

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



Espectro de inhibición de bacterias aisladas de muestras clínicas  
por cinco especies de plantas con actividad antimicrobiana.

Gilma Nataly del Cármen Torres Hernández  
Química Bióloga

Guatemala, octubre de 2012

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



Espectro de inhibición de bacterias aisladas de muestras clínicas  
por cinco especies de plantas con actividad antimicrobiana.

Informe de Tesis

Presentado por

Gilma Nataly del Cármen Torres Hernández

Para optar al Título de

Química Biológica

Guatemala, octubre de 2012

## **ACTO QUE DEDICO**

A Dios y a la Virgen María,

A mis padres César Anibal Torres Ortíz y Gilma Hernández Ruíz de Torres,

A mis hermanos César Anibal y Gilberto Salvador,

A mi demás familia y amigos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Guatemala,

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, en especial a la Facultad de Ciencias  
Químicas y Farmacia,

A mi asesor, Lic. Armando Cáceres,

A mis revisores, Licda. Ana Margarita Paz, M.A. y Licda. Rosario Hernández, M.Sc.,

Al Departamento de Citohistología,

A mis catedráticos,

A mis compañeros de promoción y amigos,

A mi equipo de trabajo.

**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 Porras López	Vocal V

**INDICE**

	<b>PÁGINA</b>
<b>I. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>III. ANTECEDENTES</b>	<b>5</b>
A. Generalidades	4
B. Medicina tradicional	5
C. Estudios etnobotánicos en Guatemala	6
D. Estudios sobre la actividad antimicrobiana vegetal	7
E. Plantas seleccionadas para el estudio	9
F. Agentes causales de infecciones humanas	16
G. Microorganismos a evaluar en estudio	16
H. Técnicas para determinar actividad antimicrobiana	22
<b>IV. JUSTIFICACIONES</b>	<b>28</b>
<b>V. OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
<b>VI. HIPÓTESIS</b>	<b>30</b>
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>31</b>
<b>VIII. RESULTADOS</b>	<b>37</b>
<b>IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>43</b>
<b>X. CONCLUSIONES</b>	<b>47</b>
<b>XI. RECOMENDACIONES</b>	<b>48</b>
<b>XII. REFERENCIAS</b>	<b>49</b>

## I. RESUMEN

En los últimos años se ha adquirido cada vez más conciencia acerca de la resistencia antimicrobiana, sobre todo por la problemática que esto trae al sistema de salud en el país, asimismo de la necesidad de encontrar nuevas opciones terapéuticas que sean accesibles, económicas y eficaces para la población.

El propósito de este estudio fue determinar el espectro de inhibición de extractos etanólicos de cinco plantas sobre bacterias aisladas de muestras clínicas. La actividad antimicrobiana *in vitro* y el método de dilución para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM), se realizaron por medio de tamizaje propuesto por Mitscher y colaboradores. Se escogieron cinco especies de plantas que son utilizadas popularmente en la población y que han demostrado actividad antimicrobiana preliminarmente: *Byrsonima crassifolia* (Nance), *Litsea guatemalensis* (Laurel), *Psidium guajava* (Guayaba), *Sambucus mexicana* (Sauco) y *Simarouba glauca* (Aceituno). Se utilizaron 17 cepas bacterianas, tanto Gram positivo como Gram negativo, con resistencia antimicrobiana, aisladas de muestras clínicas provenientes del Hospital Roosevelt y Laboratorio Clínico Popular –LABOCLIP-. Según el diseño estadístico, se realizó la prueba de hipótesis binomial (valor de significancia  $p=0.0313$ ), que nos indica que la probabilidad de que estos resultados sean por azar es de 0.0313, lo cual es menor al nivel pre establecido de significancia  $\alpha = 0.10$ .

La bacteria Gram positivo que presentó mayor resistencia frente a los antibióticos evaluados es *Enterococcus durans* y la que presentó menor resistencia es *Staphylococcus epidermidis*. Este grupo de bacterias evaluadas presentó mayor resistencia frente a tetraciclina y menor resistencia a vancomicina. Las bacterias Gram negativo que presentaron mayor resistencia frente a los antibióticos evaluados fueron *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Shigella boydii*. Este grupo de bacterias evaluadas presentó mayor resistencia frente a gentamicina y menor resistencia a ceftriaxona. Los extractos etanólicos más efectivos encontrados en este estudio fueron el de la hoja de *P. guajava* y la hoja de *B. crassifolia* y el extracto menos efectivo fue el de la

hoja de *S. mexicana*. Las especies que no fueron inhibidas por ningún extracto etanólico en este estudio fueron *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri* y las especies que fueron inhibidas por la mayoría de los extractos etanólicos fueron *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus durans*, *Pseudomonas fluorescens* y *Staphylococcus epidermidis*. La CIM encontrada en los extractos etanólicos más efectivos de la hoja *P. guajava* y la hoja de *B. crassifolia* fue de 0.50-1.00 mg/mL. Debido a que se encontró actividad antimicrobiana y una CIM muy alta en estos extractos, se valida el uso popular, porque a estas concentraciones es inviable para uso industrial y desarrollo de medicamento de uso terapéutico. Se concluyó que la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos utilizados frente a las cepas bacterianas ATCC es diferente con respecto al que presentan las bacterias evaluadas obtenidas de aislamientos clínicos, es decir, las cepas bacterianas ATCC fueron más sensibles.

## II. INTRODUCCIÓN

Según el Informe de Desarrollo Humano, las enfermedades infecciosas constituyen un grave problema de salud, especialmente en los niños. Algunos factores predisponentes como medidas higiénicas, condiciones ambientales y de saneamiento contribuyen al desarrollo de los microorganismos responsables de estas infecciones. En Guatemala se han logrado importantes avances en el mejoramiento de las condiciones de saneamiento como el uso de letrinas, drenaje y agua potable, pero todavía la situación en muchas regiones es difícil (Organización Panamericana de la Salud, 1998).

Desde hace muchos siglos se ha utilizado como materia prima las plantas, con el fin de preparar remedios para curar las más diversas dolencias y enfermedades. En la antigüedad sólo se disponía de la naturaleza para preparar dichos remedios, pero en la actualidad se han desarrollado estudios científicos en donde se identifica el componente activo que posee la planta, lo que permite su desarrollo industrial. Los componentes activos de las plantas pueden encontrarse en cualquiera de sus órganos como raíz, corteza, hoja, tallo, flor y fruto, por lo que deben extraerse de los órganos usados popularmente con demostración de actividad (Naranjo, 1978).

En Guatemala, a partir de 1927, se dio inicio a la recopilación y documentación sobre plantas nativas medicinales. Existen por lo menos 623 plantas pertenecientes a 114 familias que son utilizadas con fines medicinales, con énfasis en el tratamiento de procesos infecciosos de sistemas como el digestivo, respiratorio, genitourinario, piel y mucosas (Cáceres, Álvarez, Ovando, & Samayoa, 1991).

El propósito de este estudio fue determinar el espectro de inhibición de extractos etanólicos de cinco plantas sobre bacterias aisladas de muestras clínicas. La actividad antimicrobiana *in vitro* y el método de dilución para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM), se realizaron por medio de tamizaje propuesto por Mitscher y colaboradores (Mitscher, Leu, Bathda, & Beal, 1972). Con base en resultados obtenidos en estudios anteriores sobre

la actividad antibacteriana *in vitro* en extractos vegetales, se escogieron cinco especies de plantas que son utilizadas popularmente en la población y que han demostrado actividad antimicrobiana preliminarmente: *B. crassifolia*, *L. guatemalensis*, *P. guajava*, *S. mexicana* y *S. glauca*. Los extractos etanólicos de dichas plantas fueron obtenidos de la colección del Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, los cuales se enfrentaron a 17 cepas bacterianas obtenidas de muestras clínicas de pacientes del Hospital Roosevelt y LABOCLIP de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

### III. ANTECEDENTES

#### A. Generalidades

La herbolaria medicinal o fitoterapia, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), es el conocimiento, las habilidades y prácticas relacionadas con el cuidado de la salud de forma holística, además que existe un valor económico significativo asociado a esta forma de medicina (Organización Panamericana de la Salud, 1998). Una planta medicinal es aquella que contiene en uno o más de sus órganos principios químicos que pueden ser utilizados directamente como medicamentos o bien servir para la síntesis de fármacos (Aguilar, 1966). Por otra parte, se define a la etnobotánica como la ciencia que estudia las relaciones mutuas entre los grupos y las plantas en una dimensión temporal, cultural y ecológica y a la etnobotánica médica como la rama de la etnobotánica que comprende la colecta, documentación y preservación de la cultura popular relacionada con las plantas que curan y las prácticas medicinales, agrícolas y holísticas involucradas, siendo una ciencia basada en varias disciplinas tales como la antropología, la agronomía, la ecología y la medicina (Arteche, 1992).

La medicina natural ha cobrado importancia debido al descubrimiento de los graves efectos secundarios que producen los fármacos sintéticos como el aumento de la resistencia antimicrobiana, desperdicio de recursos económicos para la salud e incremento de mortalidad por enfermedades infecciosas, entre otros (Dreser, Wirtz, Corbett, & Echániz, 2008). Un mayor conocimiento químico, farmacológico y clínico de los principios activos de los vegetales y sus productos derivados, ha llevado al desarrollo de nuevas formas de preparación y administración de las sustancias vegetales y sus extractos (Guerra, Torres, & Martínez, 2001).

El estudio de las plantas medicinales conlleva a la necesidad de compilar información disponible que sirva como herramienta para solucionar problemas de salud, que permita disponer de fuentes de información para posteriores tamizajes farmacológicos y fitoquímicos (Porter, 2003).

## **B. Medicina tradicional en Guatemala**

Guatemala es un país rico en tradiciones que cuenta con una gran herencia cultural en donde la medicina natural ocupa un importante lugar; esto unido a que ecológicamente hay una gran diversidad botánica ampliamente distribuida en las diferentes regiones del país, hacen que el uso de plantas sea una alternativa de tratamiento con posibilidades de éxito. El uso y aprovechamiento de las plantas en los diferentes espacios culturales y en el tiempo toma cada vez mayor importancia, ya que en la mayoría de las regiones del país, la población cuenta con dificultad de acceso a productos farmacéuticos lo que conlleva a la dificultad de solucionar la mayoría de problemas de salud (Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo, 2002).

Debido al poco acceso a la salud que existe, especialmente en las áreas rurales, se ha mantenido el uso de la medicina tradicional, que se define como el conjunto de conocimientos y prácticas terapéuticas generadas en el seno de la comunidad, transmitidas generacionalmente y que basadas en un saber empírico ofrecen soluciones a las diversas manifestaciones de enfermedad con el objetivo de mejorar la salud de la población. Su rasgo característico es su íntima relación con la cultura de la comunidad y biodiversidad de su entorno (Villatoro, 1984).

Con el propósito de comprender las raíces de la medicina tradicional en la población y sus diferentes metodologías es importante hablar de la cultura de los antepasados de la población nativa guatemalteca: los mayas (Cáceres & Sapper, 1977).

Como en otras culturas antiguas, la civilización maya muestra el carácter sagrado de la medicina. Los mayas desarrollaron amplios conocimientos sobre la flora y la fauna de las tierras que habitaron. Lograron seleccionar y aprovechar todas aquellas a las que les descubrieron propiedades terapéuticas. Según Villatoro (1984): “La nomenclatura botánica usada por los mayas supera a la empleada en ese entonces en los países de Europa. Muchas de las plantas utilizadas por ellos conservan aún sus nombres indígenas” (pp. 15).

Según Lozoya (1984), la medicina tradicional ha sido la medicina de los pobres, proporciona salud a cerca del 40% de la población mesoamericana. Es por eso que se hace indispensable un profundo análisis sobre las plantas medicinales, sus características y sus usos (Lozoya, 1984).

### **C. Estudios etnobotánicos en Guatemala**

En Guatemala existen estudios acerca de la flora medicinal dentro de los cuales caben mencionar: *Historia Natural del Reino de Guatemala* (Ximenez, 1967), *Flora útil médico-guatemalteca* (Roque, 1941), *Contribución a las investigaciones sobre plantas medicinales y económicas de Guatemala* (Ippish, 1943) y *Atlas of Medicinal Plants of Middle America* (Morton, 1977)

También se han realizado estudios de etnobotánica medicinal; entre estos trabajos resalta en el que Mellen (1974), publicó un listado de 300 plantas en las que describe el nombre común y científico, clasificación por acción terapéutica y modo de preparación. Este trabajo es importante, porque hace una reseña histórica del uso de las plantas medicinales desde la época precolombina hasta el siglo XIX .

Las plantas medicinales vuelven a constituir hoy día un importante cultivo para uso por la población o producción de materia prima que son necesarias para la fabricación de medicamentos (Hernández, 1989).

Cabe mencionar que Cáceres & Sapper (1977), hicieron estudios sobre los puntos de vista de medicina tradicional en el país y publicaron los resultados de una encuesta sobre plantas medicinales realizadas en mercados municipales localizados en diferentes regiones geográficas del país y hacen un listado de las 10 plantas más utilizadas en esas regiones. Con esta información y revisiones de literatura se inició un archivo de datos en el Centro de Estudios Mesoamericanos sobre Tecnología Apropriada (CEMAT).

En 1984, se publica una breve descripción botánica de 63 especies vegetales, en donde hace mención a los usos medicinales de varias de las plantas que describe, también publica un estudio sobre las Loranthaceas, en donde recomienda que se hagan estudios sobre las propiedades curativas de las mismas (Poll, 1985).

En 1988 se realizó un trabajo sobre plantas medicinales y alimenticias en la región semiárida del nororiente de Guatemala, en el cual se presentan los usos de 79 especies vegetales (Ronquillo, Melgar, Carrillo & Martínez, 1988).

Según Cáceres & Samayoa (1990), por detección etnobotánica y revisión bibliográfica demuestra que hay por lo menos 623 plantas que se utilizan para tratar infecciones en Guatemala. Finalmente es de enfatizar la recopilación de información sobre plantas medicinales utilizadas popularmente en Guatemala y validadas para su uso según el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS) en el “Vademécum Nacional de Plantas Medicinales” (Cáceres, 2009).

#### **D. Estudios sobre la actividad antimicrobiana vegetal**

En 1987, se realizó un estudio utilizando extractos etanólicos de 1,248 especies de plantas superiores en 7 microorganismos, representantes de bacterias Gram positivo, Gram negativo y ácido resistentes, encontrando que 26% de las plantas tuvieron efecto contra alguno de los microorganismos (Mitscher, 1987).

Con el objetivo de conocer sobre la actividad antimicrobiana de las especies vegetales medicinales se realizaron encuestas etnobotánicas y revisiones de literatura acerca de 200 usos de estas, usadas en Guatemala para el tratamiento de enfermedades dermatomucosas; 89 plantas fueron seleccionadas para medir actividad antimicrobiana *in vitro* contra los microorganismos usualmente causantes de infecciones en la piel y mucosas (Cáceres, Girón, Alvarado, & Torres, 1987). En otro estudio, se identificaron 385 plantas utilizadas para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, de las cuales se prepararon extractos hidroalcohólicos de 84 plantas, demostrándose que los extractos de 34 plantas (40.5%)

presentó actividad inhibitoria a más de alguna de las enterobacterias ensayadas (Cáceres, Cano, Samayoa & Aguilar, 1990). Un estudio de la actividad antimicrobiana de 21 plantas nativas usadas para tratar infecciones por protozoarios en Guatemala, en donde utilizaron diferentes técnicas y se demuestra actividad de los extractos. Además estandarizaron una técnica nueva para determinar la actividad antibacteriana, que ya no utiliza discos como la prueba de Bauer y Kirby, sino estrías en el agar según lo descrito por Mitscher en 1972 (Cáceres, & Samayoa, 1989).

Estudios de la actividad antimicrobiana *in vitro* de la maceración hidroalcohólica de la corteza de *B. crassifolia* han demostrado que es activa contra *S. typhi*, *S. flexneri*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* (Cáceres, & Samayoa, 1989).

Encuestas etnobotánicas y revisiones de literatura muestran que en Guatemala se usan 234 plantas de 75 familias para afecciones respiratorias, de éstas 149 (64%) son nativas del continente americano, 67 (29%) son introducidas y 18 (8%) cosmopolitas. De esta lista se seleccionaron 68 para estudios *in vitro* de su actividad contra bacterias Gram positivo, agentes de infecciones en el tracto respiratorio, de ellos, 28 (41%) inhibieron el crecimiento *in vitro* de al menos una de las bacterias evaluadas (Cáceres, Álvarez, Ovando, & Samayoa, 1991).

Se tamizó la actividad de 1,022 extractos de 243 plantas, de las cuales 47 (19.5%), mostraron tener actividad contra las bacterias patógenas ensayadas como *E. coli* y *Staphylococcus aureus*, entre otras (Cáceres, Girón & Martínez, 1996). Por otro lado, en un trabajo de tesis se presenta información, que las plantas *Spondias purpurea* y *S. glauca* inhiben el crecimiento de *S. typhi* y *Candida albicans* (Zamora, 1996).

En 2003, Fión realizó una recopilación de todas las plantas usadas en Guatemala que tienen estudios acerca de su actividad antimicrobiana y farmacológica en su trabajo de tesis, donde señala que el extracto acuoso al 10% de *L. guatemalensis* muestra actividad *in vitro* contra bacterias de laboratorio por el método de Bauer Kirby, además que el extracto acuoso al

10% de las hojas de *P. guajava* presentan inhibición *in vitro* de crecimiento bacteriano (Fión, 2003).

Según García, la tintura de hojas de *S. mexicana* es activa contra enterobacterias, *Vibrio cholerae* y *S. aureus*, pero inactiva contra otras bacterias. De 20 cepas aisladas de pacientes se encontró que el 70% de *S. typhi* fueron inhibidas por el extracto etanólico (Cáceres, 2009).

Dentro de las instituciones que se encargan de realizar estudios *in vitro* para determinar las propiedades antifúngicas y antimicrobianas de diversas especies de plantas, se encuentra el departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, Universidad del Valle de Guatemala, el Laboratorio de Productos Naturales FARMAYA y el CEMAT.

### **E. Plantas seleccionadas para el estudio**

Debido a que han demostrado previamente actividad antimicrobiana en cepas de laboratorio, se escogieron cinco plantas nativas de uso popular en la población para el tratamiento de enfermedades asociadas con procesos infecciosos usando cepas clínicas aisladas de pacientes infectados. Entre ellas están:

#### 1. Aceituno, Jocote de mico: *Simarouba glauca* DC (Simaroubaceae) (Cáceres, 1996)

##### a. Biología

Árbol dioico, hasta de 15 m de alto, tronco de 30 cm de diámetro. Árbol de hojas largas, con flores blanquecinas. Fruto en drupa ovalada, pulpa gruesa, color rojo que se torna negra al madurar (Ronquillo, 1988 y Witsberger, Current, & Archer, 1982).

Es nativo de Mesoamérica en bosques secos subtropicales, regiones húmedas o pobladas de matorrales, sobre laderas secas rocosas abiertas, en variedad de regiones desde el sur de México a Centro América y el Caribe en alturas hasta de 900 msnm (Standley &

Steyermark, 1946). En Guatemala, se ha descrito en Baja Verapaz, Chiquimula, El Progreso, Izabal, Jutiapa, Petén, Quiché, Retalhuleu, Santa Rosa y Zacapa (Cáceres, 1996).

b. Usos medicinales atribuidos

La infusión de la corteza y raíz se usa por vía oral para tratar malaria, afecciones gastrointestinales (diarrea, dispepsia atónica, debilidad, amebiasis, lombrices, tricocéfalos, vómito), nerviosismo, fiebre intermitente y tos. La tintura de hojas tiene actividad antiamebiana. Las hojas machacadas se aplican tópicamente para el tratamiento de afecciones cutáneas, prurito y algunas formas de cáncer (Martínez, 1992, Morton, 1981 y Cáceres, 1996).

c. Farmacología antimicrobiana

Estudios antibacterianos demuestran que la tintura de hojas es activa contra *S. typhi* y *S. flexneri* e inactiva contra *E. coli* enteropatógena, *S. aureus*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella dysenteriae* (Cáceres y otros, 1990).

El extracto soluble de cloroformo de *S. glauca* mostró actividad citotóxica contra varias líneas de células humanas del cáncer, especialmente de pulmón (Rivero-Cruz, Chávez, Hernández, Anaya, & Mata, 2005).

2. Guayaba: *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) (Cáceres, 1996)

a. Biología

Árbol de 10 m de alto, corteza suave, delgada, escamosa. Hojas verdes, opuestas, peciolo corto elípticas, 5-15 cm de largo, redondas en el ápice y en la base, múltiples venas horizontales, glandulares. Flores axilares, solitarias, blancas, 3-4 cm de ancho, penacho de 275 estambres. Frutos aromáticos, piriformes, 2-10 cm de largo, cáscara amarilla, carnaza rosada firme, centro suave, con pulpa jugosa y semillas color café claro, redondas y duras (Ministry of Health of Indonesia, 1981 y Standley, & Williams, 1964).

Nativo de América tropical, se encuentra en bosques húmedos y secos, pastos y bosquecillos puros del árbol. En Guatemala se ha descrito en todo el país, especialmente en Baja Verapaz, Chiquimula, Jutiapa y Santa Rosa (Standley & Williams, 1964). La planta crece mejor en verano y prefiere suelos ligeramente ácidos con pH de 4.5 a 9.4 (Rivera, Gatusso, & Lozoya, 2003).

#### b. Usos medicinales atribuidos

La decocción de hojas y corteza se usa por vía oral para tratar afecciones digestivas (amebiasis, diarrea, disentería, cólico, dolor de estómago, parasitismo intestinal, vómito), anemia, artritis, diabetes, hemorragia, hinchazón, uretritis, asma, dismenorrea y resfrío. La decocción de raíz se usa para tratar hidropesía (Cáceres, 1996 y Huang, 1993). El efecto sobre la dismenorrea se debe por la existencia en la hoja de un grupo de flavonoides derivados de la quercetina-intestinal con propiedades antiinflamatorias, antimotilidad y espasmolítico. (Pérez, Mitchell, & Vargas, 2008, Vladislavovna, Reyes, Flores, Martínez-García, González, M., *et al.*, 2006).

La decocción por vía tópica se recomienda en baños y lavados para tratar enfermedades dermatomucosas y enjuagues para lengua inflamada (Cáceres, 1996).

A las hojas y corteza se les atribuye propiedad antibacteriana, antiemética, antiinflamatoria, antihelmíntica, antiséptica, antitusiva, astringente, carminativa, espasmolítica y tónica. El fruto se usa para aliviar la congestión respiratoria, se le atribuye propiedad astringente, febrífuga y desinflamante (Cáceres, 1996 y Pérez, 2008).

#### c. Farmacología antimicrobiana

Estudios antibacterianos demuestran que la tintura de hojas es activa contra *E. coli*, *S. dysenteriae*, *S. typhi*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. flexneri* y *P. aeruginosa*; es inactiva contra *V. cholerae* y *Neisseria gonorrhoea*. La tintura inhibe 80% de cepas de *E. coli*, *S. typhi*, *S. dysenteriae* y *S. pyogenes*. El extracto acuoso de raíz y hojas es antibacteriano; el

extracto metanólico de los frutos verdes es activo contra *Shigella* spp y *V. cholerae* (Morton, 1981 y Naqvi, Khan & Vohora, 1991).

La actividad antimicrobiana de extractos acuosos y alcohólicos evaluados en estudios *in vitro*, confirman la inhibición del crecimiento de *S. aureus*, *E. coli* y otras Enterobacterias (Rodríguez, Hernández-Cruz & Giles-Rios, 2001, Cáceres, Fletes, Aguilar, Ramírez, Figueroa, Taracena, *et. al.*, 1993, Jairaj & Khoohaswan, 1999 ).

### 3. Laurel: *Litsea guatemalensis* Mez. (Lauraceae) (Cáceres, 1996)

#### a. Biología

Árbol pequeño hasta 6 m de alto, ramas delgadas, café. Hojas coriáceas, peciolo 1.5 cm de largo, elíptico-lanceoladas, 8 cm de largo, agudas en la base, lustrosas, glabras. Flores axilares, pedúnculo simple, solitarias 15 mm de largo, 5-11 flores; brácteas de involucreo deciduo; filamentos glabros (Standley & Steyermark, 1946).

Es endémico de Guatemala, crece en bosques abiertos de pino y matorrales de 1500-3150 msnm; se ha descrito en Chimaltenango, Guatemala, Jalapa, Sacatepéquez y Sololá (Standley & Williams, 1964).

#### b. Usos medicinales atribuidos

El cocimiento de hojas por vía oral se usa para tratamiento de afecciones respiratorias (amigdalitis, dolor de la garganta, tos, tos ferina) y gastrointestinales (diarrea, cólico, úlcera), carencia de leche en la madre e hinchazón; por vía tópica se usa en lavados y baños para cansancio y epilepsia. El cocimiento de la corteza se usa para tratar mordeduras de culebras y de perros. Tópicamente se usa en lavados y baños para cansancio, úlceras, piernas hinchadas y epilepsia; en sahumeros se usa para parálisis (Aguilar, 1966, Argueta, Cano, & Rodarte, 1994, Linares, Flores, & Bye, 1985 y Martínez, 1992).

### c. Farmacología antimicrobiana

Estudios antifúngicos demuestran que la tintura de hojas de *L. guatemalensis* tiene moderada actividad contra *C. albicans*; el extracto presenta actividad insecticida contra hormigas (Cáceres, 1996). Además presenta actividad antimicrobiana *in vitro* en cepas de bacterias de laboratorio el extracto acuoso de hojas (Fión, 2003).

El extracto etanólico de *L. guatemalensis* contra *M. smegmatis* a una concentración de 0.25 mg/mL y contra *S. aureus* y *S. typhi* a 1 mg/mL (Cruz, Cáceres, Medinilla, Paredes, García, Letrán, & Orozco, 2008).

## 4. Nance: *Byrsonima crassifolia* (L.) HBK (Malpighiaceae) (Cáceres, 1996)

### a. Biología

Árbol de 3-10 m de alto, copa redondeada o extendida, corteza café, rugosa, rosada por dentro. Hojas siempre verdes, opuestas, ovaladas, 5-20 cm de largo, puntiagudas. Flores de cinco pétalos, amarillas o anaranjadas, numerosas, en grupos. Frutos en drupa carnosa, 8-22 mm de diámetro, portados aisladamente en racimos, piel delicada, amarilla; carnaza blanca, jugosa, ácida, olor peculiar; semilla negra muy dura (FAO, 1987 y Standley, & Steyermark, 1946).

Nativo de México a Sur América y Caribe en bosques secos y tropicales hasta 1800 msnm. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chiquimula, El Progreso, El Quiché, Escuintla, Huehuetenango, Retalhuleu, San Marcos, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa (Cáceres, 1996).

### b. Usos medicinales atribuidos

El cocimiento de corteza y flores se usa por vía oral para tratar afecciones respiratorias (amigdalitis, asma, bronquitis, fiebre, tos), digestivas (cólico, diarrea, disentería, estreñimiento, indigestión), dolor de muelas, hemorragias, mordedura de culebra, parásitos

y favorecer el parto y la expulsión de la placenta. El fruto se usa para tratar fiebres y las semillas para disentería (Ronquillo y otros, 1988).

Por vía tópica se usa para tratar afecciones dermatomucosas (estomatitis, leucorrea, piodermia, tinea, úlceras, vaginitis), tumores y apretar los dientes (Duke, 1986). Se le atribuye propiedad acaricida, antifúngica, antineurálgica, antitusiva, astringente, cicatrizal, desinflamante, digestiva, emenagoga, febrífuga, galactogoga y tónica (Cáceres, 1996).

Estudios previos sobre *B. crassifolia* ha demostrado propiedades antioxidantes de los extractos polares de la corteza, hojas y frutos relacionados con la presencia de polifenoles derivados (Maldini, 2009).

#### c. Farmacología antimicrobiana

Estudios antimicrobianos demuestran 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. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *C. albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* y *Candida stellatoidea* (Cáceres, Figueroa, Taracena, & Samayoa, 1993).

De cinco órganos del árbol, se demostró que la corteza es la más activa contra bacterias y el etanol el mejor disolvente por bioactividad y rendimiento; las bacterias más sensibles fueron *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. flexneri* y *S. pyogenes* (Cáceres, 1996).

El acetato de etilo de las raíces fue la más activa frente a *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. flexneri*, *S. aureus*, y *Micrococcus pneumoniae* (Martínez, 1999).

### 5. Sauco: *Sambucus mexicanus* Pres. ex A. DC. (Caprifoliaceae) (Cáceres, 1996)

#### a. Biología

Árbol pequeño, 3-5 m de altura, tronco de 30 cm de grueso, glabro; tallo con médula blanca, suave. Hojas de 30 cm de largo, bipinadas, 5-7 hojuelas opuestas, terminales el

doble que laterales; folios sin pedúnculo, lanceolados, elípticos, dentados. Inflorescencia corimbiforme, convexa, panículas planas casi circulares; corolas fragantes, blancas, numerosas. Frutos púrpura-negros, redondos y jugosos (Ocampo & Maffioli, 1987 y Nash & Dieterle, 1976).

Nativo de México y Centroamérica. En Guatemala es cultivada como cerco vivo en casi todas las latitudes. Es de cultivo fácil (Nash, 1976).

#### b. Usos medicinales atribuidos

Se usa como diurético, diaforético, béquico, laxante, calmante, excitante, purgante, expectorante, antiinflamatorio, antiespasmódico, emoliente y emético (vomitivo). La raíz se usa como diurético y emoliente. La corteza se usa como estimulantes hepático, purgante, emético (en grandes dosis), diurético y en uso tópico como emoliente (Cáceres, 1996 y Martínez, 1992).

La decocción de hojas en uso externo es refrescante y calmante. Se usa para lavar inflamaciones, hematomas, contusiones, torceduras, eccemas y otras alteraciones de la piel (Rivero-Cruz, Chávez, Hernández, Anaya & Mata, 2005).

#### c. Farmacología antimicrobiana

La tintura de hojas es activa contra enterobacterias: *V. cholerae* y *S. aureus*, pero inactiva contra otras bacterias. De 20 cepas aisladas de pacientes el 70% de *S. typhi* son inhibidas por el extracto etanólico (Cáceres y otros, 1990 y Cáceres y otros, 1991).

### **F. Agentes causales de infecciones humanas**

Guatemala, por ser un país con un clima tropical, en vías de desarrollo y con condiciones de saneamientos ambientales precarios favorece la transmisión de infecciones, causando tasas de morbilidad elevadas causadas por infecciones (Organización Panamericana de la Salud, 1998).

Otro tipo de infección importante es la infección nosocomial, la cual es adquirida en casi el 5% de los enfermos hospitalizados. Este tipo de infección es causada por varias razones entre las que destacan la susceptibilidad a enfermedades infecciosas, la aglomeración de pacientes en las habitaciones, que el personal transfiere de un lugar a otro a los patógenos, el aumento del riesgo de introducir patógenos por medio de procedimientos quirúrgicos, etc. (Madigan, 2004).

Entre las bacterias patógenas con mayor virulencia y causantes de infecciones (independientemente del estado del paciente) están: las bacterias Gram positivo como por ejemplo *S. aureus*, que colonizan la piel, la nariz y pueden causar una gran variedad de infecciones pulmonares, óseas, cardíacas y sanguíneas. A menudo son resistentes a los antibióticos. Además están las bacterias Gram negativo de la familia Enterobacteriaceae como: *E. coli*, *Proteus* sp, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp, *Serratia marcescens*, quienes tienen la capacidad de colonizar varios sitios cuando las defensas del huésped están comprometidas (inserción de un catéter, de una cánula o de una sonda vesical) y causar infecciones graves en el sitio de una intervención quirúrgica, los pulmones, el peritoneo y también bacteremia. Pueden ser sumamente resistentes a los antibióticos. Los microorganismos Gram negativo como *Pseudomonas* sp pueden colonizar el aparato digestivo de los pacientes hospitalizados (Madigan, 2004).

### **G. Microorganismos a evaluar en estudio**

Debido a la amplia propagación de bacterias patógenas con resistencia múltiple a los antibióticos, este se ha reconocido como un importante problema global para la sanidad humana, volviéndose el estudio de la actividad antimicrobiana de microorganismos aislados de muestras clínicas sumamente importante, debido a la diferencia de comportamiento en comparación de una cepa proveniente de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés), quienes por estudios realizados previamente presentan patrón de actividad antimicrobiana conocida (Madigan, 2004).

Entre las bacterias aisladas de muestras clínicas a evaluar en este estudio se encuentran:

1. *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (complejo)

Cocobacilo ancho, Gram negativo, oxidasa negativo que se desarrolla como aerobio estricto. Crece como saprófito ubicuo en la naturaleza y en el entorno hospitalario. Sobrevive en superficies húmedas, como los equipos de terapia respiratoria y en las superficies secas como la piel del ser humano (Dijkshoorn, 2008).

Es patógeno oportunista que puede llegar a producir infecciones de los aparatos respiratorio y urinario, y de heridas. Los pacientes con riesgo de contraer una infección por estas bacterias son los que reciben antibióticos de amplio espectro, que se encuentran en fase postoperatoria quirúrgica o los sometidos a ventilación mecánica (Dijkshoorn, 2008).

2. *Enterobacter cloacae*

Bacilo Gram negativo, oxidasa negativo y catalasa positivo presente en el aparato digestivo humano. Se han descrito casos de infecciones del tracto urinario, de herida quirúrgica e incluso bacteremia. No obstante, lo más frecuente son infecciones nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos (Rossi, Tokumoto, Galas, Sobonga, & Corso, 1996).

3. *Enterococcus durans* (grupo D)

Se localiza fundamentalmente en el tracto gastrointestinal. Constituye en la actualidad una causa importante de infecciones nosocomiales (infecciones urinarias, abscesos intraabdominales y pélvicos, infecciones de heridas, bacteriemias, endocarditis, etc.). Entre los factores de riesgo que favorecen la colonización o infección por *E. durans* se encuentran: terapia antibiótica previa, duración de la hospitalización y enfermedad grave subyacente. Presentan resistencia intrínseca a muchos antibióticos (Malani, Kauffman, & Zervos, 2002 y Quiñónes, Goni, Rubio, & Durán, 2005).

#### 4. *Escherichia coli*

Bacteria bacilo Gram negativo, móvil, anaerobio facultativo. Puede causar infecciones intestinales y extraintestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía Gram negativa. En su hábitat natural, vive en los intestinos de la mayor parte de los mamíferos sanos. Es el principal organismo anaerobio facultativo del sistema digestivo. En individuos sanos, es decir, si la bacteria no adquiere elementos genéticos que codifican factores virulentos, la bacteria actúa como un comensal formando parte de la flora intestinal y ayudando así a la absorción de nutrientes. En humanos, *E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal de un neonato adhiriéndose a las mucosidades del intestino grueso en el plazo de 48 horas después de la primera comida (Rossi y otros, 1996).

#### 5. *Klebsiella pneumoniae*

Es la especie de mayor relevancia clínica dentro del género bacteriano *Klebsiella* sp, compuesto por bacterias Gram negativo de la familia Enterobacteriaceae, que desempeñan un importante papel como causa de las enfermedades infecciosas oportunistas. Es el agente causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos, e infecciones de herida quirúrgica. Son especialmente susceptibles los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, neonatos, y pacientes con EPOC, diabetes *mellitus* o alcohólicos. Actualmente existe una teoría que la relaciona con la espondilitis anquilosante (Rossi y otros, 1996).

Causa alrededor del 1% de las neumonías bacterianas y puede causar condensación hemorrágica extensa del pulmón. Además, en ocasiones provoca infección del aparato urinario y bacteriemia a partir de lesiones focales en pacientes debilitados que puede terminar con la vida del paciente. Algunas de las complicaciones más frecuentes son el absceso pulmonar y el empiema (Rossi y otros, 1996).

#### 6. *Proteus mirabilis*

Bacteria Gram negativo, facultativamente anaeróbica, quien muestra aglutinación, motilidad, y actividad ureasa. Es causante del 90% de todas las infecciones por causada por el género *Proteus*. Esta bacteria de colonias redondeadas tiene la habilidad de producir grandes niveles de ureasa. Esta bacteria puede encontrarse en cálculos, y esas bacterias escondidas allí, pueden reiniciar una infección post tratamientos antibióticos. Al desarrollarse los cálculos, después de un tiempo pueden seguir creciendo más y causar obstrucción dando fallas renales. También puede producir infecciones de heridas, septicemia y neumonías, sobre todo en pacientes hospitalizados (Sergei, Esipov, & Shapiro, 2006).

#### 7. *Pseudomonas aeruginosa*

Bacteria Gram negativo, aeróbica, con motilidad unipolar. Es un patógeno oportunista en humanos y también en plantas que infecta el tracto pulmonar, el urinario, tejidos, heridas, y también causa otras infecciones de sangre. *P. aeruginosa* puede causar neumonías, necesitando a veces ayuda mecánica para superar dichas neumonías, siendo uno de los más comunes agentes aislados en muchos estudios (Ryan, & Ray, 2004).

#### 8. *Pseudomonas fluorescens*

Bacilo Gram negativo, móvil y aerobio estricto. Cepas de *P. fluorescens* han sido identificados como contaminantes de la piel de humanos y como los agentes causantes de pseudobacteremia e infecciones en pacientes hospitalizados. Por otra parte, se encuentra asociación con contaminación sanguínea y sus componentes, casos de osteomielitis, infecciones nosocomiales respiratorias y brotes de bacteriemia (Anderson, 1994 y De Lima, Patrick, Martino, Hule, & Blight, 2003).

#### 9. *Salmonella typhi*

Bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, móvil que se propaga a través de alimentos, agua y bebidas contaminadas causando fiebre tifoidea. La incidencia de esta enfermedad es alta en países en vías de desarrollo. En la mayoría de los casos, la infección por *S. typhi*,

no es letal si la terapia antimicrobiana se administra a tiempo. Muchas cepas han desarrollado multirresistencia a los antibióticos de elección (Thong, Cheong, Puthuchery, Koh, & Pang, 1994).

#### 10. *Serratia marcescens*

Bacilo Gram negativo patógeno que puede llegar a causar infecciones nosocomiales y urinarias. Puede provocar conjuntivitis, queratitis e infecciones en heridas, riñones y vías urinarias, así como infecciones respiratorias, meningitis y endocarditis. Esta bacteria afecta especialmente a pacientes hospitalizados y a pacientes que tienen la inmunidad disminuida por enfermedades sistémicas o tratamientos médicos inmunosupresores (Frénod, 2006).

En el año 1,950 se creía que *S. marcescens* no era patógena, y por eso, la utilizaban en experimentos los estudiantes o simulando pruebas biológicas para los militares de los Estados Unidos. Desde entonces, las infecciones causadas por esta bacteria han ido aumentando a la vez que la resistencia de ésta a los antibióticos. Pese a los nuevos descubrimientos y la cantidad de información que se tiene, esta bacteria ha causado en la historia dos epidemias y, hoy en día, aún es difícil de combatir (Frénod, 2006).

#### 11. *Shigella boydii*

Bacteria Gram negativo. Ocasiona diarrea en humanos; si bien existen antibióticos efectivos, algunas de sus cepas han desarrollado mecanismos de resistencia a antibióticos. Se transmite por la vía feco-oral (Ashkenazi, 1999).

#### 12. *Shigella flexneri*

Bacteria Gram negativo de la familia Enterobacteriaceae y pertenece al serotipo B de *Shigella*. Ocasiona diarrea en humanos; si bien existen antibióticos efectivos, algunas de sus cepas han desarrollado mecanismos de resistencia a antibióticos (Mota, Varela, Gadea, Caffer, Sirok, & Schelotto, 2005).

*S. flexneri* es la causa más común de shigelosis en el mundo. La gravedad de la enfermedad es variable dependiendo de la salud subyacente y edad de la persona. La infección generalmente se produce a través de la vía fecal-oral, produciéndose con mayor facilidad si no se tienen las medidas higiénicas adecuadas. Algunos pacientes infectados son asintomáticos y son los más propensos a transmitir la infección a otras personas. (Ashkenazi, 1999).

### 13. *Staphylococcus aureus*

Coco Gram positivo que se agrupa en racimos, posee tolerancia a la sal y es muy resistente a las condiciones ambientales. Es un agente patogénico que actúa como un microorganismo saprófito, se encuentra en la piel del individuo sano pero en ocasiones en que las defensas de la piel caen puede causar enfermedad. El principal grupo de riesgo son pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos. Cerca de 2 mil millones de personas han sido colonizadas mundialmente por este microorganismo (Bannerman, 2003 y Richardson, Libby & Fang, 2008).

*S. aureus* posee una enzima, la coagulasa, que los diferencia del resto de las especies del género; esta tiene la facultad de reaccionar con el fibrinógeno dando lugar a un coágulo de fibrina. Además posee una resistencia mediante una beta lactamasa inducible que le confiere resistencia ante la penicilina, esta beta lactamasa está codificada en un plásmido presente en más del 90% de las cepas (Bannerman, 2003 y Richardson y otros, 2008).

### 14. *Staphylococcus auricularis*

Pertenece al grupo de estafilococos coagulasa negativo que son habitantes normales de la piel humana y las membranas mucosas. Se ha asociado a endocarditis, infecciones de herida y del tracto urinario. Desde 1979, es reconocido como agente etiológico de una amplia variedad de infecciones (Bannerman, 2003).

### 15. *Staphylococcus epidermidis*

Bacteria saprófita de la piel que ha surgido como patógeno nosocomial causando infecciones en pacientes inmunodeprimidos. Se ha aislado de biopelículas sobre superficies inertes. Presenta aislamientos con resistencia antimicrobiana múltiple nosocomial (Bannerman, 2003 y Ziebuhr, 2006).

Actualmente *S. epidermidis* es el patógeno intravascular predominante en infecciones relacionadas con catéteres, bacteremia nosocomial, endocarditis, vías urinarias, heridas quirúrgicas, infecciones del sistema nervioso central, infecciones oftalmológicas, infecciones relacionadas a diálisis peritoneal y las infecciones de prótesis articulares (Bannerman, 2003, Ziebuhr, 2001 y Ziebuhr, 2006).

### 16. *Staphylococcus haemolyticus*

Bacteria coco Gram positivo. Está asociada a bacteriemia y se ha implicado en endocarditis sobre válvula natural, infecciones del tracto urinario, bacteriemia de origen en el catéter y osteomielitis (Archer, & Climo, 1994).

*S. haemolyticus* se ha implicado en endocarditis de válvula nativa (EVN), septicemia, infecciones del tracto urinario, peritonitis, heridas, infecciones óseas y articulares (Bannerman, 2003 y Archer, & Climo, 1994).

### 17. *Staphylococcus simulans*

Es una especie bacteriana del género *Staphylococcus*, consistente en cocos Gram positivo arreglados en grupos. Es catalasa positivo, termonucleasa negativo, coagulasa negativo que se presenta frecuentemente en la piel de humanos y animales y en membranas mucosas. Es una de las causas menos común en infecciones oportunistas (Archer, & Climo, 1994).

## **H. Técnicas para determinar actividad antimicrobiana**

Se entiende por tamizaje a una serie de ensayos biológicos (bioensayos) generalmente *in vitro* que dan una idea preliminar de la posible bioactividad de un extracto crudo, fracción

purificada o principio activo puro. Las técnicas de tamizaje pretenden orientar al investigador con técnicas relativamente sencillas, que no involucren animales, que tengan bajo costo y que puedan realizarse un número grande de muestras en forma rápida, sencilla y reproducible (Ríos, Recio, & Villar, 1988).

Estas técnicas se utilizan para evaluar la actividad inhibitoria de una planta o sus derivados, la potencia de un compuesto, la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas de una droga vegetal, el espectro de microorganismos inhibidos y la concentración de la droga en el organismo humano. Para evaluar la actividad es preciso conocer el modelo microbiano perfectamente y tenerlo controlado en las condiciones de laboratorio, ya sea procedimientos *in vitro* o *in vivo* (Ríos y otros, 1988).

En 2008, Elisa concluye que el método de dilución en agar es el más utilizado debido a la simplicidad de implementación y bajo costo, destacando además, la importancia de evaluar los factores que interfieren, el establecimiento de parámetros de acuerdo al método utilizado a la necesidad, es por ello que se eligió este método para el estudio (Elisa, 2008).

La medición de esta actividad se puede realizar por medio de diferentes métodos, que son el de difusión, dilución, bioautografía, E-test y automatizado (Elisa, 2008).

#### 1. Método de difusión en agar

Tiene la característica de no requerir una dispersión homogénea en agua del extracto a probar, se utiliza un disco, agujero o un reservorio cilíndrico. El reservorio que contiene la muestra a probar se pone en contacto con un medio inoculado y después del período de incubación, el diámetro de la zona clara alrededor del reservorio (diámetro de inhibición) es medido. Este método fue originalmente diseñado para monitorear la cantidad de sustancias con características de antibióticos presentes en extractos crudos. A diferencia del método de difusión, el de dilución requiere de una dispersión homogénea de la muestra en agua. Se utiliza para determinar principalmente, la CIM de extractos, aceites esenciales y sustancias puras, además pueden utilizarse como tamizaje preliminar de actividad antimicrobiana.

Los métodos de difusión son muy utilizados en la investigación a pesar de ciertas dificultades, puesto que son modelos de baja credibilidad para muestras que sean de difícil difusión en el medio no existiendo relación entre el poder de difusión y la actividad antimicrobiana (Knapp & Moody, 1992).

La determinación de la actividad antimicrobiana puede dividirse en dos fases: tamizaje y CIM. Este último procedimiento se realiza únicamente con los microorganismos cuyo crecimiento fue inhibido por el extracto en la primera fase. Estos procedimientos emplean la dilución de los extractos en el agar indicado para el tipo de microorganismos a ensayar, inoculándolos en la superficie del medio según un patrón determinado (Ellisa, 2008).

## 2. Método de dilución en agar

En este método, una cantidad definida de muestra es mezclada con agar nutritivo. La ventaja de este método es la simplicidad y la rapidez así como la posibilidad de usarla en estudios antimicrobianos de muestras solubles e insolubles en agua como los aceites esenciales. Pueden manejarse seis microorganismos en cajas de Petri y se interpreta como resultado positivo a la ausencia del crecimiento característico de cualquiera de estos. El método de dilución en agar es aplicable tanto a muestras de característica polar como apolar (Peterson, & Schanholtzer, 1992).

Las ventajas de las pruebas de dilución en agar incluyen la reproducibilidad de los resultados y el crecimiento satisfactorio de la mayoría de organismos no fastidiosos. Sin embargo, sus desventajas incluyen el trabajo requerido para preparar las placas de dilución en agar y su relativamente corto tiempo de almacenamiento. Generalmente las pruebas de dilución en agar no se realizan en laboratorios clínicos de rutina pero pueden ser ideales para laboratorios regionales de referencia o laboratorios de investigación que deben analizar un gran número de cepas (Ríos y otros, 1988).

### 3. Método autobiográfico

Es el método más importante de detección para compuestos antimicrobianos nuevos o no identificados relacionado con los efectos antibacterianos, antiprotozoos, antitumorales, etc. que estos producen. Consiste en un procedimiento basado en una técnica de difusión en agar, en donde el compuesto antibacteriano transferido de una capa cromatográfica e inoculado en una placa con agar, se logran visualizar las zonas de inhibición por la actividad de la deshidrogenasa que es demostrada por los reactivos utilizados (Pinto, 2003).

### 4. Método de dilución en caldo

En este tipo de método, tubos (macrodilución) o microplacas (microdilución) contienen concentraciones crecientes de un determinado antibiótico o planta. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pocillos de la microplaca y la CIM es determinada después de la incubación. Este método se ha convertido en la base de casi todos los métodos utilizados en la actualidad. El caldo más comúnmente usado para estas pruebas es el de Mueller-Hinton suplementado con los cationes magnesio y calcio (Ellisa, 2008).

El método de dilución en caldo considera la relación entre la proporción de crecimiento de microorganismos en estudio en medio líquido y la concentración de la sustancia de prueba. La evaluación se compara con un estándar biológico de referencia. El método proporciona resultados cuantitativos y no influidos por la tasa de crecimiento de microorganismos. Entre sus desventajas se encuentra la dificultad de detección de contaminación de los materiales de ensayos clínicos (Pinto, 2003).

### 5. 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 horas, se forma un área de inhibición de forma elíptica, en la cual la CIM

puede ser leída directamente. Este es el método de elección para hacer estudios de susceptibilidad en microorganismos problemáticos o con requerimientos especiales, como por ejemplo *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Haemophilus influenzae* y microorganismos anaeróbicos (Amsterdan, 1996).

#### 6. Métodos automatizados

Existen varios sistemas que ofrecen diferentes niveles de automatización para el estudio de susceptibilidad. Utilizan una medición turbidimétrica o fluorométrica para detectar crecimiento bacteriano en un medio líquido. La mayoría de ellos emplea el método de microdilución y períodos de incubación menores que los habituales. Estos métodos son bastante confiables para el estudio de enterobacterias y otros microorganismos de crecimiento rápido, pero generalmente no son los adecuados para los de crecimiento lento o con requerimientos especiales (Ríos y otros, 1988 y Ellisa, 2008).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

La resistencia de los microorganismos a los distintos antibióticos es ocasionada por diversos factores como: uso indiscriminado de antibióticos, suspensión del tratamiento, no acceso a resultados de antibiogramas para un mejor tratamiento, lo que genera la creación de mutaciones e intercambios genéticos entre diferentes especies, elevando a la resistencia.

Esto ha originado la pérdida de efectividad de los antibióticos a diferentes microorganismos patológicos, dando como resultado infecciones prolongadas, elevados índices de mortalidad y mayores costos en el cuidado de la salud por lo que se hace necesario investigar alternativas terapéuticas que sean accesibles, seguras, económicas y eficaces para que puedan actuar de forma directa sobre la actividad antimicrobiana.

En el presente estudio, se comparó la actividad antimicrobiana conocida en estudios previos de cepas bacterianas ATCC con respecto a cepas bacterianas aisladas de muestras clínicas, debido a que las cepas bacterianas ATCC tienen las características de ser material biológico de referencia certificada, de cultivo puro, estables, con pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares conocidas por lo que es importante realizar este tipo de ensayos y comparar la eficacia de las plantas con actividad antimicrobiana *in vitro* demostrada en cepas bacterianas ATCC.

## V. OBJETIVOS

### A. General

Determinar el espectro de inhibición de extractos etanólicos de cinco plantas con actividad antimicrobiana demostrada previamente sobre aislamientos de bacterias de origen clínico.

### B. Específicos

1. Evaluar la resistencia antimicrobiana de los aislamientos de cepas de bacterias Gram positivo y Gram negativo provenientes de muestras clínicas.
2. Comparar por medio de tamizaje *in vitro* la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de plantas medicinales con actividad antimicrobiana demostrada en cepas ATCC contra las cepas de las bacterias aisladas de muestras clínicas.
3. Evaluar la concentración mínima inhibitoria de los extractos etanólicos activos de plantas medicinales con actividad antimicrobiana demostrada contra las cepas en estudio.
4. Aportar una base científica para el uso posterior de las plantas medicinales que presenten actividad antimicrobiana.

## **VI. HIPÓTESIS**

El espectro de inhibición de los extractos etanólicos sobre las cepas de bacterias aisladas de muestras clínicas es diferente al que presentan sobre cepas de bacterias certificadas ATCC.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Universo

Plantas que han demostrado actividad antimicrobiana *in vitro* y bacterias causantes de infecciones gastrointestinales, respiratorias y de la piel.

### B. Muestra

Extracto etanólico de *B. crassifolia*, *L. guatemalensis*, *P. guajava*, *S. mexicana* y *S. glauca*.

17 cepas de bacterias poco frecuentes aisladas de muestras clínicas: *A. calcoaceticus-baumannii*, *E. cloacae*, *E. coli*, *E. durans* (grupo D), *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *S. auricularis*, *S. boydii*, *S. epidermidis*, *S. flexneri*, *S. haemolyticus*, *S. marcescens*, *S. simulans* y *S. typhi*.

### C. Recursos

#### 1. Humanos

Tesista: Br. Gilma Nataly del Carmen Torres Hernández

Asesor: Lic. Armando Cáceres Estrada

Revisora: Licda. Ana Margarita Paz

Revisora: Licda. Rosario Hernández

#### 2. Físicos

##### a. Materiales

##### i. Medios y disolventes

- Etanol al 50% y 95%.
- Agua destilada
- Agar Müeller Hinton
- Agar Tripticasa Soya
- Caldo Tripticasa Soya
- Solución salina al 0.85%

ii. Equipo, instrumentos, cristalería

- Balanza analítica
- Autoclave
- Refrigerador
- Incubadora
- Mechero
- Agitador magnético
- Estufa
- Campana microbiológica
- Vórtex o mezclador
- Tubos de vidrio con tapón de rosca
- Tubos estériles con tapón de rosca de 15 ml
- Eppendorf
- Pipetas serológicas
- Pipeta graduada
- Erlenmeyer de 250 a 500 ml
- Cajas de Petri de 15 mm
- Algodón
- Asa de microbiológica en argolla
- Parafilm
- Marcador Permanente
- Vitek® (Equipo Automatizado)

iii. Microorganismos seleccionados (muestras clínicas)

- *A. calcoaceticus-baumannii* (complejo) (sangre)
- *E. cloacae* (catéter)
- *E. durans* (grupo D) (herida quirúrgica)
- *E. coli* (orina, cultivo de rutina)
- *K. pneumoniae* (catéter)
- *P. mirabilis* (orina)

- *P. aeruginosa* (catéter)
- *P. fluorescens* (aspirado traqueal)
- *S. typhi* (vagina)
- *S. marcescens* (sangre)
- *S. boydii* (vagina)
- *S. flexneri* (vagina)
- *S. aureus* (secreción, cultivo de rutina)
- *S. auricularis* (sangre)
- *S. epidermidis* (médula ósea)
- *S. haemolyticus* (catéter)
- *S. simulans* (sangre)

iv. Extractos etanólicos secos de plantas seleccionadas

- *B. crassifolia* (hoja y corteza)
- *L. guatemalensis* (hoja)
- *P. guajava* (hoja)
- *S. mexicanus* (hoja)
- *S. glauca* (hoja)

## **D. Metodología**

### 1. Selección de bacterias y plantas

Las muestras que se utilizaron son 17 aislamientos clínicos, tanto Gram positivo como Gram negativo, de pacientes del Hospital Roosevelt y de LABOCLIP, debidamente identificadas y con su patrón de resistencia obtenido por medio del equipo automatizado Vitek®. El número de bacterias fue tomado por conveniencia debido a que el estudio es únicamente descriptivo.

Se eligieron cinco especies de plantas utilizadas popularmente por la población, las cuales en estudios previos han demostrado presentar actividad inhibitoria contra agentes causales

de infecciones observadas comúnmente en la población guatemalteca. Dichos extractos han sido efectivos en cepas bacterianas ATCC de *S. typhi*, *S. flexneri*, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* (Morton, 1981, Cáceres y otros, 1990, Cáceres, Figueroa, Taracena, & Samayoa, 1993 y Cruz, Cáceres, Medinilla, Paredes, García, Letrán, & Orozco, 2008). Los extractos fueron obtenidos de la colección del Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

## 2. Tamizaje de la actividad antibacteriana *in vitro*

### a. Preparación agar-planta

Se disolvieron 30 mg del extracto en 3 ml de etanol al 50% y se filtró. Se prepararon tubos con 9.0 ml de agar Müeller Hinton (2 por cada extracto), se esterilizaron a 121°C por 15 minutos y enfriaron a 50°C. En caja de Petri, se agregó 1.0 ml de solución del extracto filtrado ([10 mg/ml]) y los 9.0 ml de agar Müeller Hinton. Se tapó la caja y se homogeneizó. La concentración final fue de 1 mg/ml. Luego, se solidificó e incubó a 36°C por 24 horas, posteriormente se comprobó la esterilización y finalmente se refrigeró (Paz, 1998).

### b. Preparación del inóculo

Se purificaron microorganismos a ensayar inoculándolos en caja de Petri con agar Trypticase Soya. Se incubaron por 24 horas a 36°C. Se inoculó una asada de cultivo puro microbiológico en tubo con 5.0 ml de caldo de Trypticase Soya, se incubó a 36°C por 24 horas. Se diluyeron 0.05 ml de la suspensión anterior en 4.95 ml de solución salina estéril al 85% (dilución 1:100) (Paz, 1998).

### c. Demostración de la actividad antibacteriana

Se inocularon en cajas de agar-planta una asada de cada uno de los microorganismos siguientes en el patrón de la plantilla. Se hicieron cuatro repeticiones por microorganismo. Se dejó reposar por 5 a 10 minutos e incubó a 36°C por 24 horas. Se usó como control negativo 9.0 ml de agar Müeller Hinton mezclado con 1.0 ml de etanol al 50% (Paz, 1998).

d. Interpretación de resultados

Crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo: actividad negativa.

No hubo crecimiento a lo largo del inóculo: actividad positiva.

Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación (Paz, 1998)

3. CIM

a. Preparación agar-planta

Se prepararon tubos con 3.6, 3.8, 3.9 y 4.0 ml de agar Müeller Hinton. Se esterilizaron a 121°C por 15 minutos, se enfriaron a 50°C y agregaron solución extracto disuelto ([10 mg/ml]) en caja cuadrilate de la siguiente manera:

3.6 ml de agar + 0.4 de solución extracto = 1 mg/ml

3.8 ml de agar + 0.2 de solución extracto = 0.5 mg/ml

3.9 ml de agar + 0.1 de solución extracto = 0.25 mg/ml

Un cuadrante con 4.0 ml de agar para control negativo.

Luego, se solidificó, se incubó a 36°C por 24 horas, se comprobó esterilidad y se refrigeró (Paz, 1998).

b. Demostración de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Se inocularon 3 estrías en cada uno de los cuadrantes de la caja, se dejó reposar por 5 a 10 minutos e incubaron a 36°C por 24 horas (Paz, 1998).

c. Interpretación de resultados

Crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo: actividad negativa.

No hay crecimiento a lo largo del inóculo: actividad positiva.

Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación (Paz, 1998).

### **E. Diseño experimental**

Se utilizó una distribución binomial, en donde se consideró que un extracto es bioactivo cuando inhiba cualquiera de los microorganismos que se utilicen a una concentración 1 mg/ml (Spiegel, 1991).

El diseño experimental fue totalmente al azar con cuatro réplicas para cada tratamiento; las unidades experimentales fueron las bacterias y los tratamientos los extractos (Spiegel, 1991).

El análisis de la prueba de hipótesis binomial fue a un nivel de  $\alpha=0.10$  de la siguiente manera:

$$H_0: p \leq q \rightarrow p \leq 0.5 \text{ (no tiene efecto)}$$

$$H_a: p > q \rightarrow p > 0.5 \text{ (sí tiene efecto)}$$

Con cuatro réplicas, se espera que para rechazar  $H_0$ , se tenga los cuatro éxitos (inhibición).

Para la CIM, el diseño y análisis es el mismo, el cual fue realizado a las cepas que fueron inhibidas en la fase de tamizaje, probando a 1.0, 0.5 y 0.25 mg/ml de diluciones.

## VIII. RESULTADOS

En el presente estudio se utilizaron 17 bacterias Gram positivo y Gram negativo provenientes de aislamientos clínicos de pacientes del Hospital Roosevelt y de LABOCLIP, debidamente identificadas y se enfrentaron a extractos etanólicos provenientes de cinco especies de plantas usadas popularmente por la población que han presentado actividad antimicrobiana contra cepas certificadas ATCC.

En la Tabla 1 se describe la familia, nombre científico, nombre común, parte de la planta y tipo de disolvente utilizado en el estudio.

**Tabla 1.** Características generales de las plantas utilizadas en el estudio

<b>Familia</b>	<b>Nombre científico</b>	<b>Nombre común</b>	<b>Parte planta</b>	<b>Disolvente</b>
Malpighiaceae	<i>Byrsonima crassifolia</i>	Nance	Hoja y corteza	Etanol
Lauraceae	<i>Litsea guatemalensis</i>	Laurel	Hoja	Etanol
Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i>	Guayaba	Hoja	Etanol
Caprifoliaceae	<i>Sambucus mexicana</i>	Sauco	Hoja	Etanol
Simaroubaceae	<i>Simarouba glauca</i>	Jocote de mico	Hoja	Etanol

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

En la Tabla 2 se presenta el patrón de resistencia de las bacterias de aislamientos clínicos del grupo Gram positivo obtenido experimentalmente, donde se observa que la bacteria evaluada que presenta mayor resistencia es *E. durans* y la que presenta menor resistencia es *S. epidermidis*. Este grupo de bacterias mostró mayor resistencia frente a tetraciclina y menor resistencia a vancomicina.

**Tabla 2.** Patrón de resistencia encontrado en las bacterias Gram positivo aisladas de muestras clínicas del estudio.

<b>Bacteria</b>	<b>Antibiótico</b>					
	<b>Va</b>	<b>Amp</b>	<b>Est</b>	<b>Cip</b>	<b>Te</b>	<b>Gen</b>
<i>Enterococcus durans</i>	S	R	R	S	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	S	R	R
<i>Staphylococcus auricularis</i>	S	I	S	R	R	S
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	R	S	S	I	I
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	S	S	R	R	R	I
<i>Staphylococcus simulans</i>	S	S	I	S	R	R

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

R: Resistente; S: Susceptible; I: Intermedio

Va: Vancomicina; Amp: Ampicilina; Est: Estreptomicina; Te: Tetraciclina; Gen: Gentamicina; Cip: Ciprofloxacina.

En la Tabla 3 se presenta el patrón de resistencia de las bacterias de aislamientos clínicos del grupo Gram negativo obtenido experimentalmente, donde se observa que las bacterias evaluadas que presentan mayor resistencia son *E. cloacae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. boydii*. Este grupo de bacterias mostró mayor resistencia frente a gentamicina y menor resistencia a ceftriaxona.

**Tabla 3.** Patrón de resistencia encontrado en las bacterias Gram negativo aisladas de muestras clínicas del estudio.

Bacteria	Antibiótico					
	Ctx	Caz	Cro	Imi	Cip	Gen
<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i>	R	I	S	S	R	R
<i>Enterobacter cloacae</i>	S	R	R	S	S	R
<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	S	I	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	I	I	S	I	R	R
<i>Proteus mirabilis</i>	R	S	S	I	R	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	S	R	I	S	R
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	S	R	S	S	S	R
<i>Salmonella typhi</i>	I	I	S	I	S	R
<i>Serratia marcescens</i>	S	R	S	S	S	R
<i>Shigella boydii</i>	R	R	S	I	S	R
<i>Shigella flexneri</i>	R	I	I	I	S	S

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

R: Resistente; S: Susceptible; I: Intermedio

Ctx: Cefotaxime; Caz: Ceftazidime; Cro: Ceftriaxona; Imi: Imipenem; Cip: Ciprofloxacina; Gen: Gentamicina;

En la Tabla 4 se presentan los resultados obtenidos experimentalmente en el tamizaje antimicrobiano de 17 aislamientos de cepas bacterianas clínicas contra los extractos etanólicos de *B. crassifolia*, *L. guatemalensis*, *P. guajava*, *S. mexicana* y *S. glauca*. El extracto que presentó actividad antimicrobiana en mayor número de bacterias fue el de *P. guajava* y en menor número el extracto de *S. mexicana*.

**Tabla 4.** Actividad antimicrobiana de bacterias aisladas de muestras clínicas por los extractos etanólicos de plantas a una concentración de 1 mg/ml.

<b>Bacteria</b>	<b>Agar</b>	<b>Agar</b>	<b>Agar</b>	<b>Agar</b>	<b>Agar</b>	<b>Agar</b>
	<b>Planta 1</b>	<b>Planta 2</b>	<b>Planta 3</b>	<b>Planta 4</b>	<b>Planta 5</b>	<b>Planta 6</b>
<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	+	+	+	-
<i>Enterococcus durans</i>	-	-	+	+	-	+
<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	-	+	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	+	-	+	+	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	-	+	-	-
<i>Shigella boydii</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Staphylococcus auricularis</i>	-	+	+	+	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	+	-	+	-	+
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+	+	-	-	-	-
<i>Staphylococcus simulans</i>	+	-	+	+	-	-

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

(+) Actividad inhibitoria positiva: Ausencia de microorganismo homogéneo a lo largo del inóculo (n=4, valor de significancia p=0.0313)

(-) Actividad inhibitoria negativa: Crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.

Agar Planta 1: *Byrsonima crassifolia* (corteza); Agar Planta 2: *Byrsonima crassifolia* (hoja); Agar Planta 3: *Litsea guatemalensis* (hoja); Agar Planta 4: *Psidium guajava* (hoja); Agar Planta 5: *Sambucus mexicana* (hoja); Agar Planta 6: *Simauroba glauca* (hoja)

En la Tabla 5 se presenta la concentración mínima inhibitoria de los extractos evaluados en el estudio frente a cepas bacterianas certificadas ATCC demostrada en estudios previos. El extracto de *B. crassifolia* presenta CIM desde 2.50 hasta 40 µg/mL y el extracto de *P. guajava* de 15, 10 y 5 µg/mL.

**Tabla No. 3:** Concentración inhibitoria mínima de extractos con actividad antimicrobiana demostrada en principales cepas certificadas ATCC de estudios previos (µg/mL)

Bacteria	Agar	Agar	Agar	Agar	Agar	Referencias*
	Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 4	Planta 5	
<i>Escherichia coli</i> 25922	40.00 <sup>a</sup>	ND	15.00 <sup>b</sup>	13.00 <sup>**c</sup>	ND	<sup>a</sup> Navarro, <i>et al.</i> (1996)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883	2.50 <sup>d∞</sup>	ND	ND	ND	ND	<sup>b</sup> Pesewu, <i>et al.</i> (2008)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027	10.00 <sup>e</sup>	0.25 <sup>f∞</sup>	10.00 <sup>b</sup>	ND	6.85 <sup>**c</sup>	<sup>c</sup> Rojas, <i>et al.</i> (2003)
<i>Salmonella typhi</i> 13310	>10.00 <sup>d</sup>	1.00 <sup>e</sup>	ND	ND	ND	<sup>d</sup> Martínez, <i>et al.</i> (1999)
<i>Shigella flexneri</i> 1202	>10.00 <sup>g</sup>	ND	ND	>10.00 <sup>g</sup>	ND	<sup>e</sup> Cáceres, <i>et al.</i> (1988)
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	10.00 <sup>a</sup>	1.00 <sup>e∞</sup>	5.00 <sup>h</sup>	ND	7.00 <sup>i</sup>	<sup>f</sup> Cruz., <i>et al.</i> (2008)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 12228	2.50 <sup>c∞</sup>	ND	ND	ND	ND	<sup>g</sup> Cáceres, <i>et al.</i> (1993)
						<sup>h</sup> Cáceres, <i>et al.</i> (1991)
						<sup>i</sup> Álvarez y Cáceres (1988)

Fuente: Ver referencias\*

Agar Planta 1: *Byrsonima crassifolia* (Corteza); Agar Planta 2: *Litsea guatemalensis* (Hoja); Agar Planta 3: *Psidium guajava* (Hoja); Agar Planta 4: *Sambucus mexicana* (Hoja); Agar Planta 5: *Simbauroba glauca* (Hoja)

\*\* : Halo de inhibición en mm

∞ : mg/mL

ND: No hay datos

A los extractos etanólicos que presentaron actividad antimicrobiana contra los aislamientos de bacterias aisladas de muestras clínicas se les determinó la concentración mínima inhibitoria. Se puede observar que los extractos etanólicos más eficientes *P. guajava* y *B. crassifolia* presentaron una CIM de 0.50 -1.00 mg/mL.

**Tabla 6.** Concentración inhibitoria mínima de extractos con actividad antimicrobiana positiva en las bacterias aisladas de muestras clínicas del estudio (mg/mL).

<b>Bacteria</b>	<b>Agar</b>	<b>Agar</b>	<b>Agar</b>	<b>Agar</b>	<b>Agar</b>	<b>Agar</b>
	<b>Planta 1</b>	<b>Planta 2</b>	<b>Planta 3</b>	<b>Planta 4</b>	<b>Planta 5</b>	<b>Planta 6</b>
<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i>	-	0.50	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	0.50	1.00	1.00	0.50	-
<i>Enterococcus durans</i>	-	-	1.00	1.00	-	0.50
<i>Escherichia coli</i>	-	1.00	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	0.50	0.50	-	1.00	-	0.50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	1.00	-	1.00	1.00	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	1.00	0.50	-	1.00	-	-
<i>Shigella boydii</i>	-	-	-	1.00	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	1.00	-	-
<i>Staphylococcus auricularis</i>	-	0.50	0.50	0.50	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	0.50	-	1.00	-	1.00
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1.00	0.50	-	-	-	-
<i>Staphylococcus simulans</i>	0.50	-	1.00	1.00	-	-

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Actividad inhibitoria positiva (n=4, valor de significancia p=0.0313)

(-): No presentaron actividad antimicrobiana en el tamizaje

Agar Planta 1: *Byrsonima crassifolia* (corteza); Agar Planta 2: *Byrsonima crassifolia* (hoja); Agar Planta 3: *Litsea guatemalensis* (hoja); Agar Planta 4: *Psidium guajava* (hoja); Agar Planta 5: *Sambucus mexicana* (hoja); Agar Planta 6: *Simauroba glauca* (hoja)

## IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio se determinó el espectro de inhibición de extractos etanólicos de cinco especies vegetales con actividad antimicrobiana sobre 17 bacterias obtenidas de aislamientos clínicos. Las plantas ensayadas fueron *B. crassifolia*, *L. guatemalensis*, *P. guajava*, *S. mexicana* y *S. glauca* (Cuadro 1).

Las cepas de bacterias aisladas de muestras clínicas se obtuvieron del Hospital Roosevelt y LABOCLIP, se les identificó y realizó el antibiograma a cada muestra utilizando el método automatizado Vitek®. La metodología utilizada en el estudio para el tamizaje y CIM fue por dilución en agar a una concentración de 1 mg/mL. En el ensayo, el control positivo y negativo presentaron el patrón de crecimiento esperado, por lo que el método fue validado. Los extractos etanólicos estudiados que presentaron actividad inhibitoria en la fase de tamizaje y en CIM, tienen un valor de significancia de  $p=0.0313$ , es decir, que de la población que se extrajo la muestra no hay suficiente evidencia para aceptar la hipótesis nula, que indica que los extractos no tienen alguna actividad inhibitoria (la probabilidad que el efecto observado sea al azar es 0.0313).

La bacteria Gram positivo que presentó mayor resistencia es *E. durans* y la que presentó menor resistencia es *S. epidermidis* (Cuadro 2). Este grupo de bacterias evaluadas presentó mayor resistencia frente a tetraciclina, que puede ser debido a la resistencia generada por el mecanismo de eflujo, el cual ocasiona disminución de las concentraciones intracelulares de la droga, o cambios en la permeabilidad de la membrana bacteriana (Franfe & Neu, 1987, Goodman & Gilman, 1990). No hubo resistencia por parte de los microorganismos frente al antibiótico vancomicina.

Las bacterias Gram negativo presentaron resistencia antimicrobiana frente a gentamicina (Cuadro 3). Contra imipenem no hubo resistencia en las bacterias evaluadas, que pudo deberse a que no se conoce hasta el momento resistencia natural ni adquirida hacia este tipo de antibiótico (Pitout, 2002).

Los mecanismos de la resistencia varían de acuerdo al antibiótico, desde inhibición enzimática, bloqueo del lugar donde actúa, bloqueo de la enzima blanco, alteraciones de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana, eliminación de etapas en la producción de componentes bacterianos, superproducción de la enzima o enzimas blanco (Organización Panamericana de la Salud, 2004).

La importancia de evaluar a las bacterias aisladas de muestras clínicas radica en su alta resistencia natural a múltiples antimicrobianos y a su capacidad de adquirir resistencia a otros, en donde podría quedar una o ninguna alternativa de tratamiento en infecciones severas. Los patrones de resistencia pueden ayudar a ver las tendencias de los microorganismos hacia la resistencia de algún tipo de antibiótico o familias de antibióticos y éste se debe tomar en cuenta como referencia para dar un tratamiento más rápido y efectivo hacia algún tipo de microorganismo.

La fase de tamizaje de las bacterias aisladas de muestras clínicas muestra que los extractos etanólicos más eficientes son la hoja de *P. guajava* y la hoja de *B. crassifolia*, mientras que el extracto etanólico menos eficiente es la hoja de *S. mexicana* (Cuadro 4). En el grupo de bacterias Gram positivo, el extracto etanólico que tuvo mayor actividad inhibitoria es la hoja de *P. guajava* y en el grupo de bacterias Gram negativo es la hoja de *B. crassifolia* (Cuadro 4). Las bacterias aisladas de muestras clínicas que fueron inhibidas por los extractos etanólicos del estudio son *E. cloacae*, *P. mirabilis*, *E. durans*, *P. fluorescens* y *S. epidermidis* y las bacterias que no fueron inhibidas por ningún extracto etanólico del estudio son *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. typhi* y *S. flexneri* (Cuadro 4). Como se puede observar, *P. aeruginosa* posiblemente no fue inhibido por ningún extracto etanólico, porque previamente ya había demostrado multirresistencia frente a los antibióticos evaluados.

La actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de la hoja de *P. guajava* y de la hoja de *B. crassifolia* puede deberse a los metabolitos secundarios presentes en los extractos de

las plantas, como los flavonoides y taninos, los cuales son compuestos polares, que los hace más permeables a la pared celular bacteriana, permitiendo el paso de sustancias a su interior, donde las bacterias pierden la capacidad del balance electrolítico y les ocasionan la muerte. Además, existen numerosos factores que afectan al contenido de los metabolitos de los vegetales, como el grado de maduración en el momento de la cosecha, factores medioambientales, edáficos (exposición solar, pluviometría, etc.), de procesado y almacenamiento. (Pandey & Rizvi, 2009). En varias especies vegetales los flavonoides varían sustancialmente entre genotipos, cambios estacionales, edades y daños de la hoja y sitios de ubicación (Kause, *et al.*, 1999; Keinanem, *et al.*, 1999; Laitenen, *et al.*, 2000). No se conoce el mecanismo de acción de los extractos activos ya que aún no se ha estudiado el compuesto puro de cada extracto al que se le pueda atribuir la actividad en forma precisa, volviéndose una desventaja en el uso de plantas, a causa de la falta de uniformidad en sus principios químicos (Gracia, Correa, & Rojas, 1995).

Los extractos etanólicos más eficientes frente las bacterias aisladas de muestras clínicas del estudio son *P. guajava* y *B. crassifolia* (Cuadro 4). El extracto etanólico de la hoja de *P. guajava* frente a la cepa ATCC 25922 de *E. coli* y de la cepa ATCC 9027 de *P. aeruginosa*, presentó actividad inhibitoria, a diferencia que frente a las bacterias estudiadas no presentó inhibición (Cuadro 5). El extracto etanólico de la hoja de *B. crassifolia* frente a la cepa ATCC 9027 de *P. aeruginosa* y la cepa ATCC 25923 de *S. aureus* presentó actividad inhibitoria, no teniendo actividad frente a las bacterias del estudio (Cuadro 5). Por lo tanto, se puede decir que el espectro de inhibición de los extractos etanólicos utilizados en este estudio afecta más frecuentemente a las cepas bacterianas ATCC que a las bacterias obtenidas de aislamientos clínicos.

El extracto etanólico de la hoja de *P. guajava* (agar planta 4), presentó CIM de 1.00 mg/mL, en 9 de 10 bacterias y 0.50 mg/mL sólo frente a *S. auricularis* (Cuadro 6). El extracto etanólico de la hoja de *B. crassifolia* (agar planta 2), presentó CIM de 0.5 mg/mL, en 7 de 9 bacterias y 0.50 mg/mL frente a *E. coli* y *P. fluorescens* (Cuadro 6). Debido a que la CIM que presentaron los extractos etanólicos más efectivos es muy alta, éstos sólo se

validan para uso popular, ya que a estas concentraciones es inviable para uso industrial y para el desarrollo de medicamento de uso terapéutico.

## X. CONCLUSIONES

1. La bacteria Gram positivo que presentó mayor resistencia frente a los antibióticos evaluados, principalmente Tetraciclina, es *E. durans*.
2. Las bacterias Gram negativo que presentaron mayor resistencia frente a los antibióticos evaluados, principalmente Gentamicina, fueron *E. cloacae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. boydii*.
3. Los extractos etanólicos más efectivos encontrados en este estudio fueron el de la hoja de *P. guajava* y la hoja de *B. crassifolia*.
4. Las especies que no fueron inhibidas por ningún extracto etanólico en este estudio fueron *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. typhi* y *S. flexneri*.
5. La CIM encontrada en los extractos etanólicos más efectivos de la hoja *P. guajava* y la hoja de *B. crassifolia* fueron de 0.50-1.00 mg/mL.
6. Las cepas bacterianas ATCC son más sensibles frente a los extractos etanólicos utilizados en comparación con las bacterias evaluadas obtenidas de aislamientos clínicos.

## XI. RECOMENDACIONES

1. Realizar pruebas de fraccionamiento bioseriado para identificar los componentes y mecanismos de acción de los extractos con actividad antimicrobiana.
2. Realizar estudios de la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales de *P. guajava* y *B. crassifolia* en modelos *in vivo*.
3. Difundir los resultados obtenidos en este estudio para apoyar el uso popular de las especies vegetales utilizadas en este estudio.
4. Realizar estudios con diferentes órganos de las especies vegetales que presentaron actividad antimicrobiana para evaluar si tienen el mismo o mejor espectro de inhibición.

## XII. REFERENCIAS

- Aguilar, J. (1966) Relación de unos aspectos de la Flora Útil de Guatemala. Guatemala: MAGA.
- Álvarez, A. & Cáceres, A. (1988) Inhibición de *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* por extractos vegetales usados en el tratamiento de afecciones respiratorias. *Revista Científica*, 6, 11-16.
- Amsterdam, D. (1996). Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. Antibiotics in Laboratory Medicine. USA: Editorial Williams & Wilkins.
- Anderson, R. (1994). Pseudobacteremia with *Pseudomonas fluorescens*. *Medical Journal Australian*, 21, 233–234.
- Arana, S. (2002). *Determinación de la actividad larvicida de 18 plantas detectadas por Etnobotánica y Bioprospección en Guatemala*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Archer, G., & Climo, M. (1994). Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci. *American Society for Microbiology*, 38(10), 2231-2237.
- Argueta, A., Cano, L., & Rodarte, M. (1994). Atlas de Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Indigenista. Tomos I, II y III. 1786 p.
- Arteche, A. (1992). Fitoterapia. Vadémecum de Prescriptions. España.
- Ashkenazi, S. (1999). *Shigella* spp. In *Antimicrobial Therapy and Vaccines* (Yu, V. L., Merigan, T. C. & Borriere, S. L., Eds). USA: Editorial Williams & Wilkins.
- Bannerman, T. (2003). Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: P., Murray, E., Baron, J., Jorgerson, M., Pfaller, R., Tenover, F. C., & Tenover, F. C. (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: ASM Press.
- Cáceres, A., Álvarez, A., Ovando, A., & Samayoa, B. (1991). Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory disease. 1. Screening of plants against Gram positive bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 31, 293-295.
- Cáceres, A, Cano, O., Samayoa, B., & Aguilar, L. (1990). Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders; I. Screening of 84 plants against Enterobacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 30, 55-73.

- Cáceres, A. (1996). *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Guatemala: Editorial Universitaria.
- Cáceres, A., & Samayoa, B. (1990). Plantas de uso medicinal en Guatemala: Tamizaje de la actividad antimicrobiana. *Revista USAC*, 9, 55-77.
- Cáceres, A., & Sapper, D. (1977). Estudio sobre la Medicina popular en Guatemala. *Medicina Tradicional*, 1(2), 59-68
- Cáceres, A. (2009). *Vademécum Nacional de Plantas Medicinales*. (1ra. Edición). Guatemala: Editorial Universitaria.
- Cáceres, A., Figueroa, L., Taracena, A., & Samayoa, B. (1993). Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders; II. Evaluation of activity of 16 plants against Gram positive bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 39, 73-82.
- Cáceres, A., Fletes, L., Aguilar, L., Ramírez, O., Figueroa, L., Taracena, A., *et. al.* (1993). Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders; III. Confirmation of activity against enterobacterial of 16 plants extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 38, 31-38.
- Cáceres, A., Girón, L., Alvarado, S., & Torres, M. (1987). Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 20, 223-237.
- Cáceres, A., López, A., Ingeborg, B & Tuda, I. (1988). Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacterial fungi and American trypanosomas of 13 native plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 62, 195-202.
- Cáceres, A., & Samayoa, B. (1989). *Tamizaje de la actividad antibacteriana de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de afecciones gastrointestinales*. Guatemala: DIGI.
- Cruz, S., Cáceres, A., Medinilla, B, Paredes, M. García, E., Letrán, H., & Orozco, R. (2008). Caracterización química y evaluación de la actividad biológica de *Bourreria huanita* (Llave & Lex.) Hemsl. (Esquisuchil) y *Litsea guatemalensis* Mez. (Laurel). Guatemala: DIGI.

- De Lima, A., Patrick, D., Martino, E., Hule, C., & Blight, M. (2003). In vitro identification of two adherence factors required for in vivo virulence of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbes and infection*, 5, 1177–1187.
- Dijkshoorn, L. (2008). *The Diversity of the Genus Acinetobacter*. (1ra. edición). Norfolk: Caister Academic Press.
- Dreser, A., Wirtz, V., Corbett, K., & Echániz, G. (2008). Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Revista Argentina*, 50(4), 480-487.
- Duke, J. (1986). *Handbook of Medicinal Herbs*. Boca Ratón: CRC Press.
- Ellisa, A. (2008). Métodos para validación de actividad antimicrobiana y determinación de concentración mínima inhibitoria (CIM) de plantas medicinales. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18, 301-307.
- FAO. (1987). *Cultivos autóctonos subexplotados de Mesoamérica*. Chile: FAO.
- Fion, M. (2003). *Recopilación de plantas medicinales validadas farmacológicamente por estudiantes asesorados en el Departamento de Farmacología y Fisiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia*. (Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutica) Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Franfe, E. & Neu, H. (1987). Tetracyclines. *Medicinal Clinical of North America*, 3, 1221-36,
- Frénod, E. (2006). Existence result for a model of *Serratia marscescens*. *Journal of Mathematical Biology*, 6, 697-720.
- Goodman, L. & Gilman, A. (1990). *The pharmacological basis of therapeutics*. (Octava edición) New York: Pergamon.
- Gracia, C., Correa, E., & Rojas, N. (1995). Estudio fitoquímico preliminar y evaluación antimicrobiana de algunas plantas superiores colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 23, 42-48.
- Guerra, O., Torres, I., & Martínez, P. (2001). Validación del uso de plantas medicinales cultivados en Cuba. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2, 48-51.
- Hernández, R. (1989). *Plantas Medicinales*. México: Editorial Árbol.
- Huang, K. (1993). *The Pharmacology of Chinese Herbs*. USA: CRC Press.

- Ippish, F. (1943). Contribución a las Investigaciones sobre Plantas Medicinales y Económicas de Guatemala. Guatemala: Dirección General de Agricultura.
- Jairaj, P., & Khoohaswan, P. (1999). Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology* 67, 203-212.
- Kause, A., Ossipov, V., Haykioja, E., Lempa, K., Hanhimaki, S., & Ossipov, S. (1999). Multiplicity of biochemical factors deetermining quality of growing birch leaves. *Ecology*, 120, 102-112.
- Keinanen, M., Julkunen-Tiitto, R., Multikainen, P., Walls, M., Ovaska, J., & Vapaaavvuori, E. (1999). Trade offs in phenolic metabolism of silver birch: effects of fertilization, defoliation, and genotype. *Ecology*, 80, 1970-1986.
- Knapp, C., & Moody, J. (1992). Test to assess bactericidal activity. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington: ASM.
- Linares, E., Flores, B. & Bye, R. (1985). Selección de las plantas medicinales de México. México: Limusa.
- Lozoya, X. (1984). Medicina Tradicional en México. *Boletín Oficina Sanitaria Panamericana*, 4, 360-364.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2004). *Brock. Biología de los microorganismos*. (10ª. Edición). Madrid: Pearson Prentice Hall.
- Malani, P., Kauffman, C., & Zervos, M. (2002). *Enterococcal disease, epidemiology, and treatment*. In *The Enterococci: Pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. (1ra. Edición). Washington: Rice.
- Maldini, M. (2009). Screening of the topical anti.inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 430-433.
- Martínez, M. (1992). Las Plantas Medicinales de México. México: Botas.
- Martínez, M. (1999). Antimicrobial Activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. *Journal of Ethnopharmacology*, 66, 79-82.
- Martínez, M., González, A., Cazares, L., Moreno, M., & García, A. (1999). Activity of *Byrsonima crassifolia* (L.). H.B.K. *Journal of Ethnopharmacology*, 66, 79-82.

- Mella, A., García, V., Aguilera, S., & Zemelman, J. (1993). Antibióticos aminoglicósidos. Agrupación según su estructura química y actualización sobre alguna de sus propiedades. *Acta Microbiológica*, 4, 5-13.
- Mellen G. (1974). El uso de plantas medicinales en Guatemala. *Guatemala Indígena*, 19, 15-22.
- Ministry of Health of Indonesia. (1981). Utilization of Medicinal Plants. Indonesia: Ministry of Health of Indonesia.
- Mitscher, L., Leu, R., Bathda, M., & Beal, J. (1972). Antimicrobial agents from higher plants. Introduction rationale and methodology. *Lloydia*. 35, 157-166.
- Mitscher, L., Steven, D., Sitaraghau, S., Gollapudi, S., & Okwute, K. (1987). A modern look of folkloric use of antiinfective agents. *Journal Natural Products*, 50(6), 1025-1040.
- Morton, J. (1977). Some folklore medicinal plants of Central American Markets. *Quantifical Journal of Crude Drug Research*, 15:165-192.
- Morton, J. (1981). Atlas of Medicinal Plants of Middle America. Springfield: Thomas.
- Mota, M., Varela, G., Gadea, M., Caffer, M., Sirok, A., & Schelotto, F. (2005). Serotipos, perfil plasmídico y antibiotipos de cepas de *Shigella flexneri* y *Escherichia coli* aisladas de niños menores de 5 años con diarrea sanguinolenta usuarios de los servicios de Salud Pública. *Revista Médica del Uruguay*, 21, 30-36.
- Naqvi, S., Khan, M., & Vohora, S. (1991). Anti-bacterial, antifungal and antihelminthic investigations on Indian medicinal plants. *Fitoterapia* 62, 221-228.
- Naranjo, P. (1978). Medicina indígena y popular de América latina y medicina contemporánea. *Instituto Indigenista Nacional*, 1(8), 617.
- Nash, D., & Dieterle, J. (1976). Flora of Guatemala. *Fieldiana Botany*, 24, 431-433.
- Navarro, V., Villarreal, M., Rojas, G. & Lozoya, X. (1996). Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 53, 143-147.
- NCCLS. (2000). National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard, M2-A7. Disk diffusion supplemental tables. Document M100-S10. FDA.

- NCCLS. (1997). National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. (Sexta Edición). NCCLS Documents M2–A6. FDA.
- NCCLS, (2004). National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Fourteenth Informational Supplement. M100-S14, FDA.
- Ocampo, R., & Maffioli, A. (1987). El Uso de Algunas Plantas Medicinales en Costa Rica. Costa Rica: Trejos Hnos.
- Organización Panamericana de la Salud. (1998). *Situación de las enfermedades infecciosas de mayor riesgo epidemiológico*. Programa de Enfermedades Transmisibles División de Prevención y Control de Enfermedades. Extraído de <http://www.es.irc.nl/page/41776>.
- Pandey, K., & Rizvi, S. (2009). Plant Polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidation Medical Cell Longev*, 2, 270-278.
- Paz, M. (1998). Manual de Procedimientos Estandar de Operación. (Publicación Interna). Guatemala: Editorial Universitaria.
- 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., Cutler, 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, L., & Schanholtzer, C. (1992). Tests for bactericidal effects of antimicrobial agents. Technical performance and clinical relevance. *Clinical Microbiology Review* 5, 420-432
- Pinto, T. (2003). *El control biológico de Calidad de los productos farmacéuticos y relacionados Cosméticos*. (2da.edición) Brasil: Atheneu.
- Pitout, J. (2002). The clinical significance of AmpC  $\beta$ -lactamases. *Microbiology Newsletter*, 1-2.
- Pöll, E. (1984). Plantas comestibles y tóxicas de Guatemala. *Revista Científica*, 1, 13-18.

- Pöll, E. (1985). Contribución al estudio de las Loranthaceae. *Revista Científica*, 1, 27-35.
- Porter, R. (2003). *Breve historia de la medicina. De la antigüedad hasta nuestros días*. España: Taurus Minor.
- Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo. (2002). Informe Mundial del Desarrollo Humano. Guatemala.
- Programa de recursos genéticos CATIE/GTZ. (1979). *Los recursos genéticos de las plantas cultivadas en América Central*. Costa Rica: CATIE/GTZ.
- Quiñóñes, D., Goni, M., Rubio, A., & Durán, E. (2005). Enterococci spp. isolated from Cuba: species frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 51, 63–67
- Richardson, A, Libby S., & Fang F. (2008). *A nitric oxide-inducible lactate dehydrogenase enables Staphylococcus aureus to resist innate immunity*. USA.
- Ríos, J., Recio, M., & Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity; a review of the literatura. *Journal of Ethnopharmacology*, 23, 127-149.
- Rivera, E., Gatusso, M., & Lozoya, X. (2003). Anatomical identity parameters of the crude drug *Psidium guajavae folium*. *Pharmaceutical Biology*, 41, 51, 52.
- Rivero-Cruz, J., Chávez, D., Hernández, B., Anaya, A., & Mata, R. (2005). Cytotoxic constituents of the twigs of *Simauroba glauca* collected from a plot in Southern Florida. *Phytotherapy*, 19, 136-140.
- Rodríguez, R., Hernández-Cruz, P., & Giles-Rios, H. (2001). Lectins in fruits having gastrointestinal activity: their participation in the hemagglutinins property of *Escherichia coli* 0157:H7. *Archives of Medical Research* 32, 251-257.
- Rojas, T. (1994). Antropología y Etnobotánica. I Simposium Internacional sobre Etnobotánica en Mesoamérica “Efraím Hernández X”. Universidad Autónoma Chapingo. México D.F. pp. 87-97.
- Rojas, R., Bustamante, B., Bauer, J., Fernández, I., Albán, J. & Lock, O. (2003). Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 199-204.
- Ronquillo, F. (1988). *Búsqueda y colecta de plantas medicinales y alimenticias de uso actual o potencial en la región semiárida del nororiente de Guatemala*. (Tesis de

- Licenciatura en Química Biológica). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Ronquillo, F., Melgar, M., Carrillo, J., & Martínez, A. (1988). Especies vegetales de uso actual y potencial en alimentación y medicina de las zonas semiáridas del nororiente de Guatemala. Cuaderno DIGI. 249 p.
- Roque, J. (1941). Flora Útil Médico-Guatemalteca: Apuntes para la Materia Médica de la República de Guatemala. Guatemala: Editorial C.A.
- Rossi, A., Tokumoto, M., Galas, M., Sobonga, R., & Corso, A. (1996). Vigilancia de la resistencia a los antibacterianos en Argentina. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 6, 234-241.
- Ryan, K., & Ray, C. (2004). *Sherris Medical Microbiology*, (4th ed). Washington: McGraw Hill Ellisa, A.
- Sergei, E., Esipov, J., & Shapiro, A. (2006). Kinetic model of *Proteus mirabilis* swarm colony development. *Journal of Mathematical Biology*, 36, 249-268.
- Spiegel, M. (1991). Estadística. México DF: Editorial McGraw-Hill.
- Standley, P., & Steyermark, J. (1946). Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany* 24, 493.
- Standley, P., & Steyermark, J. (1946). Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany* 24, 501.
- Standley, P., & Williams, L. (1964). Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany* 24, 281.
- Thong, K., Cheong, Y., Puthuchear, S., Koh, L., & Pang, T. (1994) Epidemiologic analysis of sporadic *Salmonella typhi* isolates and those from outbreaks by pulsed-celd gel electrophoresis. *Journal Clinical of Microbiology*, 32, 1135-1141.
- Villatoro, E. (1984). La medicina tradicional en Guatemala: Aspectos históricos. Guatemala: Serviprensa.
- Villatoro, M. (1988). La Comunicación Popular y la Salud Materno Infantil. *Revista Científica Estudiantil Folklórica*, 2, 61-73.
- Vladislavovna, S., Reyes, H., Flores, S., Martínez-García, M., González, M., *et al.* (2006). Effect of a *Psidium guajavae folium* extract in the treatment of primary dysmenorrhea: A randomized clinical trial. *Journal of Ethnopharmacology*, 110, 305-310.
- Witsberger, D., Current, D., & Archer, E. (1982). Árboles del Parque Deininger. El Salvador: MINEDUC.

- Ximenez, F. (1967). *Historia Natural del Reino de Guatemala*. Guatemala: Editorial José de Pineda Ibarra.
- Zamora, A. (1996). *Conformación de la actividad antimicrobiana de los árboles Spondia purpurea y Simauroba glauca nativos de Guatemala*. (Tesis de Licenciatura en Química Biológica). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Ziebuhr, W. (2006). Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28, 14-20.
- Ziebuhr, W. (2001). *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: emerging pathogens in nosocomial infections. *Contributions to Microbiology*, 8, 102–107.