, 2007).

P. aeruginosa es un bacilo Gram negativo, aerobio, no formador de esporas, puede presentar de 1.5 a 3.0 μm de largo y un diámetro de 0.5 a 0.8 μm . Es móvil por medio de un único flagelo polar, aunque en algunas ocasiones se han observado algunos aislados con dos o tres flagelos, y usualmente presentan pili, que puede ser antifagocítico y puede colaborar en el ataque bacteriano, promoviendo la colonización; algunas producen pigmentos hidrosolubles que se difunden en el agar o medio de cultivo, como la fluoresceína que puede ser vista bajo luz ultravioleta; un pigmento azul (piocianina) que puede ser visto en lesiones patológicas. Es oxidasa y catalasa positivo. (Rosales, 2005; Ruiz, 2007).

La mayoría de especies del género, no crecen bajo condiciones ácidas (pH 4.5 o menos); crecen en agar MacConkey, como no fermentadores de lactosa; la mayoría de especies crecen entre 25 y 42°C, pero algunas, que son psicrófilas crecen entre 5 y 10°C, sus diferentes

especies se pueden diferenciar por pruebas bioquímicas o pruebas de ADN. La detección de esta bacteria es importante, por su capacidad de causar enfermedad en individuos susceptibles, y por su resistencia a los antibióticos (Palleroni, 1992; Ross, 1993).

3.1.2 *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter es un bacilo o cocobacilo Gram negativo, muchas veces dispuestos en parejas, no fermentan la glucosa y son aerobios estrictos, inmóviles, catalasa positivo y oxidasa negativo. Crecen bien en todos los medios de cultivo de rutina, su temperatura óptima de crecimiento es de 33 a 35°C (Ramírez, Pino, González, Bello, Domínguez, Mella, Zemelman et al., 2000).

Los miembros del género *Acinetobacter* han sufrido una gran cantidad de cambios taxonómicos a lo largo de la historia, lo cual ha impedido su estudio adecuado. La última definición taxonómica de *Acinetobacter* corresponde a Bouvet y Grimont e incluye 17 genoespecies, *A. baumannii* es la más frecuentemente aislada y con mayor importancia clínica (Ramírez et al., 2000).

3.2 Enfermedades ocasionadas

3.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Las infecciones graves por *Pseudomonas* afectan casi siempre a enfermos inmunodeprimidos o con enfermedades crónicas extenuantes y la naturaleza de la enfermedad subyacente determina generalmente el resultado final. En los enfermos con fibrosis quística, el tracto respiratorio se ve colonizado por *P. aeruginosa* al final de la enfermedad y con frecuencia la muerte sobreviene por complicaciones pulmonares de la infección crónica. Se da también en pacientes de riesgo como aquellos que padecen procesos malignos hematológicos, como leucemia o neutropenia secundaria a tratamientos inmunosupresores, siendo la neumonía con bacteremia la infección más frecuente entre ellos (Palleroni, 1992; Schroth et al., 1992).

De igual forma, la cateterización intravenosa o urinaria invasiva prolongada, los procedimientos quirúrgicos invasivos y las quemaduras graves posibilitan que el organismo burle la protección de la capa dérmica y colonice diversos tejidos, lo que con frecuencia conduce a la septicemia (Palleroni, 1992).

También puede producir endocarditis sobre todo en personas drogadictas por vía intravenosa, así como en enfermos con complicaciones tras cirugía abierta al corazón. *P. aeruginosa* puede producir infecciones oculares altamente destructivas, originadas a partir de soluciones oftálmicas contaminadas, tras quemaduras faciales graves, tras un traumatismo grave o a veces a partir de heridas abiertas (Schroth et al., 1992).

3.2.2 *Acinetobacter baumannii*

Se le ha implicado en diferentes infecciones nosocomiales incluyendo bacteremias, infecciones del tracto urinario y meningitis, pero principalmente se encuentra implicado en las neumonías nosocomiales y de forma especial en las asociadas a ventilación mecánica en los pacientes ingresados en las unidades de cuidados intensivos. Estos enfermos, internados durante periodos prolongados por una enfermedad de base (tumores, quemaduras o inmunodepresión), con terapia respiratoria prolongada, con ventilación mecánica y con tratamiento antimicrobiano previo, los que han sido sometidos recientemente a cirugía mayor y los ancianos, presentan una clara predisposición a adquirir una infección por este microorganismo (Ross, 1993; Ruiz, 2007).

3.3 Mecanismo de resistencia

3.3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Por vivir en suelos con bacilos y actinomicetos, ha adquirido resistencia a una gran variedad de antibióticos naturales, además de la resistencia transmitida por plásmidos a través de la conjugación y transducción. *Pseudomonas* presenta tres mecanismos comunes de resistencia β -lactamasas o enzimas modificadas de aminoglucósido, ADN girasa alterada y porinas alteradas (Hsueh, Teng, Yang, Chen, Ho y Luh, 1998; Konemam, Allen, Dowell y Sommers, 1997).

3.3.1.1 Inactivación enzimática

Los antibióticos que presentan este mecanismo son los β -lactámicos y aminoglucósidos. En los bacilos Gram negativo hay plásmidos predominantes llamados TEM-1, TEM-2 y SHV-1 los cuales son β -lactamasas y se clasifican en el grupo 2b de la clasificación de Bush. Tiene una alta afinidad por ampicilina y amoxicilina y las modifica rápidamente, cefamicinas (cefotixin, cefmetazol, cefotetan), cefalosporinas aminotiazolicas (cefatoxima, ceftriaxona, ceftazidima), monobactam (aztreonam) y carbapenem (imipenem) son mas estables a estas enzimas (Livermore, 1995; Marcos, Martínez y Máttar, 2003; Navarro, 2003).

Estas β -lactamasas de amplio espectro (BLEAs) son enzimas que se han originado desde las enzimas TEM-1, TEM-2 y SHV-1 tras sufrir diversas mutaciones. Tienen de uno a cuatro sustituciones de aminoácidos comparado con las enzimas originales. La mayoría de los aislamientos clínicos que producen BLEAs emparentadas con TEM o SHV son de pacientes hospitalizados y causan con cierta frecuencia brotes nosocomiales. Pueden presentar modificaciones de los receptores, esto sucede con las proteínas fijadoras de penicilina, alteraciones ribosómicas y alteraciones de la ADN girasa (Marcos et al., 2003).

3.3.1.2 Transporte alterado del antibiótico

Hay una alteración de la permeabilidad del antibiótico. Esto se da mediante la alteración de las proteínas de la membrana externa (porinas), o la disminución de la fuerza motora proteica, que es el transporte activo desde la célula bacteriana (eflujo) (Navarro, 2003).

3.3.1.2.1 Porinas: Las porinas principales de *P. aeruginosa* generalmente no permite el ingreso de antibióticos como el imipenem, si no a través de una proteína (D2) la cual es de transporte específico, además de la presencia de una β -lactamasa clase C cromosómica (Navarro, 2003).

3.3.1.2.2 Eflujo: Es un mecanismo importante en la eliminación activa de antibióticos de la célula, por lo que las concentraciones intracelulares nunca alcanzan el nivel suficiente para actuar como antimicrobiano eficaz. Es un mecanismo dependiente de energía en contra de tetraciclinas y macrólidos que actúan al nivel de inhibición de síntesis proteica en el ribosoma. En *P. aeruginosa*, lo hace a través de la proteína de membrana externa (OprK), involucrada en la secreción de sideróforos, un exceso de esta proteína confiere resistencia a múltiples antibióticos, como ciprofloxacina, ácido nalidixico, tetraciclinas y cloranfenicol. Los antibióticos para los que *P. aeruginosa* presenta mayor resistencia son cefalosporinas de tercera generación y quinolonas; además si existe resistencia a carbapenemes se dice que presenta multi-resistencia (Navarro, 2003; Marcos, 2003).

3.3.2 *Acinetobacter baumannii*

Presenta dos mecanismos comunes de resistencia: escasa penetración del antimicrobiano (mutación de porinas o bomba de eflujo) e hidrólisis de β -lactamasas. Ambos mecanismos son similares a los de *P. aeruginosa* (De Vos et al., 1997; Walsh, Bolmström, Qwörnström y Gales, 2002).

3.3.2.1 Inactivación enzimática

La resistencia a los β -lactámicos es debida a la presencia de diferentes β -lactamasas; TEM-1, TEM-2, CARB-5, cefalosporinas de pI 8.5, ceftazidimasas y la producción en enzimas inactivantes, frecuentemente es hallada la aminoglucósido-3'-fosfotransferasa VI que inactiva la amikacina. Se ha comprobado que la resistencia a las quinolonas es debida a mutaciones en los genes *ggrA* y *parC*. *A. baumannii* presenta multi-resistencia y esta se acentúa cuando hay resistencia a carbapenemes (Walsh et al., 2002).

Cai, Wang, Liang y An (2009) realizaron un estudio de la actividad bactericida *in vitro* de la colistina en contra del biofilm asociado con *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, ya que los biofilms son uno de los mecanismos más importantes de la persistencia la multi-resistencia en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. La CIM se evaluó en 72 h con colistina de 4 mg/mL la cual mostró poco efecto en tres cepas después de 24 h, se probó con colistina de 8 mg/dL esas mismas tres cepas mostraron reducción evidente en comparación con grupos control sin colistina. Para lo cual se evaluó el efecto a las 24, 48 y 72 h y mostrando disminución significativa a 48 y 72 h cuando el biofilm ya está maduro.

3.4 Epidemiología de la multi-resistencia

3.4.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es de distribución mundial, se aísla de suelos, agua, plantas, animales incluyendo al hombre, algunas veces patógeno para animales y vegetales. La epidemiología de *P. aeruginosa* refleja su predilección por un medio ambiente húmedo, esto es evidente ya que su ambiente natural está relacionado con agua y suelo (Espinoza, 2010).

La colonización humana ocurre en sitios húmedos como el perineo, axilas y oídos, la humedad es un factor crítico en los hospitales, sus principales reservorios son los equipos de ventilación mecánica, soluciones de limpieza, medicamentos, desinfectantes, etc. Las infecciones nosocomiales también se asocian a ambientes húmedos como piscinas, soluciones para lentes de contacto y otros, así como pacientes con quemaduras serias de la piel, pacientes ventilados, o con tubos nasogástricos. Es fundamentalmente un patógeno nosocomial, ocupa el cuarto lugar en frecuencia (Espinoza, 2010).

Desde finales del siglo pasado, *P. aeruginosa* se ha elegido como una de las bacterias Gram negativo más problemáticas en el ambiente hospitalario. Afecta a pacientes en estado crítico,

y causa infecciones serias y fatales que van, desde una enfermedad sistémica aguda en quemados y pacientes neutropénicos, hasta infecciones crónicas del tracto respiratorio en pacientes con fibrosis quística. Generalmente afecta a pacientes con terapia de antibióticos de amplio espectro, corticosteroides o antimetabólicos, o por inserción de catéteres urinarios o tubos endotraqueales (Speijer, Sawelkoul, Bonten, Stobberingh, y Tjhiel, 1997).

Sánchez (2007) realizó un estudio en donde demostró que *Pseudomonas* sp. es uno de los microorganismos Gram negativo más comunes capaces de causar infecciones del tracto urinario. Su versatilidad le permite crecer en suelo, pantanos, y hábitat marinos costeros, así como en los tejidos finos de plantas y animales. *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista capaz de causar infecciones urinarias, infecciones del sistema respiratorio, dermatitis, infecciones suaves del tejido fino, bacteremia y una variedad de infecciones sistémicas, particularmente en pacientes con quemaduras severas y en pacientes inmunosuprimidos con cáncer y SIDA (Speijer et al., 1997).

Bolaños (1997) realizó un estudio en Cuba en donde se identificaron y caracterizaron bacilos Gram negativo no fermentadores aislados en el medio hospitalario, demostrándose especies de *Pseudomonas* en un 88.2% y de *Acinetobacter* en un 17.8% como los principales causantes de infecciones intrahospitalarias del grupo.

3.4.2 *Acinetobacter baumannii*

Es una infección intrahospitalaria dentro de las cuales las más frecuentes son; las infecciones respiratorias en la unidad de cuidados intensivos (UCI), heridas operatorias en cirugía, en pacientes de medicina, estas infecciones son causantes de multi-resistencia antimicrobiana, particularmente a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, mediado por acción de β -lactamasas cromosomales y por impermeabilidad, además de presencia de carbapenemasas entre otra acciones clínicas (Espinoza, 2010).

En los últimos años se han incrementado las infecciones nosocomiales por *A. baumannii*, algunas de estas graves como sepsis, neumonía y meningitis. No es infrecuente que algunas de estas infecciones nosocomiales aparezcan en forma de brotes. Las unidades más afectadas son las de cuidados intensivos y quemados, donde el uso masivo de antibióticos puede favorecer la aparición de cepas multi-resistentes (Cai et al., 2009).

A. baumannii puede ser hallado en múltiples medios animados e inanimados, debido a la simplicidad en sus requerimientos de crecimiento y a la capacidad para usar una gran variedad de fuentes de carbono, a través de diversas vías metabólicas. Se le ha aislado en equipo, hospitalario, como aparatos de ventilación mecánica, catéteres, líquido de diálisis peritoneal y una amplia variedad de instrumentos. Además, puede formar parte de la microbiota de la piel de los adultos sanos (especialmente las manos) y puede colonizar la cavidad oral, faringe e intestino, constituyendo éstos unos reservorios epidemiológicos muy importantes en infecciones nosocomiales (Cai et al., 2009; Giamerellou, Antoniadou y Kanellakopoulou, 2008).

A. baumannii fue encontrada en 56% de todas las cepas aisladas de manzana, melón, frijol, repollo, coliflor, zanahoria, papa, rábano, lechuga, pepino, pimienta, champiñones y maíz. Por lo tanto, de acuerdo con este último estudio, la comida del hospital podría ser una fuente potencial de la adquisición de *A. baumannii* y su posterior colonización del tracto digestivo de los pacientes hospitalizados (Giamerellou et al., 2008).

Otro estudio realizado en Chile, en el 2005 se determinó que *A. baumannii* ha emergido como un patógeno intrahospitalario de mayor relevancia mundial como agente causal de infecciones como neumonía, bacteremia, meningitis, infecciones del tracto urinario y de partes blandas, asociándose a alta mortalidad (Diomedi, 2005).

Barchita (2008) realizó un estudio de adquisición y propagación de la infección de *A. baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia* en la unidad de cuidados intensivos de un hospital en Catania, Italia. De 121 casos de pacientes se identificaron 47 aislamientos de *A. baumannii* (17.3%) y de *S. maltophilia* 45 pacientes (17.3%). La epidemiología de *A. baumannii* es confirmada con su rol de transmisión y es común adquirirla dentro de los hospitales, en cambio con la *S. maltophilia* la cual no es común y solo unos pocos clones se han asociado a la transmisión entre pacientes.

Giamerellou et al. (2008) realizaron un estudio en donde se aislaron cepas de *A. baumannii* de pacientes de la unidad de cuidados intensivos, el 94% eran resistentes a imipenem, el 75% de sulbactam, el 99% a piperacilina/tazobactam, 99% a las fluoroquinolonas, el 96% de amikacina y el 3% a la colistina, el 100% fueron sensibles a tigeciclina con una CIM₅₀ de 0.5 g/mL y una CIM₉₀ de 1 g/mL incluyendo cepas resistentes a la colistina.

Kanellakopoulou, Sarafis, Galani, Giamarellou, y Giamarellos (2008) probaron *in vitro* la sinergia entre β -lactámicos como ciprofloxacina y moxifloxacina con fluoroquinolonas y carbapenemes contra cepas multi-resistentes, genéticamente distintas de *P. aeruginosa*. De un total de 200 aislamientos, se seleccionaron 24 cepas genéticamente distintas definidas por electroforesis en gel de campo pulsado. Los aislamientos fueron expuestos a imipenem, meropenem y ceftazidima, así como a sus combinaciones con ciprofloxacina y moxifloxacina, todos los aislamientos eran resistentes a todos los agentes probados en concentraciones iguales a su nivel sérico promedio. La sinergia de cualquiera de las combinaciones probadas se encuentran en 10 aislamientos (41.7%). Esto quedó mostrado después de 4 y 6 h de exposición acompañado por el nuevo crecimiento después de 24 h; no todas las combinaciones probadas fueron activas contra las mismas cepas. La combinación de imipenem mas ciprofloxacina, ceftazidima mas ciprofloxacina e imipenem mas moxifloxacino fueron los más activos.

Oudhuis, Verbon, Hoogkamp, y Stobberingh (2008) probaron la resistencia a los antimicrobianos en *Escherichia coli* y *P. aeruginosa* en la unidad de cuidados intensivos de los países bajos de 1998 al 2005. En 1998 un sistema de vigilancia a nivel nacional de resistencia a antibióticos entre cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* en 14 pacientes de unidades de intensivos. Se determinó la CIM de penicilinas de amplio espectro con o sin β -lactamasas, cefalosporinas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas y se determinó por el método de microdilución en caldo. Se observó un incremento en los porcentajes de resistencia. Para *E. coli*, la resistencia a la amoxicilina era de 44% hasta 2004 y aumento a 56% en 2005. Del mismo modo con piperacilina con un 11% hasta el año 2004 y aumento a 38% en 2005. Al igual con el aumento de resistencia de *P. aeruginosa* cuyos resultados fueron muy similares, sin embargo, la más marcada fue el aumento de la resistencia a la ciproloxacina la cual se duplicó para el 2005.

3.5 Métodos de determinación de antibiograma

Los métodos de susceptibilidad antimicrobiana son métodos *in vitro* que determinan la susceptibilidad de los microorganismos a una variedad de agentes antimicrobianos, bajo condiciones de laboratorio específica y estandarizada. La meta principal del estudio de susceptibilidad es proveer al clínico algunas recomendaciones sobre la terapia que puede ser más apropiada a 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 como un microorganismo podría responder *in vitro* a un determinado antibiótico (Castro, 2009).

Los métodos más utilizados para la evaluación de la actividad antimicrobiana han sido los de difusión y dilución, tanto para sustancias puras como para extracto de plantas. En ambos casos existen factores tales como: composición del medio de cultivo, microorganismos de prueba, pH y otros aspectos con los que pueden variar los resultados (Mahaffey, Dutnam, Barrett y Jones, 1996).

3.5.1 Método de difusión

En 1966, se reconoció como el primer método para la realización de un antibiograma; para el método de difusión generalmente se utilizan discos de papel filtro impregnado con las soluciones antimicrobianas a ensayar, éstos se aplican sobre placas de agar inoculadas con el microorganismo de prueba. Al ponerse en contacto el disco con el agar, absorbe agua del medio, con lo que se disuelve la solución y empieza a difundirse a través de la capa de agar. Al mismo tiempo que el antibiótico va difundiendo esta ocurriendo la multiplicación bacteriana. Durante la fase de crecimiento logarítmico en la que la multiplicación bacteriana ocurre más rápidamente que la difusión del antibiótico las bacterias que aun no han sido inhibidas seguirán multiplicándose, hasta formar un halo alrededor del disco que puede visualizarse luego de cierto tiempo de incubación. No habrá crecimiento en el área donde el antibiótico este en concentraciones inhibitorias, por lo tanto, mientras más susceptible sea el microorganismo el diámetro del halo será mayor (Peterson y Shanholtzer, 1992; Mehaffey et al., 1997).

Lamy, Carret, Fladois, y Delignette (2004) indicaron que las pruebas de sensibilidad antibiótica en disco deben de ser eficaces ya que en un contexto clínico deben de 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 estos 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.

3.5.2 Método de dilución

Las pruebas de dilución son utilizadas principalmente para determinar la Concentración mínima inhibitoria (CIM) de un extracto o de una sustancia pura. El método consiste en que a un cultivo del microorganismo en estudio se le inoculen cantidades específicas del antibiótico, preparado en concentraciones decrecientes en caldo o agar por la técnica de dilución seriada (Mahaffey et al., 1997).

3.5.2.1 Dilución en caldo

En este método de dilución, el indicador de inhibición es la turbidez del medio, cuando no existe crecimiento el medio permanece claro, es decir el antibiótico inhibe al microorganismo; y cuando el antibiótico no tiene ningún efecto entonces hay crecimiento y el medio aparece turbio. El grado de inhibición se relaciona con la turbidez y estas se miden por espectrofotometría. La concentración mínima del antibiótico que no muestre crecimiento es la medida del efecto bacteriostático del mismo sobre el microorganismo (Mahaffey et al., 1997).

3.5.2.2 Dilución en agar

Es considerado el método de referencia. En este método, se preparan diluciones de antibiótico y se mezclan con un determinado volumen de agar, para obtener las concentraciones deseadas. Estas son inoculadas con el microorganismo en estudio y luego incubadas por 16 a 18 h, para examinar si el organismo crece o no en cada una de las placas, con lo cual se determina la CIM para el antibiótico. Este método tiene la ventaja de que es simple y pueden ensayarse agentes solubles e insolubles en agua (Johnson, 2007).

3.5.3 Método de E-test

Este método ha sido descrito más recientemente y representa una sofisticada combinación de los métodos descritos anteriormente. El E-test es más simple que otros métodos para obtener una CIM. Utiliza una tira de plástico que contiene concentraciones crecientes de un determinado antibiótico que van desde 0.016 $\mu\text{g/mL}$ hasta 256 $\mu\text{g/mL}$, esta tira se pone sobre una placa de agar que ha sido inoculada con el organismo en estudio. Después de incubar la placa por 16 a 18 h, se forma un área de inhibición de forma elíptica, en la cual la CIM puede ser leída directamente (Johnson, 2007).

3.5.4 Método de microdilución en caldo

En este método se utilizan microplacas que contienen diferentes concentraciones de un determinado antibiótico. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes pocillos de la microplaca y luego se examina si el organismo crece o no en cada una de las placas, con lo cual se determina la CIM para el antibiótico en estudio (Kollef, 2003).

La CIM inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana 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 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y los resultados son interpretados como susceptible, intermedio o resistente. Las pruebas de 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 (Castro, 2009).

Existen varios estudios en donde se ha utilizado este método para determinar la actividad antibacteriana, dentro de los que podemos mencionar los siguientes:

Torres-Rodríguez, Madrenys, Jiménez y Saballs (1997) analizaron la sensibilidad *in vitro* de 40 cepas pertenecientes al género *Candida* y 10 de *Hansenula anomala* determinando la 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 un medio celular usado para cultivos celulares ya que este contiene una gran cantidad de fosfatos y está diseñado para ser utilizado en una atmósfera al 5% de dióxido de carbono llamado Roswell Park Memorial Institute (RPMI) más 2% de glucosa. Las concentraciones de 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 de MacFarland. 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 las anfotericina B. Las CIMs se determinaron con el 80% de crecimiento en relación al pocillo control. Todas las pruebas se efectuaron por duplicado. En este estudio se comprobó 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 la CIM del E-test resultaron inferiores a las proporcionadas por el micrométodo de dilución en medio líquido.

Morales, Díaz, González, y Huapaya (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 para la CLSI y se observó la susceptibilidad disminuida a penicilina a 26.7%, sensibilidad intermedia en 13.3% y resistente alta en 13.3%. En 21 aislamientos (70%) se observó resistencia a dos antimicrobianos y multiresistencia en dos (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, Cudmam e Isla (2007) evaluaron 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 multi-resistentes a antibióticos, obtenidos de pacientes de un hospital de Tucumán, Argentina, tales como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *S. 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 1000 µg de compuestos fenólicos/mL). 100 µL de cada suspensión bacteriana (5×10^5 UFC –Unidades Formadoras de Colonias-) 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 a 20 h. Al término de la incubación, el crecimiento bacteriano fue evaluado espectrofotométricamente midiendo valores de absorbancia a 625 nm mediante un lector de ELISA (BioRad). Los valores de CIM fueron determinados para levoflaxina, piperacilina/tozobactan, imipenem, meropenem, ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima, cefuroxima, cefepima, amikacina y ampicilina/sulbactam frente a bacterias Gram negativo. De acuerdo con los valores de la CIM, tres de las once especies ensayadas fueron las más activas: *Larrea divaricata*, *Larrea Cuneifolia* y *Senna aphylla* (CIM de 25 a 200 µg/mL). *P. mirabilis*, *A. baumannii* y *S. maltophilia* fueron las cepas más susceptibles con valores de CIM entre 25 y 50 µg/mL seguidos por *P. aeruginosa* con valores de CIM de 50 a 100 µg/mL (Zampini et al., 2007).

Pesewu, Cutter y Humber (2008) publicaron la actividad antibacteriana de plantas utilizadas como medicina tradicional en Ghana con particular referencia a *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes (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, cloróformicos y etanólicos y realizaron las pruebas de difusión, para determinar la CIM y CBM. De los 13 extractos utilizados hubo inhibición contra las bacterias evaluadas (*S. aureus* sensible, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Proteus vulgaris*) y 11 de estos 13 extractos inhibió el crecimiento de 3 cepas clínicas de MRSA.

Muraina, Picard y Eloff (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* subs. *mycoides* y se desarrolló el método que hace posible evaluar los extractos de varias especies de plantas contra la actividad antimicoplasma.

Bär, Både, Krebs y Cromme (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 placas con fluorescencia. Ellos utilizaron cepas de referencia de *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, además de aislamientos clínicos de las mismas

especies de bacterias. Tomaron el método de la guía de la CLSI (2009 modificado por Hacek et al., 1999). Tomaron 100 µL de cultivo fresco de bacterias los cuales fueron añadidos en cada pozo en una concentración de 2.5×10^8 UFC. Se incubó la microplaca por toda la noche. Las UFC fueron determinadas mediante la dilución de cada pozo en diluciones “10x”. De cada dilución, se tomaron alícuotas y se transfirieron a placas de agar y se incubaron durante toda la noche. Al día siguiente, se evaluó el número de colonias, el cual fue calculado retrospectivamente en base a las UFC iniciales. En donde se determinó que este método es comparable con el de referencia excepto en algunos antibióticos para cepas de *E. coli*.

Askun, Tunem, Satil y Ates (2009) determinaron la composición fenólica de dos especies de tomillo (*Lamiaceae*), *Origanum minutiflorum* y *Thymbra spicata* var. *spicata*. Evaluaron su actividad antibacteriana y antimicótica 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 (2009 citado en Koo et al., 2000), donde se utilizaron microplacas estériles de 96 pozos para el ensayo donde *T. spicata* var *spicata* mostró un alto nivel de actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis* (CIM 196 µg/mL), y actividad moderada (CIM 640 µg/mL) contra *E.coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter aerogenes* y *Staphylococcus epidermidis*. Se identificaron el carvacrol, ácido rosmarínico, hesperidina y naringenina como los principales compuestos fenólicos de *T. spicata* var. *spicata*, mientras que el carvacrol, ácido rosmarínico, eriodictiol y luteolina fueron los principales compuestos fenólicos de *Origanum minutiflorum*.

3.5.5 Método genético de detección de resistencia

En este momento existen varios métodos basados en la biología molecular que pueden ser usados para detectar resistencia específica a varios antimicrobianos, pero su uso de rutina no está indicado. Estos métodos son principalmente usados con fines epidemiológicos, para monitorear resistencia a antibióticos (Kollef, 2003).

3.6 Tratamiento de infecciones con quimioterapia antibacteriana

La creciente aparición de bacterias resistentes al tratamiento en el ámbito intrahospitalario se asoció con mayor cantidad de enfermos tratados en forma inapropiada. En este momento, la situación obliga a cambiar el abordaje de estos pacientes con la finalidad de revertir el fenómeno (Kollef, 2003).

La aparición de resistencia bacteriana en el contexto intrahospitalario es un problema cada vez más preocupante ya que afecta considerablemente la evolución de los enfermos y los recursos sanitarios. Tanto las bacterias Gram negativo como Gram positivo resistentes a antibióticos son causa frecuente de infecciones en pacientes internados. Incluso en muchas ocasiones quedan pocas opciones de terapia disponibles. La presión ejercida sobre los microorganismos seguramente es un factor primordial en el desarrollo de resistencia antibacteriana. El uso frecuente de antibióticos de amplio espectro, la elevada incidencia de pacientes con infecciones graves y la reducción de los recursos sanitarios por presiones económicas influyen decisivamente en la reducción de la susceptibilidad a fármacos (Kollef, 2003).

Existen varias estrategias destinadas a limitar la aparición de resistencia bacteriana. La estrategia de reducción es una de ellas. Para que pueda ser llevada a cabo, el profesional debe conocer con precisión cuáles son las bacterias más frecuentes en su institución, para ello se necesita una vigilancia epidemiológica local permanente. Es importante poder tomar muestras para cultivo antes del inicio de la terapia antibiótica, aunque esto obviamente no es posible en pacientes muy graves. Los patógenos que más se asocian con la administración de fármacos inadecuados incluyen bacterias Gram negativo (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, especies de *Acinetobacter* y *Enterobacter*) y *S. aureus* (Kollef, 2003).

Jones, Bell, Sader, Turnidge y Stillwell (2009) analizaron 1,959 cepas, en donde doripenem se activa frente a 98.9% de Enterobacterias a ≤ 0.5 mg/mL; así mismo en más del 90% de otras especies rara vez aisladas cepas Gram negativo como *Aeromonas* sp., *Delftia acidovorans*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Ochrobactrum anthropi*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas oryzae* y *Pseudomonas stutzeri* las cuales fueron inhibidos por ≤ 2 mg/mL de doripenem. El ensayo se realizó a través del método de microdilución aprobados comercialmente. Los resultados de doripenem fueron; ≤ 2 mg/mL frente a *P. aeruginosa*, y ≤ 1 mg/mL de *A. baumannii*.

Marti, Sánchez, Alba y Vila (2009) evaluaron la actividad *in vitro* de doripenem contra una colección de 87 cepas clínicas de *A. baumannii*, que muestran que la actividad de doripenem fue superior a imipenem y meropenem en cepas que lleva el gen blaOXA-58, la evaluación se realizó a través del método de microdilución. Los resultados determinaron que sólo 12 de los 87 aislamientos clínicos produce esta enzima. Aunque el número de OXA-58-producida en los aislados en este estudio fue muy bajo, los resultados sugieren claramente que la actividad

de doripenem contra *A. baumannii* expresar la blaOXA-58 de genes es mayor que la actividad de imipenem y meropenem.

Castanheira, Jones y Livermore (2009) evaluaron la actividad antimicrobiana del doripenem y otros carbapenemes para *P. aeruginosa*, otros bacilos no fermentadores y *Aeromonas* sp. de un total de 14,979 aislamientos de bacilos Gram negativo se analizaron a partir de 2003 y 2007 como parte del programa de vigilancia. *P. aeruginosa* fue la más numerosa, seguida por *A. baumannii*. Lo cual demostró que el doripenem (CIM₉₀, 8 y 4 mg/mL) fue dos veces más potente que el imipenem (CIM₉₀, 8 y 8 mg/mL) y meropenem (CIM₉₀, 8 y 8 mg/mL) frente a *P. aeruginosa* y otras *Pseudomonas* spp. que conforman el 77.2% y 82.9% de los aislamientos respectivamente, con punto de corte ≤ 2 mg/mL. Contra *Acinetobacter* spp. incluyendo *A. baumannii*, el imipenem mostró una actividad ligeramente mayor que otros carbapenemes, aunque solo el 41.8% de *A. baumannii* fueron susceptibles al punto de corte. Doripenem, imipenem y meropenem exhiben una actividad similar y casi completa frente *Aeromonas* sp.

3.7 Actividad antimicrobiana de las plantas

La importancia en el estudio de las plantas medicinales es evaluar la eficacia de su uso como remedios caseros tradicionales haciendo una contribución a su validez científica y legislativa. Estudios antibacterianos demuestra que los extractos acuoso y etanólicos de *Croton guatemalensis* tiene actividad contra *S. aureus* y que es inactivo contra *E. coli*. La infusión de la corteza tiene actividad contra esquizontes de *Plasmodium berghei* (Ramírez, 1988).

Una de las ventajas del empleo de las plantas medicinales es que poseen un amplio rango de actividad antimicrobiana, debido a que contienen una gran cantidad de principios activos que las hacen tóxicas para los microorganismos. En 1988, Ramírez encontró que el extracto de Zarzaparilla (*Smilax domingensis*) se constituyó como el de mayor actividad frente a las cepas estudiadas de *S. aureus*, *Salmonella typhi*, *P. aeruginosa* comparado con hierbas del cáncer, saúco, pericón y macuy (González, 1998).

Fleitas (2001) en cuanto a la aplicación del mangle rojo en Cuba se destacan los aportes realizados por Rojas (1978), el que reporta el efecto antimicrobiano de extractos acuosos y alcohólicos de las hojas, tallos y raíces de *R. mangle* frente a determinados microorganismos: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *E. coli*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* y *Micoplasma*.

Gómez (2008) determinó que la actividad antimicrobiana de los extractos de *Piper jacquemontianum* (diclorometánico y metanólico), los cuales presentaron actividad significativa ($p > 0.10$) contra *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa* y *Mycobacterium smegmatis*.

Gutierrez, Barry y Bourke (2008) determinaron que el aceite esencial del orégano junto con la mejorana, el tomillo o la albahaca tuvo un aditivo efecto bactericida frente a *E. coli* y *P. aeruginosa*.

Castro (2009), realizó la estandarización para la técnica de microdilución en placa para las bacterias Gram negativo, con una cepa de *E. coli* ATCC 25922, utilizando una concentración de 200 µg/dL de cada uno de los extractos investigados. Ninguno de los 9 extractos utilizados presentó actividad antibacteriana contra las cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* provenientes de aislamientos clínicos y productoras de BLEE.

3.8 Monografías de plantas a investigar

Según encuestas etnobotánicas realizadas y por pruebas que durante años se han realizado en el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos, donde se posee una colección de 200 extractos investigados, algunos con actividad antibacteriana frente a cepas de laboratorio de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*; se seleccionaron 10 extractos alcohólicos las cuales presentaron actividad antibacteriana en estudios previos con una CIM menor de 250 mg/dL. Los cuales se describen a continuación:

3.8.1 *Byrsonima crassifolia* (L.) HBK.

3.8.1.1 Sinonimia

Byrsonima cinerea Dec., *B. cubensis* Juss., *B. karwinskiana* A.Juss.

3.8.1.2 Nombres comunes

Chi, Carbo, Nanche, Nance, Tapal.

3.8.1.3 Descripción botánica

De la familia *Malpighiaceae*. Es un árbol de 3-10 m de alto, copa redondeada o extendida, tronco recto, corteza café, rugosa y rosada por dentro. Hojas siempre verdes, opuestas, ovaladas o elípticas, 5-20 cm de largo, puntiagudas. Flores de 5 pétalos, amarillas o

anaranjadas, 1-2 cm de ancho, numerosas en grupos. Frutos con drupa carnosa 8-22 mm de diámetro, portados aisladamente o en racimos de 2-15, piel delicada, amarilla, carnaza blanca, gruesa, jugosa, ácida y olor peculiar (Cáceres, 1993; Martínez, 2005).

3.8.1.4 Hábitat

Nativo de México a Sur América y Caribe en bosques secos y tropicales. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chiquimula, El Progreso, Quiche, Escuintla, Huehuetenango, Izabal, Jalapa, Jutiapa, Peten (Cáceres, 1996; Standley y Steyermark, 1958).

3.8.1.5 Historia

La especie fue introducida en Filipinas en 1918. Hernández indica “la corteza del tronco es astringente y posee naturaleza fría y seca. El polvo cura las úlceras, se aplica en lociones eficaces para disolver los tumores de las piernas, el fruto es comestible, grato al gusto y suave” (Germosén, 2005; Standley y Steyermark, 1958).

3.8.1.6 Composición química

La corteza contiene taninos (20-30%), ácido oxálico (2.7%), glucósidos, flavanoides, saponinas, sesquiterpenlactonas y triterpenos (Rastrelli, De Tommasi, Berger, Cáceres, Saravia, y De Simone, 1997).

3.8.1.7 Usos medicinales y 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. El fruto se come fresco, el mesocarpio representa hasta el 40% del fruto y se prepara en numerosas formas (dulce, jalea, helado y refresco) (Gueiss, Heinrich, Hunkler y Rimpler, 1995).

3.8.1.8 Farmacología

La actividad antibacteriana *in vitro* demuestra que el extracto acuoso de hojas, corteza y raíz es activo contra *E. coli* y *S. aureus*. La tintura de corteza es activa contra *S. flexneri*, *S. typhi*, *V. cholerae*, *S. pneumonie*, *S. pyogenes*, *Candida albicans*, *Candida krusei* con una CIM de 1-2 mg/kg. Los mejores disolventes son etanol y acetona. 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%) (Herrera-Ruiz, Zamilpa, González-Cortazar, Reyes-Chilpa, León et al., 2011).

3.8.1.9 Toxicología

Los extractos acuosos y etanólicos de hojas, corteza y raíz son tóxicos a peces del género *Mollinesia* (Bonacorsi, Raddi, Carlos, Sannomiya y Velegas, 2009).

3.8.2 *Cornutia grandifolia* Schauer

3.8.2.1 Sinonimia

Cornutia pyramidata L.

3.8.2.2 Nombre común

Jorobte (keqchi)

3.8.2.3 Descripción botánica

De la familia *Verbenaceae* es un arbusto leñoso de aproximadamente 5-6 m de altura; su flor es de color lila, pubescente; su fruto cuando esta inmaduro es de color verde claro y madura de color morado, de forma ovalada, aproximadamente 0.6 cm de largo, con un diámetro de 0.5 cm, sus hojas simples opuestas de aproximadamente 18-21 cm de largo, de forma lanceolada, con margen dentado, pecíolo acanalado de 3 cm de largo. Su corteza y madera es de color beige (Jenett-Siems, Köhler, Kraft, Siems, y Solis, 2003).

3.8.2.4 Hábitat

Nativo de Centro América que crece desde México hasta Panamá. Además se encuentra en Belice, Bolivia, Colombia, Costa Rica, Dominica, Ecuador, Perú, Rep. Dominicana y Venezuela (Standley y Steyermark, 1958).

3.8.2.5 Historia

Se utiliza la decocción de la raíz en crisis de nervios. La decocción de hojas se utiliza para dolores de cuerpo, inflamación del bazo, diabetes, flujos vaginales. En estudios recientes se ha demostrado su actividad antiprotozoaria para el tratamiento de paludismo y leishmania (Standley y Steyermark, 1958; Torres, 2006).

3.8.2.6 Composición química

No presenta.

3.8.2.7 Usos medicinales y populares

Se utiliza para tratar enfermedades incurables tales como el cáncer, sida, la rabia y todas aquellas que inhiben el sistema inmunológico del paciente, habiéndosele atribuido numerosas curas milagrosas (Chen, Galinis, y Wiemer, 1992).

3.8.2.8 Farmacología

No presenta.

3.8.2.9 Toxicología

No presenta.

3.8.3 *Croton guatemalensis* Lotsy

3.8.3.1 Sinonimias

Croton eluterioides Lotsy

3.8.3.2 Nombres comunes

Copalchi, caché, chul, guanacaste, hoja amarga, perexcutz, quina, sasafrás, zicché.

3.8.3.3 Descripción botánica

De la familia *Euphorbiaceae* es un árbol o arbusto delgado hasta 8 m de alto de hojas firmes membranosas, en largos o cortos pecíolos delgados, ovadas o anchamente triangulares, de 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 (Frutos, Hervas, Girálde y Mantecón, 2004).

3.8.3.4 Hábitat

Nativo de Mesoamérica en bosques secos o húmedos, frecuentes en colinas pedregosas hasta 1,800 msnm, a veces plantados 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 Suchitepéquez (Frutos et al., 2004; Linares, Bye y Floren, 1999).

3.8.3.5 Historia

Se han descrito 31 especies de este género, y se usan instintivamente como medicinales.

La corteza se dice que fue exportada antiguamente a Europa con fines medicinales (Rzedowski, G. y Rzedowski, J., 2001).

3.8.3.6 Composición química

Las hojas y corteza contienen alcaloides, aceites esenciales, taninos, triterpenos y mucílago, y la raíz contiene alcaloides (Cáceres, 1996; Rzedowski et al., 2001).

3.8.3.7 Usos medicinales y 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 (Webster, 1993).

3.8.3.8 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 (Franssen, Smeijsters, Berger y Medinilla, 1997).

3.8.3.9 Toxicología

Los extractos acuosos y etanólicos de hojas y corteza (50 ppm) son tóxicos a peces del género *Mollinesia*. La administración oral de 3 g/Kg de la infusión acuosa al 10% liofilizada no produjo ningún efecto tóxico (Franssen et al., 1997; Rzedowski et al., 2001).

3.8.4 *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud.

3.8.4.1 Sinonimia

Robinia rosea (Jacq) DC, *R. veriegata* Schltldl, *Lonchocarpus maculatus* (Jacq) DC

3.8.4.2 Nombres comunes

Kante, Canísima, Madera negra, Madriado, Matasarna.

3.8.4.3 Descripción botánica

Pertenece a la familia *Fabaceae*, es un 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. 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 (Cáceres, 2006; Standley y Steyermark, 1958).

3.8.4.4 Hábitat

Nativo de la América tropical. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chiquimula, Escuintla, Huehuetenango, Izabal, Jalapa, Jutiapa, Peten, Retalhuleu, Zacapa, Santa Rosa y Suchitepéquez (Standley y Steyermark, 1958).

3.8.4.5 Historia

Fuentes y Guzmán en la *Recordación Florida* indican su uso como sombra de los cacaotales, de donde viene su nombre, se ha encontrado que en esta asociación el Cacao crece mejor por su capacidad fijadora de nitrógeno y la actividad rodenticidas de sus raíces. Se usa desde la era precolombina y fue importante su uso en el principio de las colonias españolas en las labranzas agrícolas (Hernández, 2007; Standley y Steyermark, 1958).

3.8.4.6 Composición química

Las hojas y corteza contienen flavonoides, carbohidratos (pinitol), cumarinas y ácido o-cumarínico y melilótico (Thomas, Richter, Ye, Heine, y Strain, 1991).

3.8.4.7 Usos medicinales y populares

El cocimiento de las hojas y corteza se usan por vía oral para tratar afecciones gastrointestinales, respiratorias, de la piel, paludismo y paperas. La decocción de hojas se usa en el tratamiento de hipertensión. El cocimiento de las raíces se toma para aliviar el dolor de garganta, afecciones del riñón, ictericia y edema. Se le atribuyen propiedades antihistamínicas, antimalárica, antiséptica, antifúngica, cicatrizante, diurética, expectorante, febrífuga, hipotensura e insecticida. Se considera rodenticidas, repelente de ratones y en las plantaciones de té. (*Camellia thea*) (Ozier-Lafontaine, Lecompte y François, 1999).

3.8.4.8 Farmacología

La actividad antibacteriana demuestra que el extracto hidroalcohólico de hojas (25µg/ml) es inactivo contra microorganismos patógenos (*C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *E. coli* y *S. aureus*). La tintura de hojas y corteza no inhibe enterobacterias patógenas (*E. coli* y *S. typhi*). La tintura de las hojas es activa contra *N. gonorrhoea* con un espectro de inhibición de

80% de cepas patógenas. Los órganos con mayor actividad son la corteza, flores y raíz; el mejor disolvente es el etanol (Chalmers, Waugh, Sprent, Simons y Powell, 1992).

3.8.4.9 Toxicología

El extracto acuoso de semillas no es tóxico a peces dorados; sin embargo, la canavanina de las semillas es tóxica a mamíferos. La corteza, raíz y semillas son tóxicas a ratones, pero no a ratas (Ozier-Lafontaine et al., 1999; Thomas et al., 1991).

3.8.5 *Lippia graveolens* HBK.

3.8.5.1 Sinonimia

Lantana origanoides L., *L. berlandieri* Mill.

3.8.5.2 Nombres comunes

Mejorana, orégano de monte.

3.8.5.3 Descripción botánica

De la familia *Verbenaceae*, es un arbusto delgado hasta de 2 m de alto, ramas con pubescencia cortamente pilosa. Hojas en peciolo 5-10 mm de largo, oblongadas o elípticas, 2-4 cm de largo, arbustas 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, 2006; Martínez et al., 2000).

3.8.5.4 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 (Cáceres, 2006, Standley y Steyermark, 1958).

3.8.5.5 Historia

Plinio recomendaba las cataplasmas para tratar picaduras de escorpiones, Dioscórides en el siglo I y Gerard en el siglo XVI describen varias especies de oréganos medicinales (Girón, Freire, Alonzo y Cáceres, 1991).

3.8.5.6 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 y lapachenol (Lin, Mukhopadhyay, Robbins y Harnly, 2007).

3.8.5.7 Usos medicinales y populares

La decocción de hojas se usa para tratar anemia, afecciones gastrointestinales (amebiasis, cólico, diarrea, disentería), afecciones respiratorias (asma, bronquitis, catarro), hidropesía, ictericia, amenorrea, dismenorrea y reumatismo. Sus hojas secas se utilizan para sazonar carne, pescado, embutidos, ensaladas, guacamol, pozol, salsas y licores. El aceite esencial tiene uso en perfumería, jabonería y cosmética (Salgueiro, Cavaleiro, Gonçalves y Proença, 2003).

3.8.5.8 Farmacología

La actividad antibacteriana *in vitro* demuestra que la tintura de las hojas es activa contra *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. flexneri*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* pero inactiva contra *Haemophylus 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 (Lin et al., 2007; Salgueiro et al., 2003).

3.8.5.9 Toxicología

Se considera tóxica para peces del género *Mollinesia* (Cáceres, 2006).

3.8.6 *Piper jacquemontianum* Kunth

3.8.6.1 Sinonimia

Piper aeruginosibaccum Kunth

3.8.6.2 Nombres comunes

Cordoncillo, Poozuyaax.

3.8.6.3 Descripción botánica

Pertenece a la familia *Piperaceae* es un arbusto de aproximadamente 2 m de altura, las ramas jóvenes densamente hispidulosas o hírtulas, algunas veces glabras con la edad, ocasionalmente 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 glabros; láminas de las hojas ovado-oblongadas u ovado elípticas, mayormente de 12-20 cm de largo y de 4.5-9 cm de ancho, ápice abruptamente acuminado o largamente acuminado, muy desigual en la base y más o menos oblicua, usualmente redondeado o más 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 algunas 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 tres nervios en cada lado, nervios arqueados, ascendentes, los superiores nacen en o por arriba de la mitad de la lámina, laxamente reticuladas; pedúnculos cortos, gruesos, densamente puberulentos o hispidulosos; espigas erectas, mayormente de 5-7 cm de largo y de 3-4 mm de grosor, obtusas, gruesas; las brácteas con pubescencia densa (Cáceres, 2006, Standley y Steyermark, 1958).

3.8.6.4 Hábitat

Campeche, Guatemala, Belice. En Guatemala se ha descrito en los departamentos de Alta Verapaz, Petén e Izabal (Cáceres, 2006).

3.8.6.5 Historia

No presenta.

3.8.6.6 Composición química

Se identificó en el aceite esencial α -pineno, β -pineno, δ -3-careno, bornileno, δ -elemeno, 1,5 ciclodecadieno, β -cariofileno, D-germacrano (Cruz, Cáceres, Álvarez, Morales, Apell, Henriques, Salamanca et al., 2011).

3.8.6.7 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 (Fleming, 2004).

3.8.6.8 Farmacología

Estudios farmacológicos demuestran que el aceite esencial a 0.1 mg/mL tiene actividad contra *M. smegmatis* y *B. 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* en dosis de 750 y 1000 mg/Kg peso (Cruz et al., 2011; Fleming, 2004).

3.8.6.9 Toxicología

No presenta.

3.8.7 *Psidium guajava* L.

3.8.7.1 Sinonimia

Psidium pomiferum L., *P. pumilum* Vahl., *P. pyriferum* L.

3.8.7.2 Nombres comunes

Guayabo, Guayaba manzana, Shori.

3.8.7.3 Descripción botánica

De la familia *Myrtaceae* es un pequeño árbol perenne que alcanza 2-7 m de altura con tronco erecto y ramificado con madera dura. La corteza gris se descama con frecuencia y presenta manchas. Las hojas son opuestas, sencillas oblongas o elípticas de color verde claro. Las flores son blancas, grandes, de 2.5 cm de diámetro, axilares y olorosas, se encuentran solitarias o en pequeños racimos. El fruto es una baya de hasta 15 cm de diámetro con pulpa rosada y numerosas semillas (Cáceres, 2006, Standley y Steyermark, 1958).

3.8.7.4 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 (Girón et al., 1991; Standley y Steyermark, 1958).

3.8.7.5 Historia

Su origen es incierto pero se le ubica en Mesoamérica. Fue propagada por los españoles y portugueses a todos los trópicos del mundo donde se ha naturalizado con ayuda de los pájaros. Actualmente se extiende desde México y Centroamérica, hasta Sudamérica, en específico Brasil y Perú, en Las Antillas y el sur de Florida (Cáceres, 2006).

3.8.7.6 Composición química

La planta es rica en taninos. Las hojas contienen grasa, β -sitosterol, ácido maslínico y elágico, aceite esencial, triterpenoides (β -cariofileno, β -bisaboleno, aromadendreno, cineol, eugenol), ácidos orgánicos (guayavólico), flavonoides de quercetina (guayaverina y avicularina). La

corteza contiene además elagitaninos (telimagrandina, peduncularina, casuarinina) (Birdi, Daswani, Brijesh, Tetali, Natu y Antia, 2010).

3.8.7.7 Usos medicinales y 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 enjuagues para lengua inflamada. Se les atribuye propiedad antibacteriana, antiemética, antiinflamatoria, antihelmíntica, antiséptica, antitusiva, astringente, carminativa, espasmolítica y tónica (Ghosh, Arunima, Dutta Nag, 1993).

3.8.7.8 Farmacología

La tintura de hojas es activa contra *S. dysenteriae*, *S. typhi*, *S. flexneri*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*; la decocción contra *Epidermophytum floccosum*, *Trichomonas vaginalis* y rotavirus de simios; el extracto etanólico contra *E. coli* enterohemorrágica; el extracto polar y apolar contra *Plasmodium falciparum* y es citotóxico contra líneas KB y P338 (Pérez, Mitchell y Vargas, 2008).

3.8.7.9 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 (Weenen et al., 1990).

3.8.8 *Rhizophora mangle* L.

3.8.8.1 Sinonimia

No presenta.

3.8.8.2 Nombres comunes

Mangle rojo, candelón, mangle, mangle colorado, mangle dulce, mangle tinto, tabché, tapché, xtabché.

3.8.8.3 Descripción botánica

Pertenece a la familia *Rhizophoraceae* su forma es de árbol o arbusto perennifolio, halófilo, de 4-10 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. 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 (Standley y Steyermark, 1958; Torres, 2006).

3.8.8.4 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. En Guatemala se puede encontrar en Peten, Puerto Barrios, Santa Rosa, Escuintla, San Marcos, Suchitepéquez y todas las zonas costeras del país. Se encuentra a nivel del mar (Davidse, Sousa y Chater, 1995).

3.8.8.5 Historia

Es una especie que pertenece a la familia *Rhizophoraceae*, la cual cuenta con alrededor de 120 especies distribuidas en 16 géneros, siendo el género *Rhizophora* el mejor conocido, dominando las partes más anegadas de los ecosistemas manglar. Todos los mangles excluyen alguna porción de sal cuando se absorbe el agua a través de las raíces, otra parte se concentra al interior en el tejido de la planta, variando las cantidades acumuladas de acuerdo a cada especie. El mangle rojo (*Rhizophora mangle*) deja entrar el agua con cantidades bajas de sal a través de membranas situadas en las raíces, realizando filtraciones, ello se logra manteniendo diferencias de presión negativas en el interior del tejido a través de un proceso físico (Berenguer, Sánchez, Quílez, López-Barreiro, De Haro, Gálvez y Martín, 2006).

3.8.8.6 Composición química

La corteza y raíz son fuente importante de taninos. Además de grupos aminos primarios y secundarios, alcaloides en pequeña proporción (Marrero, Sánchez, De Armas, Escobar, Melchor, Abad, Bermejo et al., 2006).

3.8.8.7 Usos medicinales y populares

Rhizophora mangle es la especie de mangle más usada en la actualidad en programas de reforestación. Se usa para la fabricación de Bolas de boliche o de polo y artesanías en general. 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 *R. 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 (Melchor, Armenteros, Fernández, Linares y Fragas, 2001).

- * Corteza: Febrífugo, hemostático, antidiarréico, para el asma, hemoptisis, mordedura o picadura de animales marinos venenosos, diversas heridas, tuberculosis, lepra, hemorragias, disentería, elefantiasis.
- * Hoja: Escorbuto, dolor de muelas, úlceras leprosas.
- * Raíz: La raspadura de las raíces es usada por los pescadores contra mordeduras de peces y picaduras de insectos venenosos.

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 (Melchor et al., 2001).

3.8.8.8 Farmacología

Se pueden usar su corteza, hojas y raíz. La actividad biológica y farmacológica se atribuye los taninos presentes en la planta (Sánchez, Ruedas y Gómez, 2001).

3.8.8.9 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 (Fernández, Capdevila, Dalla y Melchor, 2002).

3.8.9 *Smilax domingensis* Willd

3.8.9.1 Sinonimia

Smilax caudata Lundell, *Smilax microscola* (B.L. Rob.) Killip & C.V. Morton

3.8.9.2 Nombres comunes

Bejuco de membrillo, zarzaparrilla.

3.8.9.3 Descripción botánica

De la familia *Smilacaceae*, este género se caracteriza por ser bejucos leñosos o herbáceos dioicos, trepando por zarcillos pareados; es un género complejo y poco estudiado. En Mesoamérica existen unas 26 especies y en Guatemala al menos 12 especies, las cuales se usan indistintamente con fines medicinales (Davidse et al., 1995; Cáceres, 1996).

3.8.9.4 Hábitat

Nativa de las Antillas y desde México hasta Panamá. 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 (Pérez, 2003; Standley y Steyermark, 1958).

3.8.9.5 Historia

Las *Smilax* del Viejo Mundo eran utilizadas por Dioscorides y Plinio. Un grupo de plantas de *Smilax* colectivamente llamadas Zarparrilla, fueron introducidas del Nuevo Mundo a la Medicina Europea por los comerciantes españoles del siglo XVI. Gerard las menciona como “un remedio contra los dolores crónicos de las articulaciones y la cabeza y contra los resfríos. La Zarparrilla tuvo buen mercado desde el principio para el tratamiento de sífilis y una variedad de enfermedades que requería “purificación de la sangre” (Standley y Steyermark, 1958).

3.8.9.6 Composición química

Contienen alcaloides, aceite esencial, esteroides insaturados, glicósidos esferoidales, flavonoides leucoantocianinas, taninos, polifenoles, resinas, azúcares y grasas (Acosta y Acosta, 2010).

3.8.9.7 Usos medicinales y populares

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 (Acosta y Acosta, 2010; Cáceres, 2006).

3.8.9.8 Farmacología

Estudios antibacterianos demuestran que la tintura de las raíces son activas contra *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. typhi*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri* y *S. pyogenes*, e inactiva contra *V.*

cholerae. Estudios del espectro de inhibición bacteriana en 20 cepas provenientes de pacientes demuestran que inhibe el 85% de cepas de *P. aeruginosa*, 80% de *S. typhi* y 70% de *S. aureus*. La actividad antimicrobiana se atribuye a las saponinas, en particular a sarsasapogenina y parillina (Volpato y Godínez, 2004).

3.8.9.9 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 está aprobado su uso como alimento por la Food and Drug Administration (FDA) (Marchorro, 2007; Volpato y Godínez, 2004).

2.8.10 *Tagetes lucida* Cav

3.8.10.1 Sinonimias

Tagetes florida Sweet

3.8.10.2 Nombres comunes

Pericón, I'yá, jolomocox, ucá

3.8.10.3 Descripción botánica

De la familia *Asteraceae* es una hierba perenne aromática, glabra, erecta, 30-95 cm de alto, se levanta desde una base corta, gruesa y leñosa, cinosamente ramificada; ramas escasas, resinosa al secarse. Hojas opuestas, sésiles, oblongo-lanceoladas. Flores amarillas en pequeñas cabezuelas terminales (Linares et al., 1999; Rzedowski et al., 2001).

3.8.10.4 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, Quiché, Jalapa, Guatemala, Huehuetenango, Petén, Quetzaltenango, Sacatepéquez y San Marcos (Cáceres 1996; Linares et al., 1999; Standley y Steyermark, 1958).

3.8.10.5 Historia

Género de 35 especies. Es descrita como adivinatoria, alucinógena, medicinal, mística y religiosa en las principales fuentes históricas precolombinas y coloniales en México y

Guatemala. En Guatemala, es colectada con fines medicinales; según la tradición antes del día de San Juan (24 de junio), después de ello “el diablo se revuelca en ella” (Hernández, Canales, Flores, García, Durán y Ávila, 2006).

3.8.10.6 Composición química

Las hojas y flores contienen aceite esencial, alcaloides cuaternarios, flavonoides, saponinas, taninos, leucoantocianinas, ácido gálico, poliacetilenos, glicósidos cianogénicos, cumarinas, derivados de tiofeno, alfa tertienilo, poliacetilenos, goma, dextrina, grasas, pectina, tres resinas acídicas, taninos y sales minerales (Cáceres, 1999; Hernández et al., 2006; Mahalin, 1995).

3.8.10.7 Usos medicinales y populares

El humo de las hojas y flores se utiliza para ahuyentar mosquitos. Las flores y hojas se usan para aromatizar los elotes conocidos. Se le atribuye propiedad antiinflamatoria, antioxidante, antiséptica, aromática, carminativa, digestiva, diurética, espasmolítica y galactogoga (Céspedes, Ávila, Martínez, Serrato, Calderón-Mugica y Salgado-Garciglia, 2006).

3.8.10.8 Farmacología

Generalmente se usan las hojas y flores secas. La actividad biológica y farmacológica se atribuye al α -tertienilo y hermiarina que están presentes en las hojas y flores. El α -tertienilo es un cristal amarillo que presenta actividad antimicrobiana contra *C. albicans*. La hermiarina tiene actividad antibacteriana, espasmolítica, diurética y antiinflamatoria (Abdala, 1999).

3.8.10.9 Toxicología

Se le atribuye una propiedad abortiva. El extracto alcohólico provoca en algunas personas síntomas cardiovasculares. El α -tertienilo puede ser fototóxico en presencia de la luz ultravioleta y puede producir una fotodermatitis (Abdala, 1999; Céspedes et al., 2006).

4. JUSTIFICACION

La importancia de este estudio fue determinar si alguna de las 10 especies de plantas medicinales nativas de uso popular con actividad antibiótica demostrada contra bacterias convencionales, poseía actividad sobre cepas clínicas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* las cuales en su mayoría son resistentes a los β -lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas. Estos antibióticos son utilizados a nivel intrahospitalario y extrahospitalario como tratamientos de elección contra las infecciones y su uso incompleto provoca el apareamiento de nuevas resistencias.

P. aeruginosa y *A. baumannii* presentan una de las principales causas de infecciones nosocomiales, ya que son saprófitos del ambiente, además de resistir, entre otros factores, amplios rangos de temperatura y humedad. Por lo cual es de suma importancia conocer la actividad antimicrobiana de los extractos a utilizar.

Se han evaluado compuestos aislados de plantas contra este tipo de bacterias y los resultados no han sido satisfactorios, se evaluaron los extractos de las plantas, como un complejo de metabolitos, con actividad antibacteriana comprobada en un número mayor de cepas clínicas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.

Además, la estandarización realizada 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 Müller Hinton y en el procedimiento universalmente aceptado para publicación internacional. Asimismo, los resultados obtenidos de esas investigaciones tendrán mayor validez para poder darlos a conocer en revistas científicas tanto de fitoterapia como de microbiología.

Esta investigación permitió demostrar la actividad antibacteriana de especies vegetales para el tratamiento de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* y *A. baumannii* 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. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar si existe inhibición de alguno de los extractos vegetales contra *P. aeruginosa* y *A. baumannii* multi-resistentes.

5.2 Objetivos específicos

5.2.1 Estandarizar la técnica de micrométodo para la actividad antibacteriana.

5.2.2 Evaluar cepas clínicas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* multi-resistentes contra extractos de plantas medicinales de: *B. crassifolia*, *C. grandifolia*, *C. guatemalensis*, *G. sepium*, *L. graveolens*, *P. jacqueomontianum*, *P. guajava*, *R. mangle*, *S. domingensis*, *T. lucida*, con actividad antibiótica demostrada.

5.2.3 Determinar la CIM de los extractos que presenten actividad antibacteriana.

6. HIPOTESIS

Al menos una de las especies vegetales investigadas tiene actividad antibacteriana satisfactoria contra cepas clínicas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo y Muestra

7.1.1 Universo

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

7.1.2 Muestra

10 cepas de *P. aeruginosa* multi-resistentes y 10 cepas de *A. baumannii* multi-resistentes.

10 extractos de plantas medicinales, *B. crassifolia*, *C. grandifolia*, *C. guatemalensis*, *G. sepium*, *L. graveolens*, *P. jacqueomontianum*, *P. guajava*, *R. mangle*, *S. domingensis*, *T. lucida*

7.1.3 Recursos

7.1.3.1 Humanos

Seminaristas: Nely Janira Ortiz Ramírez

Milvia Roxana Arana Barrera

Asesor: Lic. Armando Cáceres

Revisor: Lic. Martin Gil

7.1.3.2 Institucionales

Laboratorio de Bioensayos Departamento de Citohistología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

Laboratorio de Productos Naturales Farmaya

7.2 Equipo

7.2.1 Agitador Vórtex (Mezclador)

7.2.2 Autoclave

7.2.3 Campana bacteriológica

7.2.4 Congelador a -20°C

- 7.2.5 Incubadora a 34°C
- 7.2.6 Mechero de Bunsen
- 7.2.7 Refrigerador a 4°C
- 7.2.8 Micropipetores automáticos unicanal
- 7.2.9 Micropipetores automáticos multicanal
- 7.2.10 Espectrofotómetro tipo lector de ELISA con diferentes longitudes de onda.
- 7.2.11 Impresora
- 7.2.12 Computadora

7.3 Materiales

- 7.3.1 Asa bacteriológica en punta y en argolla
- 7.3.2 Cajas de petri 100 x 15 mm
- 7.3.3 Erlenmeyer de 250ml y 500ml
- 7.3.4 Gradillas
- 7.3.5 Guantes desechables
- 7.3.6 Hisopos estériles
- 7.3.7 Papel mayordomo
- 7.3.8 Papel parafilm
- 7.3.9 Pinzas
- 7.3.10 Tubos de ensayo
- 7.3.11 Tubos Ependorf 1.5 mL
- 7.3.13 Placas de 96 pozos estériles
- 7.3.14 Tips amarillos y azules estériles
- 7.3.15 Hojas de papel bond tamaño carta
- 7.3.16 Algodón

7.4 Reactivos

- 7.4.1 Caldo Müller Hinton
- 7.4.2 Agar Trypticase soya
- 7.4.3 Agar Müller Hinton
- 7.4.4 Caldo Trypticase soya
- 7.4.5 Agua desionizada estéril
- 7.4.6 Alcohol
- 7.4.7 Aceite mineral
- 7.4.8 Extractos de plantas a investigar

- 7.4.9 Discos de antibióticos de Imipenem, Ceftriaxona y Cefepime.
- 7.4.10 Estándar de MacFarland 0.5
- 7.4.11 Estándar de Imipenem
- 7.4.12 Cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853
- 7.4.13 Etanol al 70%
- 7.4.14 Reactivo MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5.difeniltetrazolio)
- 7.4.15 Hipoclorito de sodio
- 7.4.16 Solución salina

7.5 Métodos

7.5.1 Estandarización de técnica de microdilución en placa (Curva de calibración):

- Se realizó la curva de calibración para bacterias utilizando cepas de referencia y antibiótico sintético.

7.5.1.1 Preparación del estándar de imipenem

- Del estándar liofilizado de imipenem se realizó una solución Stock con una concentración de 10 mg/mL.
- A partir de la solución Stock, se realizó la dilución más alta de antibiótico, la cual fue de 64 µg/mL.

7.5.1.2 Realización de la suspensión de bacterias

- Se utilizó la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 con 24 h de incubación para la realización de MacFarland 0.5.
- Se tomó de 2 a 3 colonias de la bacteria y se suspendieron en tubos con caldo de Tripticasa Soya.
- Se utilizó inmediatamente después de preparado para evitar la proliferación bacteriana.

7.5.1.3 Preparación de revelador

- Se utilizó MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5.difeniltetrazolio) como revelador, el cual se utilizó a una concentración de 0.4 mg/ml de MTT disuelto en un buffer de fosfatos (PBS).
- Se utilizó inmediatamente después de preparado para evitar reacción con la luz.

7.5.1.4 Inoculación de las microplacas (Anexo 1)

- Se elaboró un esquema de inoculación, con la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 por cuadruplicado, colocando un control de crecimiento bacteriano, un control de esterilidad de caldo Müller Hinton, en placas con fondo en U; las cuales se encuentran distribuidas en filas designadas con letras (A-H) y 12 columnas numeradas.
- Se añadió 200 µL de caldo Müller Hinton en la columna 1 (de la 1A a la 1H).
- Se agregó en todos los pozos, a excepción de columna 3 (de la 3A a la 3H), 100 µL de caldo Müller Hinton.
- Se agregó 200 µL de la solución más alta de imipenem (64 µg/mL) en la columna 3.
- Se arrastró de los pozos de la columna 3 (posición 3A la 3H) 100 µL a los pozos de la columna 4 (posición 4A a 4H) y así sucesivamente hasta llegar a los pozos de la fila 12. NOTA: no cambiar punta de pipeta entra cada una de las diluciones. De esta manera se obtendrán diluciones seriadas del antibiótico con un volumen total de 100 µL.
- Se añadió 100 µL de la suspensión de bacterias a todos los pozos de la fila 2 a la 12 de la placa y se incubó a 35°C por 16 a 18 h.
- Se agregó 50 µL del revelador MTT a todos los pozos de la placa.
- Se incubó por 2 h a 35°C en cámara húmeda y leyó a una absorbancia de 492nm con un filtro diferencial de 630 nm.

7.5.2 Preparación de extractos

- Se pesó de 150-250 g de materia seca vegetal tamizada y se colocó en una bandeja de aluminio.
- Se colocó algodón en la parte inferior del percolador y papel filtró para cubrir el fondo.
- Se humedeció la materia vegetal con cierto volumen de etanol (dilución 1:5) según fue el caso.
- Se transfirió todo el material vegetal percolador y se cubrió con el disolvente.
- Se dejó reposar por 24 h, para disolver la parte de la planta seleccionada.
- Se recolectó en un Erlenmeyer todo el disolvente agregado y se colocó en un balón de destilación de 1,000 mL.
- Se verificó todas las conexiones eléctricas estuvieran conectadas, el nivel del baño de calentamiento fuera adecuado y la llave de alimentación del refrigerante estuviera cerrada.
- Se colocó el balón con la muestra y se sujetó con la llave correspondiente y se le asignó una rotación de 50% y una temperatura entre 40–60°C.
- Se encendió la bomba de vacío, cuantas veces fuere necesario hasta agotar el disolvente.

- Se inició la destilación del extracto con la recuperación del disolvente, hasta que estuviera semisólido.
- Se agregó el disolvente recuperado al percolador que contiene el material vegetal (esta operación se repitió dos veces antes de iniciar la concentración)
- Una vez concentrado el extracto se retiró el balón, y el extracto obtenido se colocó en cristizador de vidrio previamente tarado.
- Se colocó en la desecadora de 7 a 15 días.
- Se verificó la consistencia sólida del extracto y se guardó en frascos ámbar previamente tarados y se almacenó en refrigeración a 4°C.
- Se calculó el porcentaje de rendimiento del extracto obtenido.

7.5.3 Obtención de cepas bacterianas

- Se escogió cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* multi-resistentes aisladas de muestras clínicas en el Laboratorio Clínico de HGSJD. Las cepas se recolectaron durante el primer semestre de 2009.

7.5.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) por la técnica de microdilución en placa

7.5.4.1 Preparación de extractos

- De los extractos utilizados se pesaron 0.001g de extracto en balanza analítica y se disolvieron en 1 mL de buffer de fosfatos (PBS), para obtener una solución madre con una concentración de 1 mg/mL. La dilución más alta con la cual se trabajó cada extracto fue de 400 µg/mL.

7.5.4.2 Realización de la suspensión de bacterias

- Se utilizaron cepas con 24 h de incubación para la realización del estándar de MacFarland 0.5, se tomaron de 2-3 colonias de la bacteria y se suspendieron en tubos de caldo Trypticase Soya. Se ajustó la turbidez a un estándar de MacFarland 0.5 y se utilizó inmediatamente después de preparado para evitar proliferación bacteriana.

7.5.4.3 Preparación de revelador

- Se utilizó MTT como revelador, el cual se utilizó a una concentración de 0.4 mg/mL de MTT disuelto en un buffer de fosfatos (PBS). Se utilizó inmediatamente después de preparado para evitar reacción con la luz.

7.5.4.4 Inoculación en microplaca de bioensayo (Anexo 2)

- Se elaboró un esquema de inoculación, con las cepas clínicas por cuadruplicado, colocando un control de crecimiento bacteriano, un control de esterilidad de caldo Müller Hinton y un control de esterilidad de extracto, en placas con fondo en U, las cuales se encuentran distribuidas en filas designadas con letras (A-H) y 12 columnas numeradas.
- Se añadió 200 µL de caldo Müller Hinton en la columna 1 (de la 1A a la 1H).
- Se agregó en todos los pozos, a excepción de columna 4 (de la 4A a la 4H), 100 µL de caldo Müller Hinton.
- Se agregó 200 µL de la solución madre del extracto disuelto en PBS (400 µg/mL) en la columna 4
- Se arrastraron 100 µL de la columna 4 (posición 4A a la 4H) a los pozos de la columna 5 (posición 5A a la 5H) y así sucesivamente hasta llegar a los pozos de a fila 12.

NOTA: No cambiar punta de pipeta entra cada una de las diluciones. De esta manera se obtendrán diluciones seriadas del extracto con un volumen total de 100 µL.

- Se añadió 100 µL de la suspensión de bacterias a todos los pozos de la fila 2 a la 12 de la placa. Incubar a 35°C por 20 h (*A. baumannii*) y 8 h (*P. aeruginosa*).

NOTA: Antes de comenzar a realizar el microensayo se debe realizar la estandarización de temperatura de las bacterias ya que cada una de ellas se comporta de una forma diferente por ser cepas salvajes.

- Se agregó 50 µL del revelador MTT a todos los pozos de la placa.
- Se incubó por 2 h a 35°C en cámara húmeda y se leyó a una absorbancia de 492nm con un filtro diferencial de 630 nm.
- Se colocó por placa los controles respectivos de esterilidad y crecimiento para validar los resultados obtenidos.

7.5.5 Tamizaje por la técnica de microdilución en placa

- Se debe de realizar los mismos incisos que el 7.5.4.1 al 7.5.4.3.

7.5.4.5 Inoculación en microplaca de tamizaje (Anexo 3)

- Se elaboró un esquema de inoculación, con las cepas clínicas por cuadruplicado, colocando un control de crecimiento bacteriano, un control de esterilidad de caldo Müller Hinton y un control de esterilidad de extracto, en placas con fondo en U, las cuales se encuentran distribuidas en filas designadas con letras (A-H) y 12 columnas numeradas.
- Se añadió 200 µL de caldo Müller Hinton en la columna 1 (de la 1A a la 1H).

- Se agregó en todos los pozos, a excepción de columna 4 (de la 4A a la 4H) y en la columna 9 (de la 9A a la 9H) 100 µL de caldo Müller Hinton.
- Se agregó 200 µL de la solución madre de un extracto disuelto en PBS (400 µg/mL) en la columna 4 y de otro extracto en la columna 9.
- Se arrastró 100 µL de la columna 4 (posición 4A a la 4H) a los pozos de la columna 5 (posición 5A a la 5H) y así sucesivamente hasta llegar a los pozos de la fila 7. Realizar el mismo procedimiento con la columna 9 (posición 9A a la 9H) hasta la fila 12.

NOTA: No cambiar punta de pipeta entra cada una de las diluciones. De esta manera se obtendrán diluciones seriadas del extracto con un volumen total de 100 µL.

- Se añadió 100 µL de la suspensión de bacterias a todos los pozos de la fila 2 a la 12 de la placa. A excepción de la fila 3 y 8. Incubar a 35°C por 20 h (*A. baumannii*) y 8 h (*P. aeruginosa*).

NOTA: Antes de comenzar a realizar el microensayo se debe realizar la estandarización de temperatura de las bacterias ya que cada una de ellas se comporta de una forma diferente por ser cepas salvajes.

- Se agregó 50 µL del revelador MTT a todos los pozos de la placa.
- Se incubó por 2 h a 35°C en cámara húmeda y se leyó a una absorbancia de 492nm con un filtro diferencial de 630 nm.
- Se colocó por placa los controles respectivos de esterilidad y crecimiento para validar los resultados obtenidos.

7.5.6 Interpretación de resultados

7.5.6.1 Presencia de actividad antibacteriana: absorbancia $>-0.02 \pm 0.04$

7.5.6.2 Concentración mínima inhibitoria: concentración de extracto a la que tiene presencia de actividad antibacteriana.

7.5.6.3 Rechazo de corrida: cuando haya oxidación del MTT (coloración morada) en los pozos de control de esterilidad de medio y control de esterilidad del extracto.

7.5.7 Diseño Experimental

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

7.5.7.2 Muestras: 10 cepas de *P. aeruginosa* y 10 cepas de *A. baumannii*. Extractos de plantas medicinales, *B. crassifolia*, *C. grandifolia*, *C. guatemalensis*, *G. sepium*, *L. graveolens*, *P. jacqueomontianum*, *P. guajava*, *R. mangle*, *S. domingensis*, *T. lucida*.

7.5.7.3 Diseño de muestreo: No probalístico, intencional. Los extractos de plantas medicinales tuvieron una concentración mínima inhibitoria menor 400 µg/mL de actividad antibacteriana.

7.5.7.4 Análisis estadístico: Se utilizó regresión lineal para la calibración de la curva de concentración de bacterias vivas utilizando como revelador MTT y estándar de Imipenem. Se realizó por triplicado y se utilizó la media de los resultados para realizar la regresión lineal y obtener la ecuación de la recta. La evaluación de la actividad antibacteriana de cada uno de los extractos se realizó por cuadruplicado y los resultados se expresaron por medio de medias en tablas.

Guatemala, 29 de noviembre de 2011

A quien corresponda:

Por este medio, hago constar que el trabajo de Seminario de Investigación “**Inhibición por extractos vegetales de uso medicinal de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* multi-resistentes**”, formó parte de la línea de investigación sobre la actividad inhibitoria de microorganismos multiresistentes causantes de infecciones nosocomiales, de muestras obtenidas en el Hospital Nacional San Juan de Dios. El mismo se realizó dentro de las instalaciones del Laboratorio de Bioensayos, del Departamento de Citohistología, Facultad de CCQQ y Farmacia, USAC.

Las dos participantes del Seminario de Investigación realizaron una actividad directa durante 720 horas, obteniendo los resultados que se describen a continuación. La instancia oferente le otorga la aprobación para su publicación.

Atentamente,

Lic. Armando Cáceres

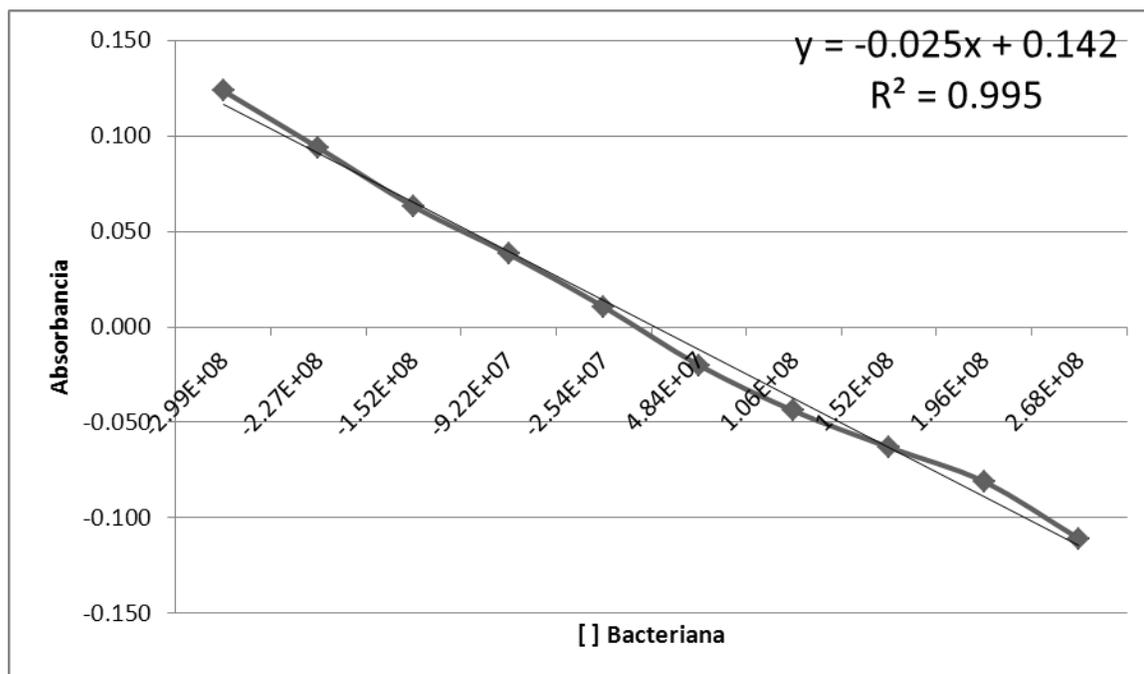
Asesor

8. Resultados

Dentro del procedimiento de estandarización de la técnica para la determinación de la CIM por medio de la microdilución en placa se realizó una curva de calibración utilizando como droga Imipenem (64 $\mu\text{g/mL}$) y la cepa *P. auruginosa* ATCC 27853. Para dicha determinación se realizaron dos corridas idénticas la cual corresponde a una repetición de 8 veces por corrida, de las cuales se les realizó el promedio de todas las absorbancias medidas junto con su respectiva desviación estándar y posteriormente se sometió a un análisis de regresión lineal en donde se determinó la ecuación de la curva de calibración ($y = -0.0257 X + 0.1427$ con una $r^2 = 0.995$ (Gráfica 1).

También se obtuvo el punto de corte de la absorbancia para determinar si hubo o no inhibición por parte de la droga el cual fue -0.02 ± 0.04 (Cuadro 1). Se realizó un revelado con MTT, el cual nos indica por medio de coloración morada si hay crecimiento bacteriano lo que significa que la droga no tiene efecto contra la bacteria analizada. Se leyó a una absorbancia de 492 nm con un filtro diferencial de 630 nm para no reportar los resultados cualitativamente sino cuantitativos. Este punto se logro determinar por medio de que en ambas corridas la concentración del antibiótico en donde la absorbancia fue positiva (incolora), indicando que la concentración mínima a la cual el antibiótico tenía efecto fue de 2 $\mu\text{g/mL}$, una absorbancia negativa (morada) nos indica que si existe crecimiento bacteriano. El punto de corte se utilizó para determinar que aquellas absorbancia que estuvieran arriba del mismo, el extracto tenía una actividad antibacteriana positiva sobre la cepa, y aquellas que estuvieran abajo no lo presentaban.

Gráfica 1. Curva de calibración con Imipenem y *P. aeruginosa* ATCC 27853



Fuente: Datos experimentales

Cuadro 1. Estandarización de la determinación de la CIM, utilizando el método de microdilución en placa, Imipenem como droga y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

	FD	Día 1		Día 2		Promedio	DS
		Media	DS	Media	DS		
Ctl	Medio	0.041	0.005	0.043	0.002	0,043	0,00
Ctl	MOO	-0.039	0.018	-0.086	0.009	-0,062	0,02
64	1/1	0.125	0.004	0.122	0.002	0,124	0,04
32	½	0.078	0.002	0.110	0.007	0,094	0,02
16	¼	0.058	0.003	0.068	0.002	0,063	0,03
8	1/8	0.036	0.002	0.040	0.002	0,038	0,04
4	1/16	0.011	0.002	0.010	0.001	0,011	0,02
2	1/32	-0.018	0.004	-0.022	0.003	-0,02	0,04
1	1/64	-0.049	0.003	-0.039	0.004	-0,044	0,07
0,5	1/128	-0.058	0.003	-0.068	0.003	-0,063	0,02
0,25	1/256	-0.067	0.002	-0.095	0.003	-0,081	0,02
0,125	1/512	-0.100	0.005	-0.122	0.004	-0,111	0,01

FD: Factor de dilución; Ctl: Control; MOO: Microorganismos; DS: Desviación estándar

Fuente: Datos experimentales

Luego de tener estandarizada la técnica y calibrada la droga, se procedió a evaluar 20 cepas multi-resistentes aisladas de muestras clínicas. Las cepas evaluadas fueron diez de *P. aeruginosa* y diez de *A. baumannii*. Dentro de las características que cada una de las especies poseen, se observó que son de diferente origen de muestra y diferente fenotipificación de sensibilidad antibiótica (Anexo 2). Las plantas evaluadas fueron *B. crassifolia*, *C. grandifolia*, *C. guatemalensis*, *G. sepium*, *L. graveolens*, *P. jacquemontianum*, *P. guajava*, *R. mangle*, *S. domingensis*, *T. lucida* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Extractos etanólicos plantas medicinales con actividad antibacteriana evaluadas contra cepas clínicas multi-resistentes por la técnica de microdilución en placa para la determinación de CIM.

Nombre de la planta	Nombre común	Parte utilizada	Tipo de extracto
1. <i>Smilax domingensis</i> Willd	Zarzaparilla	Hoja – Rizoma	Crudo
2. <i>Rhizophora mangle</i> L.	Mangle rojo	Corteza	Crudo
3. <i>Croton guatemalensis</i> Lotsy	Copalchi	Corteza	Crudo
4. <i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.) Steud.	Madre cacao	Hoja	Crudo
5. <i>Lippia graveolens</i> HBK.	Mejorana	Hoja	Crudo
6. <i>Psidium guajava</i> L.	Guayaba	Hoja	Crudo
7. <i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) HBK.	Nance	Corteza	Crudo
8. <i>Cornutia grandifolia</i> Schauer	Jorobte	Hoja	Crudo
9. <i>Tagetes lucida</i> Cav	Pericón	Corteza	Partición
10. <i>Piper jacquemontianum</i> Kunth	Cordoncillo	Hoja	Crudo

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

Después de evaluar cada uno de los extractos contra las diez cepas de *A. baumannii* se determinó que *B. crassifolia* presenta actividad bactericida contra *A. baumannii* en la cepa A a una concentración de 200 µg/mL, y las cepas B e I con una concentración de 400 µg/mL; mientras que *P. guajava* presenta actividad bactericida contra la cepa H de *A. baumannii* a una concentración de 400 µg/mL (Cuadro 3).

Después de evaluar cada uno de los extractos contra las diez cepas de *P. aeruginosa* se determinó que *B. crassifolia* presenta actividad bactericida contra *P. aeruginosa* en las cepas I, J con una concentración de 200 µg/mL y las cepas B, G con una concentración de 400 µg/mL (Cuadro 4).

Cuadro 3. Actividad bactericida (en µg/mL) de los extractos contra las cepas de *A. baumannii*

Extractos	<i>Acinetobacter baumannii</i>										
	Cepas	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
<i>B. crassifolia</i>	200	400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	400	> 400
<i>C. grandifolia</i>	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400
<i>C. guatemalensis</i>	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400
<i>G. sepium</i>	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400
<i>L. graveolens</i>	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400
<i>P. jaquemontianum</i>	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400
<i>P. guajava</i>	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	400	> 400	> 400
<i>R. mangle</i>	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400
<i>S. domingensis</i>	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400
<i>T. lucida</i>	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400

Cepas aisladas en el Hospital General San Juan de Dios: A: 54423; B: 54428; C: 54452; D: 54427; E: 54439; F: 54436; G: 54296; H: 54290; I: 73566; J: 73559.

Fuente: Datos Experimentales

Cuadro 4. Actividad bactericida (en µg/mL) de los extractos contra las cepas de *P. aeruginosa*

Extractos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>										
	Cepas	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
<i>B. crassifolia</i>	>400	400	>400	>400	>400	>400	>400	400	>400	200	200
<i>C. grandifolia</i>	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
<i>C. guatemalensis</i>	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
<i>G. sepium</i>	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
<i>L. graveolens</i>	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
<i>P. jaquemontianum</i>	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
<i>P. guajava</i>	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
<i>R. mangle</i>	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
<i>S. domingensis</i>	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
<i>T. lucida</i>	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400

Cepas aisladas en el Hospital General San Juan de Dios: A: 53976; B: 54288; C: 51790; D: 54280; E: 54086; F: 54426; G: 54296; H: 54481; I: 54415; J: 54467.

Fuente: Datos Experimentales

9. 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 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 para determinar si un agente presenta posible actividad antibiótica y cuál es la concentración mínima necesaria para que tenga efecto y así proponerlo o utilizarlo como una opción terapéutica.

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. 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. La concentración de MTT que se utilizó fue de 0.4 mg/mL diluido en PBS, ya que en los estudios anteriores se obtuvo los mejores resultados con esa concentración (Castro, 2009).

Se encontraron dos puntos críticos en la estandarización del método con pruebas bacterianas, el primero fue el tiempo de incubación ya que depende de cómo se comporten las cepas, en este estudio se utilizaron cepas salvajes las cuales cada una se comportaba diferente con su tiempo de crecimiento por lo que se realizó una curva de calibración de temperatura con las 20 cepas para determinar el tiempo de incubación promedio en el que se obtuvieron mejores resultados, siendo que los tipos de *A. baumannii* tuvieron un tiempo de incubación de 20 h, mientras que las *P. aeruginosa* de 8 h.

En los bacilos Gram negativo hay plásmidos los cuales son productores de β -lactamasas. Estas β -lactamasas de amplio espectro (BLEAs) son enzimas que se han

originado tras sufrir diversas mutaciones. La mayoría de los aislamientos clínicos que producen BLEAs son de pacientes hospitalizados y causan con cierta frecuencia brotes nosocomiales (Marcos, 2003). Por esta razón se están buscando tratamientos alternos para poder brindar a los médicos una mejor opción terapéutica para esta situación. 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, el cual es un método que no es tan preciso, ni exacto y no tiene tanta cobertura de diluciones por lo que se trabajó con la técnica de microdilución en placa y poder probar con mayor número de diluciones obteniendo así resultados más exactos y precisos.

En este estudio se evaluó la actividad antibacteriana de diez extractos etanólicos de plantas nativas con diez cepas clínicas de *P. aeruginosa* y diez de *A. baumannii* multi-resistentes; ya que se han realizado investigaciones con estos extractos con actividad antibacteriana demostrada en cepas ATCC pero no en multi-resistentes (Cáceres, 1993; 1996; 1999).

Según la revisión de los datos obtenidos, no se logró establecer una mayor relación entre las cepas donde no se presentó inhibición; ya que cada una de ellas se obtuvo de una muestra diferente de una unidad diferente y con una fenotipificación del antibiograma diferente. Lo único que se pudo relacionar que tenían en común era que todos presentaban un fenotipo de multi-resistencia hacia las drogas a las que fueron expuestas (Anexo 4).

Las posibles razones por las cuales los otros extractos no tuvieron ninguna actividad contra las cepas, es que estas cepas 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 pueden 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.

Mientras que en las cepas en las que se presentó inhibición, existió una relación en común y fue que casi todas las muestras procedían de unidad de cuidados intensivos

de pediatría (UCIP), y en las que procedían de catéter o de alguna secreción fueron los que presentaron la actividad a una concentración del extracto de 200 µg/mL. Lo cual lleva a la inquietud y necesidad de además de trabajar cepas diferentes con un fenotipo de multirresistencia también se pueda realizar la genotipificación para observar en realidad cuan similares son entre si cada una de las cepas.

Lo que se puede observar es que la mayoría son provenientes de cuidados intensivos ya sea de pediatría ó de adultos, lo cual confirma que en realidad una cepa multi-resistente de estos tipos de bacterias son en su mayoría provenientes de brotes nosocomiales (Marcos, 2003).

La concentración a la cual se evaluaron los extractos pudo ser muy baja e influir en los resultados ya que la mayor concentración utilizada fue de 400 µg/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 se pueda proponer una nueva opción de droga terapéutica de síntesis se debe utilizar *in vitro* una concentración de 64 µg/mL. Además hay que tomar en cuenta que los extractos de plantas son un complejo de metabolitos y no un compuesto químico y específico, dirigido a cierto lugar en las bacterias, como lo son los antibióticos sintéticos.

Las bacterias que se someten por periodos muy largos a tratamientos antibióticos y además se encuentran en un ambiente nosocomial tienden a producir cambios genéticos ya sea cromosomales o por plásmidos, que las protegen de varios agentes, así mismo tienen la capacidad de transmitir su información de forma vertical (de una generación a la siguiente) o de forma horizontal (de un bacteria a otra por medio de plásmidos).

Estos resultados promueven la investigación de nuevas alternativas terapéuticas, por ejemplo realizar la inhibición antibacteriana con combinaciones de extractos o bien evaluar si podría existir algún tipo de sinergia o efecto potenciador con algún antibiótico de síntesis junto con el preparado de plantas medicinales y proponer así nuevas alternativas menos tóxicas y más efectivas para contrarrestar las infecciones causadas por las bacterias multi-resistentes.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 El punto de corte para la determinación de la CIM por el método de microdilución en placa es de -0.020 ± 0.04 nm a una longitud de onda de 492 nm con un filtro diferencial de 630 nm utilizando como revelador MTT.
- 10.2 La membrana bacteriana tiene la capacidad de interactuar con el MTT y así demostrarse la viabilidad bacteriana.
- 10.3 De los diez extractos, *B. crassifolia* tuvo la mayor actividad inhibitoria con una concentración de 200 µg/mL, en cuatro cepas de *P. aeruginosa* y tres de *A. baumannii*.
- 10.4 En las ocho cepas donde hubo actividad inhibitoria, cinco cepas provenían de la unidad de cuidados intensivos.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Evaluar la actividad antibacteriana con combinaciones de extractos.
- 11.2 Evaluar si podría existir algún tipo de sinergia o efecto potenciador con algún antibiótico de síntesis junto con el preparado de plantas medicinales.
- 11.3 Utilizar la técnica de microdilución para la determinación de la CIM como prueba definitiva debido a que se pueden realizar una mayor cantidad de diluciones seriadas y dejar la técnica de macrométodo como tamizaje.
- 11.4 Realizar la tipificación genética de las cepas para determinar que tienen en común las diferentes cepas.
- 11.5 Continuar con investigaciones con poblaciones mayores de bacterias nosocomiales multi-resistentes utilizando los recursos naturales que Guatemala posee.

12. REFERENCIAS

- Abdala, L. (1999). Flavonoids of the aerial parts from *Tagetes lucida* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 27, 753-754.
- Acosta, F. & Acosta L. (2010). Taxonomic revision of the genus *Smilax* (Smilacaceae) in Central America and the Caribbean Islands. *Botanic Garden and Botanical*, 54(2), 227-280.
- Askun, T., Tunem, G., Satil, F. & Ates, M. (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., Både, U., Krebs, A. & Cromme, L. (2009). Rapid method for detection of minimal bactericidal concentration of antibiotics. *Journal of Microbiological Methods*, 77, 85–89.
- Barchitta, M., Cipresso, R., Giaquinta, L., Romeo, M., Denaro, C., Pennisi, Carlo & Agodi, A. (2009). Acquisition and spread of *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* in intensive care patients. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 212, 330–337.
- Berenguer, B., Sánchez, L., Quílez, A., López-Barreiro, M., De Haro, O., Gálvez, J. & Martín, J. (2006). Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID-induced gastric ulcers. *Journal of Ethnopharmacology*, 103, 194–200.
- Birdi, T., Daswani, P., Brijesh, S., Tetali, P., Natu, A. & Antia, N. (2010). Neseawrche artti cilne sights into the mechanism of action of *Psidium guajava* L. leaves in infectious diarrhoea. *Complementary and Alternative Medicine*, 10(33), 2-11.
- Bonacorsi, C., Raddi, M., Carlos, I., Sannomiya, M. & Velegas, W. (2009). Anti-*Helicobacter pylori* activity and immunostimulatory effect of extracts from *Byrsonima crassa* Nied. (Malpighiaceae). *Complementary and Alternative Medicine*, 9, 1-7.

- Cáceres, A., Alvarez, A., Ovando, A. & Samayoa, B. (1991). Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against Gram-positive bacteria. *Journal Ethnopharmacology*, 31, 193-208.
- Cáceres, A. (1993). *Actividad antifúngica de plantas de uso medicinal en Guatemala*. (p.85). Guatemala, Editorial Universitaria (cuaderno de investigación 7-92, Dirección general de investigación DIGI, USAC).
- Cáceres, A. (1996). *Plantas de Uso Medicinal en Guatemala*. Guatemala: Editorial Universitaria.
- Cáceres, A. (1999). *Manual de procedimientos del proyecto biodiversidad tropical centroamericana*. Guatemala: OEA.
- Cáceres, A. (1999). *Actividad de contra Vibrio cholerae de cinco plantas Americanas usadas en el trato de infecciones*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Cáceres, A. (2006). *Vademécum nacional de plantas medicinales*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Cai, Y., Wang, R., Liang, B. & An, M. (2009). *In vitro* bactericidal activity of colistin against biofilm-associated *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Hospital Infection*, 10, 1-2.
- Castanheira, M., Jones, R. & Livermore, D. (2009). Antimicrobial activities of doripenem and other carbapenems against *Pseudomonas aeruginosa*, other nonfermentative bacilli, and *Aeromonas* spp. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 63, 426–433.

- Castro, L. (2009). *Actividad antibacteriana de plantas medicinales en cepas clínicas de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido*. Tesis de graduación: Maestría Multidisciplinaria en producción y uso de plantas medicinales –MUPLAM- Universidad de San Carlos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala.
- Céspedes, C., Ávila, J., Martínez, A., Serrato, B., Calderón-Múgica, J. & Salgado-Garciglia, R. (2006). Antifungal and Antibacterial Activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(10), 3521-3527.
- Chalmers, K., Waugh, R., Sprent, J., Simons, A., & Powell, W. (1992). Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity*, 69, 465–472.
- Chen, T., Galinis, D. & Wiemer, D. (1992). Cornutin A and B: novel diterpenoid repellents of leafcutter ants from *Cornutia grandifolia*. *Journal of Organic Chemistry*, 57(3), 862–866.
- Coutinho, B., Costa, J., Lima, E., Falcão, V. & Siqueira, J. (2009). Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. *Complementary and Alternative Medicine*, 9(13), 1-4.
- Coyle, M. (2006). *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*. Washington: Departamento de Laboratorio Clínico y Microbiológico. Organización Panamericana de la Salud.
- Cruz, S., Cáceres, A., Álvarez, L., Morales, J., Apell, M., Henriques, A., Salamanca, E. et al. (2011). Chemical composition of essential oils of *Piper jacquemontianum* and *Piper variable* from Guatemala and bioactivity of the dichloromethane and methanol extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(4), 358-367.

- Davidse, G., Sousa, M. y Chater, A. (1995). *Flora Mesoamericana*. México: Universidad Autónoma de México.
- De Vos, D., Lim, A., Pirmay, J., Stwelens, M., Vandenvelde, C., Duinslaeger, L., Vanderkelen, A. & Cornelis, P. (1997). Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR bases on two outer membrane lipoprotein genes, OprL and OprM. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(6), 1295-1298.
- Diomedi, A. (2005). Infecciones por *Acinetobacter baumannii* pan-resistente. Consideraciones epidemiológicas y de manejo antimicrobiano actualizado. *Revista Chilena de Infectología*, 22(4), 298-320.
- Espinoza, P. (2011). *Determinación de metoenzimas como mecanismo de resistencia en aislamientos de Pseudomonas sp y Acinetobacter sp multiresistentes, referidos al Laboratorio Nacional de Salud*. Tesis de graduación: Química Bióloga. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala.
- Fernández, O., Capdevila, J., Dalla, G. & Melchor, G. (2002). Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract in the healing of open surgical wounds. *Fitoterapia*, 73, 564-568.
- Fleitas, G. (2001). *Obtención de formas farmacéuticas sólidas preliminares de extracto de Rhizophora mangle L. Cuba: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria*. Tesis de post-grado: Master en ingeniería de procesos biotecnológicos. Facultad de Ingeniería. Cuba.
- Fleming, T. (2004). Dispersal ecology of neotropical *Piper* shrubs and treelets. *Journal of Plant Ecology*, 4, 58-77.
- Franssen, F., Smeijsters, L., Berger, I. & Medinilla, B. (1997). *In vivo* and *in vitro* antiplasmodial activities of some plants traditionally used in Guatemala against malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 1500-1503.

- Frutos, P., Hervás, G., Girálde, F. & Mantecón, A. (1991). Tannins and Ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 33, 9- 62.
- Germosén, R. (2005). *Farmacopea Vegetal Caribeña*. 2ed. México: Editorial Universitaria.
- Ghosh, T., Arunima, T., Dutta, A. & Nag, A. (1993). Antidiarrhoeal activity of the methanolic fraction of the extract of unripe fruits of *Psidium guajava* Linn. *Phytotherapy Research*, 7, 431-433.
- Giamarellou, H., Antoniadou, A. & Kanellakopoulou, K. (2008). *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32, 106–119.
- González, F. (1998). *Plantas Medicinales del Noreste de México*. 1ed. México: El Manual Moderno.
- Girón, L., Freire, V., Alonzo, A. & Cáceres, A. (1991). Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *Journal Ethnopharmacology*, 34, 173-187
- Gómez, A. (2008). *Caracterización de extractos y aceites esenciales y evaluación de la actividad biológica de hojas de 3 especies de Piperaceas (P. Jacquemontianum, P. oradendron y P. umbrellatum)*. Tesis de graduación: Química Farmacéutica, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala
- Gueiss, F., Heinrich, M., Hunkler, D. & Rimpler, H. (1995). Proanthocyanidins with (+)-Epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* Bark. *Phytochemistry*, 9(3), 630-643.
- Gutierrez, J., Barry, C. & Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 91–97.

- 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 graduación: Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de CCQQ y Farmacia, Guatemala.
- Hernández, T., Canales, M., Flores, C., García, A., Durán, A. & Ávila, J. (2006). Antimicrobial activity of *Tagetes lucida*. *Pharmaceutical Biology*, 44(1), 19-22.
- Herrera-Ruiz, M., Zamilpa, A., González-Cortazar, M., Reyes-Chilpa, R., León, E., García, M., Tortoriello, J. & Huerta-Reyes, M. (2011). Antidepressant effect and pharmacological evaluation of standardized extract of flavonoids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytomedicine*, 18, 1255-1261.
- Hsueh, P., Teng, L., Yang, P., Chen, Y., Ho, S. & Luh, K. (1998). Persistence of multidrug-resistance *Pseudomonas aeruginosa* clones in an intensive care burn unit. *Journal Clinical Microbiology*, 36(5), 13-51.
- Jenett-Siems, K., Köhler, I., Kraft, C., Siems, K. & Solis, P. (2003). Cornutins C–L, neo-clerodane-type diterpenoids from *Cornutia grandifolia* var. *intermedia*. *Phytochemistry*, 64(3), 797-804.
- Johnson, A. (2007). Polymixin B for the treatment of multidrug-resistant. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 160(6), 1206-1215
- Jones, R., Bell, J., Sader, H., Turnidge, J. & Stillwell, M. (2009). *In vitro* potency of doripenem tested against an international collection of rarely isolated bacterial pathogens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 63, 434–439
- Kanellakopoulou, K., Sarafis, P., Galani, I., Giamarellou, H. & Giamarellos, E. (2008). *In vitro* synergism of beta-lactams with ciprofloxacin and moxifloxacin against genetically distinct multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32, 33–39.

- Kollef, M. (2003). Appropriate Empirical Antibacterial Therapy for Nosocomial Infections. Getting it Right the First Time. *Journal Drugs*, 63(20), 2157-2168.
- Konemam, E., Allens, S. Dowell, V. & Sommers, H. (1998). *Diagnostic Microbiology*. 5ed. Philadelphia N.Y.: Lippicott Raven Publishers.
- Lamy, B., Carret, G., Fladois, J. & Delignette, M. (2004). ¿How does susceptibility prevalence impact on the performance of disk diffusion susceptibility testing? *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 49, 131-139.
- Lin, L., Mukhopadhyay, S., Robbins, R. & Harnly, J. (2007). Identification and quantification of flavonoids of mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(5), 361-369.
- Linares, E., Bye, R. y Floren, B. (1999). *Plantas Medicinales de México. Usos y remedios tradicionales*. México: Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Livermore, D. (1995). β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Journal Clinical Microbiology*, 8(4), 557-569.
- Mahalim, G. (1995). *270 plantas medicinales Iberoamericanas*. Colombia: Continental Editions.
- Marchorro, S. (2007). *Detección de la actividad inhibitoria de extractos etanólicos de seis plantas contra Sporothrix schenckii y Fonsecaea pedrosoi*. Tesis de graduación: Química Bióloga, Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- Marcos, C., Martinez, P. y Máttar, S. (2003). *Acinetobacter baumannii*. España: Departamento de Microbiología y Parasitología.

- Marrero, E., Sánchez, J., De Armas, E., Escobar, A., Melchor, G., Abad, M., Bermejo, P., et al. (2006). COX-2 and sPLA2 inhibitory activity of aqueous extract and polyphenols of *Rhizophora mangle* (red mangrove). *Fitoterapia*, 77, 313–315.
- Marti, S., Sánchez, J., Alba, V. & Vila, J. (2009). *In vitro* activity of doripenem against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33, 181–182.
- Martínez, J., Bernal, H. y Cáceres, A. (2000). Fundamentos de agrotecnología de cultivos de plantas medicinales Iberoamericanas. *CYTED*, 524-528.
- Mehaffey, P., Dutnam, S., Barrett, M. & Jones, R. (1996). Evaluation of *in vitro* spectra of activity of azithromycin, clarithromycin and erythromycin tested against strains of *Neisseria gonorrhoeae* reference agar dilution disk diffusion and E-test methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 4, 479-481.
- Melchor, G., Armenteros, M., Fernández, O., Linares, E. & Fragas, I. (2001). Antibacterial activity of *Rhizophora mangle* bark. *Fitoterapia*, 72, 689-691.
- Morales, S., Díaz, C., González, D. y Huapaya, B. (2001). Susceptibilidad antibacteriana del *Streptococcus pneumoniae* determinando la concentración mínima inhibitoria en 1999. *Medicina Experimental y Salud Pública*, 18(2), 35-37.
- Motoshima M., Yanagihara, K., Yamamoto, K., Morinaga, Y., Matsuda, J., Sugahara, K., Hirakata, Y. et al. (2008). Quantitative detection of metallo- β -lactamase of blaI MP-cluster-producing *Pseudomonas aeruginosa* by real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis for rapid diagnosis and treatment of nosocomial infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 61, 222–226.
- Muraina, I., Picard, J. & Eloff, J. (2009). Development of a reproducible method to determine minimum inhibitory concentration (MIC) of plant extract against a slow-growing mycoplasmas organism. *Phytomedicine*, 16, 262–264.

- Navarro, F. (2003). El significado clínico de las β -lactamasas de espectro extendido. *Journal Clinical Microbiology*, 21, 69-71.
- Oudhuis, G., Verbon, A., Hoogkamp, J. & Stobberingh, E. (2008). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* from Intensive Care Units in The Netherlands, 1998–2005. *Journal of Antimicrobial Agents*, 31, 58–63.
- Özcelik B., Aslan M., Orhan I. & Karaoglu T. (2005). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of the lipophylic extracts of *Pistacia vera*. *Microbiological Research*, 160, 159-164.
- Ozier-Lafontaine, H., Lecompte, F. & Francois J. (1999). Analysis of the root architecture of *Gliricidia sepium* for the spatial prediction of root branching, size and mass: model development and evaluation in agroforestry. *Plant and Soil*, 209, 167–180.
- Palleroni, N. (1992). Present situation at the taxonomy of aerobic *Pseudomonas*. *Molecular Biology and Biotechnology*, 64(3), 105-115.
- Pérez, K. (2003). *Comparación de la actividad biológica de 10 extractos vegetales y 5 fármacos utilizando tres bioensayos toxicológicos*. Tesis de graduación: Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- Pérez, R., Mitchell, S. & Vargas, R. (2008). *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 117, 1–27.
- Pesewu, G., Cutter, R. & Humber, D. (2008). Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 102-111.

- Peterson, R. & Shanholtzer, C. (1992). Tests for bactericidal effects of antimicrobial agents: technical performance and clinical relevance. *Clinical Microbiology*, 5(4), 420-432.
- Ramírez, C., Pino, C., González, G., Bello, H., Domínguez, M., Mella, S., Zenelman, Z. et al. (2000). Presencia de integrones y su relación con la resistencia a cefalosporinas de tercera generación en cepas de *Acinetobacter baumannii* de origen nosocomial. *Revista Médica de Chile*, 128(8), 863-967.
- Ramírez, O. (1988). *Espectro de inhibición de bacterias patógenas por extractos vegetales*. Tesis de graduación: Química Biológica, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- Rastrelli, L., De Tommasi, N., Berger, I., Caceres, A., Saravia, A. & De Simone, F. (1997). Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytochemistry*, 45(4), 647-550.
- Rosales, M. (2005). *Determinación del patrón de susceptibilidad de Pseudomonas aeruginosa y Acinetobacter sp. aisladas en muestras de las salas del Hospital General San Juan de Dios*. Tesis de graduación: Química Bióloga. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- Ross, F. (1993). *Introductory Microbiology*. Ohio: Charles E. Merrill Publishing Company.
- Ruiz, L (2007). *Pseudomonas aeruginosa: Aportación al conocimiento de su estructura y de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos*. Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona, Facultad de Medicina. España.
- Rzedowski, G. y Rzedowski, J. (2001). *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.

- Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Gonçalves, M. & Proença, A. (2003). Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. *Journal of Natural Products and Medicinal Plant Research*, 69(1), 80-83.
- Sánchez, L., Ruedas, D. & Gómez, B. (2001). Gastric antiulcer effect of *Rhizophora mangle* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 77, 1–3.
- Schroth, M., Hildebrand, D. & Panopoulos, N. (2006). Phytopathogenic *Pseudomonas* and related plant-associated *Pseudomonas*. *The prokariotes*, 6, 714-740.
- Speijer, H., Sawelkoul, P., Bonten, M., Stobberingh, Z. & Tjhiel, J. (1997). Application of different genotyping methods for *P. aeruginosa*, a setting of endemicity in an intensive care unit. *Journal Clinical Microbiology*, 37(11), 3654-3661.
- Standley P & Steyermark J. (1958). *Flora of Guatemala*. Estados Unidos: Editorial Fieldiana Botany.
- Thomas, R., Richter, D., Ye, H., Heine, P. & Strain, B. (1991). Nitrogen dynamics and growth of seedlings of an N-fixing tree (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp.) exposed to elevated atmospheric carbon dioxide. *Oecologia*, 88, 415-421.
- Tohidpour, A., Sattari, M., Omidbaigi, R., Yadugar, A. & Nazemi, J. (2010). Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*, 17, 142–145.
- Torres, R. (2006). "*Cornutia grandifolia* - IBUNAM:MEXU:TUXAndres 220". UNIBIO: Instituto de Biología. Colecciones Biológicas.
- Torres-Rodriguez, J., Madrenys, N., Jiménez, T. y Saballs, P. (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.

- Tsukatani, T., Suenaga, H., Higudi, T., Akao, T., Ishiyama, M., Ezoe, K. & Matsumoto, K. (2008). Coloirimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water-soluble tetrazolium salts. *Journal of Microbiological Methods*, 75, 109-116.
- Volpato, G. & Godínez, D. (2004). Ethnobotany of PRU, a traditional Cuban refreshment. *Economic Botany*, 58(3), 381-395.
- Webster, G. (1993). A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (*Euphorbiaceae*). *Taxon*, 42(4), 793-823.
- Weenen, H., Nkunya, M., Bray, D., Mwasumbi, L., Kinabol, L. & Kilimali, V. (1990). Antimalarial activity of Tanzanian medicinal plants. *Journal of Natural Products and Medicinal Plant Research*, 56(4), 368-370.
- Walsh, T., Bolmström, A., Qwörnström, A. & Gales, A. (2002). Evaluation of a new test for detecting Metallo-beta-lactamases in Soutine clinical testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8), 2755-2759.
- Zampini, I., Cudmam, N. & Isla, M. (2007). Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. *Revista Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 41(3), 385-393.

13. ANEXOS

Anexo 1: Esquema de Inoculación

Esquema de inoculación de microplacas para estandarización de la concentración mínima inhibitoria por la técnica de microdilución en placa

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

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

Anexo 2: Esquema de Inoculación para Tamizaje

Reactivo			A	B	C	D	E	F	G	H	Cantidad	
Ctl neg.	Esterilidad del medio		●	●	●	●	●	●	●	●	200 μ L medio	
Ctl.pos	Bacteria	Pozo con ATB ●	●	●	●	●	●	●	●	●	100 μ L medio	+ 100 μ L bacteria
Ctl.	Esterilidad extracto		●	●	●	●	●	●	●	●	100 μ L medio	100 μ L extracto
	Dilución 1 Dilución 2 Dilución 3 Dilución 4	400 200 100 50	●	●	●	●	●	●	●	●	200 μ L D1	
			●	●	●	●	●	●	●	●	100 μ L D2	
			●	●	●	●	●	●	●	●	100 μ L D3	
			●	●	●	●	●	●	●	●	100 μ L D4	
Ctl. extracto	Esterilidad extracto	+ 100 μ L medio	●	●	●	●	●	●	●	●		+ 100 μ L bacteria
	Dilución 1 Dilución 2 Dilución 3 Dilución 4	400 200 100 50	●	●	●	●	●	●	●	●	100 μ L D1	
			●	●	●	●	●	●	●	●	100 μ L D2	
			●	●	●	●	●	●	●	●	100 μ L D3	
			●	●	●	●	●	●	●	●	100 μ L D4	
			50 μ L MTT							100 μ L descartar		

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

● Extracto 1

○ Extracto 2

● Extracto 3

○ Extracto 4

Anexo 3: Esquema de Inoculación para la determinación del CIM de los extractos

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 μ L medio	
Ctl.	Esterilidad extracto		○	○	○	○	○	○	○	○	100 μ L medio	100 μ L extracto
Ctl. pos	Bacteria	Pozo con ATB ●	●	○	○	○	●	○	○	○	100 μ L medio	+ 100 μ L bacteria
extracto	Dilución 1	+ 100 μ L medio	○	○	○	○	○	○	○	○	200 μ L D1	+ 100 μ L bacteria
	Dilución 2		○	○	○	○	○	○	○	○	100 μ L D2	
	Dilución 3		○	○	○	○	○	○	○	○	100 μ L D3	
	Dilución 4		○	○	○	○	○	○	○	○	100 μ L D4	
	Dilución 5		○	○	○	○	○	○	○	○	100 μ L D5	
	Dilución 6		○	○	○	○	○	○	○	○	100 μ L D6	
	Dilución 7		○	○	○	○	○	○	○	○	100 μ L D7	
	Dilución 8		○	○	○	○	○	○	○	○	100 μ L D8	
	Dilución 9		○	○	○	○	○	○	○	○	100 μ L D9	
	Dilución 10		○	○	○	○	○	○	○	○	100 μ L D10	
			50 μ L MTT							100 μ L descartar		

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

Anexo 4. Susceptibilidad de cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* multi-resistentes evaluadas.

Muestra	Origen	Servicio	Amicacina	Amp / Sulbactam	Ampicilina	Aztreonam	Cefalozina	Cefepima	Cefotaxima	Ceftazidima	Ceftriaxona	Cefuroxima	Gentamicina	Ciprofloxacina	Imipenem	Levofloxacina	Meropenem	Pi p / Tazo	Ticar / A. clav	Trobamicina	Trime / sulfa
<i>Pseudomona aeruginosa</i>																					
Paer A	Secreción	UCIP	R	R	R	R	R	R	--	R	I	--	S		S	S	S	S	--	S	R
Paer B	Secreción	EMA	S	--	R	S	S	S	I	S	I	S	R		S	S	R	S	S	R	R
Paer C	LP	CT	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	R	R	R
Paer D	Secreción	UCIP	R	R	--	I	--	I	R	R	R	R	R	R	S	R	--	I	R	R	R
Paer E	Secreción	MH	R	--	--	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	--	R	R
Paer F	Herida op.	P	S	R	--	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	--	R	S	S
Paer G	Secreción	UCIP	R	--	S	R	R	R	R	R	R	--	R	R	I	R	R	R	R	R	R
Paer H	Urocultivo	UCP	I	--	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	I	R	R	S	R	R	R
Paer I	LCR	EP	R	--	--	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	R	R
Paer J	Urocultivo	UCIP	r	--	--	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R
<i>Acinetobacter baumannii</i>																					
Abau A	Catéter	UCIP	I	I	--	--	R	I	I	S	S	--	I	S	S	S	R	--	R	S	R
Abau B	Secreción	EMA	R	R	--	--	--	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
Abau C	Hemocultivo	UCIN	R	I	--	--	--	R	I	R	I	--	R	S	S	R	--	--	--	S	R
Abau D	Secreción	UCIN	R	I	--	--	--	S	I	S	I	--	R	R	I	R	R	R	R	R	R
Abau E	Secreción	CP	S	R	--	--	--	R	R	R	R	--	S	R	I	R	R	--	R	S	S
Abau F	Secreción	MH	R	I	--	--	--	I	S	S	S	I	S	S	R	S	R	--	R	S	R
Abau G	Herida Op.	P	S	R	--	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	--	R	S	S
Abau H	Secreción	UCIP	R	R	--	I	--	I	R	R	R	R	R	R	S	R	--	I	R	R	R
Abau I	Catéter	UCIP	R	R	--	--	--	R	R	I	R	--	R	R	S	R	I	--	R	R	R
Abau J	Catéter	UCIP	R	R	--	--	--	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	--	R	S	R

LCR: Líquido cefalorraquídeo. LP: Líquido peritoneal. UCIP: Unidad de cuidados intensivos pediatría. EMA: Emergencia de adultos. CT: Cirugía de tórax. UCIN: Unidad de cuidados intensivos neonatales. MH: Medicina de hombres. CP: Cirugía de pediatría; P: pediatría