



MINISTERIO DE EDUCACIÓN SUPERIOR

UNIVERSIDAD DE GRANMA



Facultad de Ingeniería
Centro de Estudio de Química Aplicada

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales
Carrera de Ingeniería Agroindustrial

TRABAJO DE DIPLOMA

TÍTULO:

“Determinación de la Actividad Antibacteriana de las hojas de *Rheedia aristata* (Manajú)”.

AUTORA:

Maria Lourdes Zambrano Manzaba

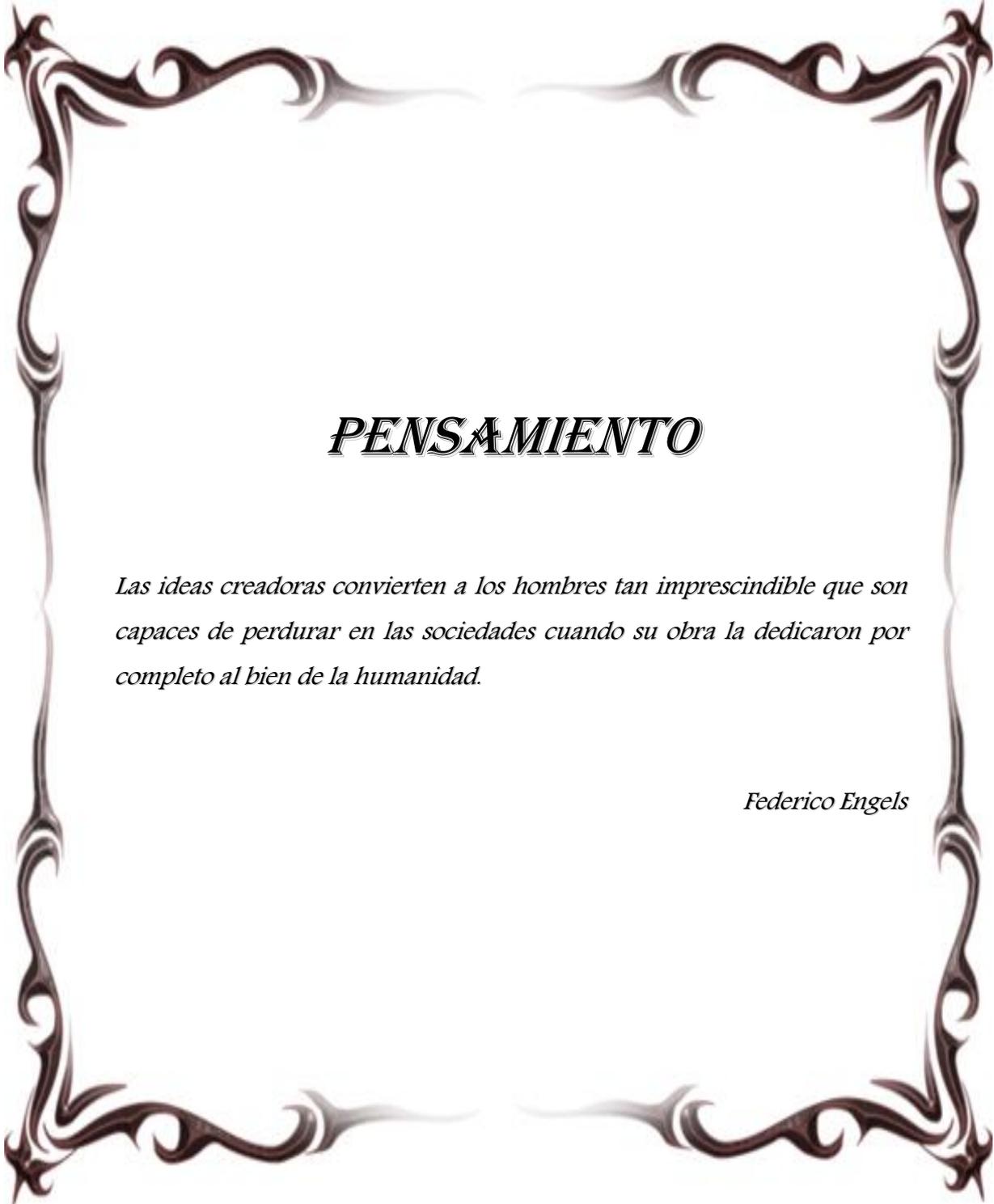
TUTORES:

Dra. Galina Torres Morales
Lic. Yarima Sánchez García
Lic. Yosvel Viera Tamayo

BAYAMO, M. N.

2010

“Año 52 de la Revolución”

A decorative border with intricate, symmetrical scrollwork and floral patterns in a dark brown color, framing the central text.

PENSAMIENTO

Las ideas creadoras convierten a los hombres tan imprescindible que son capaces de perdurar en las sociedades cuando su obra la dedicaron por completo al bien de la humanidad.

Federico Engels

AGRADECIMIENTO

La realización de este epígrafe no es puro formalismo, tampoco constituye un recuento de quienes hicieron posible la realización de este trabajo, es el reconocimiento hacia aquellos que de una manera u otra me brindaron su apoyo desinteresado a tal punto que dejaron en mí una imperecedera huella de amor y respeto.

Agradezco en primer lugar a Dios por darme la vida, fuerzas, inteligencia y sabiduría para alcanzar este logro.

Cuando a través de los años recordamos al niño que fuimos, evocamos a nuestros padres; a ellos mi eterno agradecimiento, pues con su ejemplo, amor y abnegación guiaron mis pasos siendo los pilares fundamentales durante todo este caminar de alegría y tristeza.

Agradezco también a mis hermanas, hermanos y a mi cuñada por su comprensión, confianza y apoyo incondicional.

A la Universidad Técnica de Cotopaxi y a la Universidad de Granma ya que a través del convenio hicieron posible la realización de este trabajo.

A la dirección de la Facultad de Ingeniería, por ese apoyo grato e incondicional.

Agradezco a todos los miembros del Centro de Estudio de Química Aplicada, en especial a la Dra. Galina Torres y a la Lic. Yarima Sánchez por su incondicional ayuda e impartir su conocimiento de una forma desinteresada.

Al centro de Biotecnología Vegetal en especial al Lic. Yosvel Viera por brindarnos su confianza y conocimientos de una manera incondicional durante toda la investigación realizada.

A todas las personas que pudieron brindar su ayuda en la realización de este trabajo.

A ellos mis más sinceros agradecimientos.



DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres por su apoyo incondicional durante todos los años de mi vida quienes han sido mi inspiración y el pilar fundamental en este largo caminar que ya ha llegado a un final exitoso, con mucho amor y cariño para los seres que me dieron la vida mis padres.

A mis hermanos y a mi cuñada por ser las personas más especiales y sobre todo por llenar de alegría mi vida.

A mis abuelitas por ese apoyo incondicional y cuidados desde mi niñez, llevando todos esos recuerdos en mi corazón.

A mis pequeñas sobrinas que son los seres más tiernos y lindos que Dios ha puesto en mi camino y que cada día con sus sonrisas le dan luz y alegría a mi vida.

A todos mis tíos quienes por sus consejos, bendiciones y cuidados siempre estuvieron pendientes de mí.

A mi novio por su confianza, amor y comprensión.

A mis compañeros quienes me han brindado su confianza, comprensión y apoyo durante la realización de este trabajo investigativo.

Resumen

El trabajo investigativo estuvo orientado a la determinación de los principios activos y de la comprobación de la acción antibacteriana de las hojas de *Rheedia aristata Griseb* (Manajú), la misma es endémica de Cuba, y se caracteriza por encontrarse en peligro de extinción. De las hojas de la planta se obtuvieron los extractos etéreo, alcohólico y acuoso; la tintura al 20% y extracto seco empleando las normas cubanas aprobadas para estos fines.

Se comprobó que en las hojas del Manajú están presentes alcaloides, coumarinas, ácidos grasos, flavonoides, quinonas, fenoles, antocianidinas y carbohidratos reductores, siendo estos los responsables de la acción antibacteriana de la planta. Esta actividad antibacteriana fue demostrada en el estudio microbiológico realizado frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, a diferencia de las cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella* que no presentaron acción antibacteriana. La eficacia de los extractos de estas plantas fue evaluada por comparación con modelos actualmente en uso para el sistema de salud.

Summary

The research work was oriented to the determination of the active principles and of the verification of the anti-bacterial action of the leaves of aristata *Rheedia* Griseb (Manajú), that is endemic of Cuba, and it is characterized by would find in extinction danger. From the leaves of the plant the extracts were obtained ethereal, alcoholic and watery; the tincture to 20% and dry extract using the approved Cuban norms for this purpose.

It was verified that in the leaves of the Manajú exist metabolites as alkaloids, coumarins, fatty acids, flavonoids, quinones, reducing phenols, anthocyanidins and carbohydrates, which are the responsible of the anti-bacterial action of the plant.

This anti-bacterial activity was demonstrated in the microbiological study realized in front of the stocks of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, unlike the stocks of *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Shigella* that did not show anti-bacterial action. The effectiveness of these plant extracts was evaluated by comparison with models currently in use for the health system.

Índice

	Pág.
1. Introducción	1
2. Revisión Bibliográfica	4
2.1. Características de las plantas	4
2.1.1. <i>Hábitat y distribución</i>	4
2.1.2. <i>Descripción botánica</i>	4
2.1.3. <i>Parte empleada</i>	5
2.1.4. <i>Usos y aplicaciones</i>	5
2.2. Tamizaje fitoquímico de plantas medicinales	5
2.2.1. <i>Metabolitos secundarios y sus funciones</i>	6
2.3. Bacterias	8
2.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	9
2.3.2. <i>Bacillus subtilis</i>	13
2.3.3. <i>Salmonella</i>	15

2.3.4	<i>Shigella</i>	16
2.3.5.	<i>Escherichia coli</i>	18
3.	Materiales y métodos	22
3.1.	Preparación de formulaciones	22
3.1.1.	<i>Extractos (etéreo, alcohólico, acuoso)</i>	22
3.1.2.	<i>Tintura 20%</i>	23
3.1.3.	<i>Extracto Seco</i>	23
3.2.	Especificaciones de Calidad	23
3.3.	Metodología del Tamizaje Fitoquímico	25
3.4.	Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de Manajú.	32
4.	Resultados y discusión	36
4.1.	Tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico, acuoso, seco y tintura 20 % del Manajú.	36
4.2.	Comparación del tamizaje fitoquímico de la tintura 20 % y el extracto seco.	38
4.3.	Control de la calidad realizado a la tintura 20 %.	39

4.4.	Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de Manajú.	40
5.	Conclusiones	48
6.	Recomendaciones	49
7.	Bibliografía	

Anexos

1. Introducción

En la mayor parte del mundo la medicina moderna se ha incrementado en base al consumo de medicamentos obtenidos por métodos biotecnológicos y sintéticos, pero hoy en día la importancia de Medicina Natural se evidencia por el alto consumo de los productos recomendados por esta alternativa para el manejo de las enfermedades por el hecho que diferentes sectores de la población de los países pobres todavía dependen de productos tradicionales, las plantas medicinales y los medicamentos herbarios para su atención primaria.^{1,2}

En los últimos años se ha incorporado la Medicina Tradicional y Natural a la práctica profesional, no como un método alternativo motivado por causas de índole económica o como vía para dar solución a los problemas de desabastecimiento, sino como una verdadera disciplina científica que es necesario estudiar perfeccionar y desarrollar permanentemente, por sus demostradas ventajas éticas y científicas.³

El conocimiento y aplicación de los procedimientos y técnicas de promoción de salud, prevención de enfermedades, diagnóstico, curación y rehabilitación que comprende la Medicina Tradicional y Natural en busca de más vida y sobre todo de más calidad de vida, tiene una gran importancia para los pueblos subdesarrollados, por cuanto es posible generalizar el uso de medicamentos y otros recursos de fácil adquisición, de poco costo, y al alcance de todos, independientemente del grado de desarrollo alcanzado en la producción industrial de medicamentos en cada pueblo. Esto les posibilitará desenvolverse y resolver los problemas de salud en cualquier situación que se les presente.³

Desde la antigüedad las plantas han sido un recurso al alcance del ser humano para su alimentación y la curación de sus enfermedades; éstas últimas llamadas plantas medicinales eran veneradas por las virtudes que se les había reconocido, transmitiéndose sus virtudes de generación en generación.⁴

Aún en la actualidad cientos de plantas son utilizadas en la medicina, pero la ciencia moderna analizando y estudiando los efectos terapéuticos de las plantas, quiere precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades, no con el fin de disminuir esta confianza en la naturaleza, sino para agrupar a las plantas de efectos similares, para conocer los principios activos responsables de cortar, aliviar o curar enfermedades, separarlos de las plantas que lo contienen, determinar sus estructuras químicas, procurar su síntesis, proponer modificaciones estructurales en busca de una mayor actividad y, finalmente, dar a conocer a la humanidad los resultados de los estudios.⁴

Es importante mencionar que la flora silvestre de Cuba ha sido poco estudiada químicamente, lo que ha limitado la explotación y aprovechamiento racional de este recurso natural ampliamente distribuido en todo el archipiélago, particularmente en zonas donde las especies endémicas alcanzan un porcentaje elevado.¹

Conocer el contenido de metabolitos secundarios de las plantas y, en especial, de las especies endémicas como el Manajú, permite contar con una fuente natural renovable de estos compuestos con gran valor económico por sus variadas acciones farmacológicas y aplicaciones industriales.¹

Problema

La alta incidencia de enfermedades producidas por microorganismos bacterianos tales como: ***Salmonella, Staphylococcus aureus, Shigella, Bacillus subtilis, Escherichia coli***, es un inconveniente grave de salud en diferentes sectores, debido a la baja disponibilidad de medicamentos industriales para el tratamiento de las mismas.

Hipótesis

Las enfermedades producidas por las bacterias ***Salmonella***, ***Staphylococcus aureus***, ***Shigella***, ***Bacillus subtilis***, ***Escherichia coli***, que afectan grandemente a nuestra población pueden ser combatidas con formulaciones obtenidas a partir de las hojas del Manajú.

Objetivo General

Evaluar la actividad antibacteriana de las hojas de ***Rheedia aristata Griseb*** (Manajú), frente a ***Salmonella***, ***Staphylococcus aureus***, ***Shigella***, ***Bacillus subtilis***, ***Escherichia coli***.

Objetivos Específicos

- Obtener extractos (etéreo, etanólico, acuoso), tinturas y extracto seco de las hojas de ***Rheedia aristata Griseb*** (Manajú).
- Realizar estudios fitoquímicos a los diferentes extractos y tinturas para conocer los metabolitos secundarios que posee las hojas de dicha planta.
- Realizar el control de calidad de las tinturas al 20%.
- Evaluar la acción biológica de los distintos extractos obtenidos, frente a ***Salmonella***, ***Staphylococcus aureus***, ***Shigella***, ***Bacillus subtilis***, ***Escherichia coli***.

2. Revisión bibliográfica

2.1. Características de la planta

2.1.1. Hábitat y distribución

Rheedia aristata Griseb (Manajú), es un árbol endémico del oeste de Cuba y de las Indias Occidentales, el mismo se encuentra amenazado por pérdida de hábitat, este es muy atractivo como ornamental y se caracteriza porque produce una resina medicinal amarilla, el Manajú puede sobrevivir periodos cortos de temperaturas inferiores a 32 °F, y este crece principalmente en terrenos montañosos a orillas de las sierras y cerca de los ríos. Florece en febrero y fructifica en abril.^{5, 6, 7, 8}

Nombre Científico: *Rheedia aristata* Griseb

Sinonimia: *Garcinia aristata* (Griseb.) Borhidi 1998⁷

Nombre Común: Manajú

Familia Botánica: *Clusiaceae*

Género: *Rheedia*

Especie: *R. aristata*

2.1.2. Descripción botánica

Es un árbol o arbusto resinoso de hasta 10 m, con las ramillas tetrágonas, cilíndricas al final; sus hojas son; verdes muy oscuras, carnosas, con espinas, opuestas, rígidas, elípticas, agudas y con el ápice mucronado-aristado, ligeramente peciolada, de 3 - 5 cm de largo y de 2 - 2,5 cm de ancho; venas primarias prominentes en ambas caras, la mayor parte bifurcadas. Pedicelos fasciculados, mucho más cortos que la hoja. Flor masculina de 6 - 8 mm, la femenina de 1,6 - 2 cm de largo; ovario 2-ocular. Baya subglobosa de 8 - 15 mm, su fruto se caracteriza por ser pequeño, amarillo de pulpa blanca, ligeramente dulce y la forma de propagación es por semilla.^{5, 7, 9}

2.1.3. Parte empleada

Las hojas

2.1.4. Usos y aplicaciones

El Manajú se está utilizando en dos campos específicamente, siendo el primero la medicina utilizando la resina para cubrir las heridas en el campo, por el hecho que detiene la sangre y principalmente se aplica en los pies con el fin de evitar los tétanos, esta también se toma como laxante, anticatarral, antiasmático y para extraer la frialdad del cuerpo, la decocción de tallos es útil para tratar las afecciones del aparato respiratorio como asma, bronquitis y pulmonitis. El segundo campo en que se aplica es el maderero por el hecho de que la madera que este posee es dura y resistente y se está utilizando para escaleras y bastones.^{5, 7}

2.2. Tamizaje fitoquímico de plantas medicinales

Para desarrollar el tamizaje fitoquímico se reportan en la literatura variados esquemas de trabajo que comprenden a su vez el uso de diferentes solventes de extracción.¹ Es importante señalar que los resultados obtenidos mediante estas técnicas ofrecen solo una visión de la composición química de la planta a estudiar y que no puede tomarse en ningún caso como un resultado concluyente ya que en la presencia o ausencia de los metabolitos pueden influir de forma determinante los siguientes factores:¹⁰

1. La época de recolección.
2. El estado vegetativo de la planta.
3. Las variaciones ocurridas por una deficiente recolección, secado y/o conservación.
4. La concentración de los metabolitos.

5. La solubilidad en el solvente empleado.
6. Las interferencias de otros metabolitos.

2.2.1. Metabolitos secundarios y sus funciones

Los metabolitos secundarios son sustancias dotadas de actividad farmacológica, que no se sintetizan bajo cualquier circunstancia, ni tampoco tienen una función metabólica fundamental en la célula que le da origen.^{11, 12} Sin embargo, son indispensables en el organismo como un todo, además se acumulan generalmente en pequeñas proporciones en las plantas, a veces en células especializadas, ello es lo que hace difícil y costosa su extracción. Estos compuestos no están generalmente desempeñando papeles de importancia en el proceso fotosintético, la respiración, transporte de solutos, traslocación, diferenciación y asimilación de nutrientes, como muchos metabolitos primarios.^{13, 14}

Principales principios activos

- Alcaloides
- Glúcidos
- Proteínas
- Lípidos
- Taninos
- Flavonoides
- Antocianinas
- Coumarinas
- Quinonas (naftoquinonas)

Aplicaciones generales de algunas de las familias de constituyentes naturales más importantes de las plantas:¹²

Alcaloides: se emplean en el tratamiento de la hipertensión, la arritmia cardíaca y tienen actividad antibacteriana constituyen materias primas para la fabricación de medicamentos.

Esteroles: Se aplican fundamentalmente en la medicina. Forman parte de hormonas animales y vitaminas.

Triterpenos: Poseen acciones farmacológicas destacadas. Tienen actividad antibacteriana, antihelmíntica, antiséptica, digestivos, expectorantes y diuréticos, por lo que se emplean en la medicina, además tienen importantes aplicaciones en la industria. Constituyen los llamados aceites esenciales, útiles en perfumería, farmacia y en la preparación de determinados alimentos.

Glicósidos cardiotónicos: Se aplican en la medicina pues estimulan la función cardíaca, son los llamados venenos del corazón.

Saponinas: En la práctica comúnmente se les da un uso medicinal e industrial. Tienen actividad antibacteriana y son precursores de hormonas esteroidales y corticosteroides. Por su actividad tensoactiva son útiles como emulgentes y hemolizantes.

Fenoles simples: Se emplean en la medicina por poseer actividad antifúngica y tienen además uso industrial como desinfectante y aromatizante.

Flavonoides: Producen la fragilidad capilar, protegen frente a estados tóxicos, antiinflamatorios, antialérgica, antibacteriana y pueden ser además hepatoprotectoras, antiespasmódicas, diuréticos, antibacterianos y antivirales. Son empleados en la industria como colorantes.

Taninos (taninos condensados): Se les han atribuido propiedades cercanas a los flavonoides disminuyendo la fragilidad y permeabilidad capilar, propiedades astringentes, antisépticas, antibacteriana y antifúngica. A demás son empleados en la industria útiles en la fabricación de tintas y otros colorantes, para curtir pieles.

Coumarinas: Se emplean en la medicina acción antibacteriana, anticoagulante en el tratamiento de psoriasis y el vitiligo y en la industria como aromatizante.

Glicósidos flavonoides: Principalmente la rutina, antocianinas y quercitinas se le atribuyen efectos sobre la irrigación sanguínea de los bronquios, provocando broncodilatación, lo cual mejora obviamente los cuadros clínicos de bronco constricción en los pacientes asmáticos.

Quinonas específicamente las naftoquinonas: Se caracterizan por su acción antibacterianas y antifúngica y las antraquinonas por su acción laxante.

2.3. Bacterias evaluadas

Bacteria (del griego, *bakteria*, 'bastón'), nombre que reciben los organismos unicelulares y microscópicos, que carecen de núcleo diferenciado y se reproducen por división celular sencilla (fisión binaria). Las bacterias son muy pequeñas, entre 1 y 10 micrómetros (μm) de longitud.

Probablemente, las bacterias fueron los primeros seres vivos que habitaron la Tierra y, sin embargo, debido a su diminuto tamaño no hemos sabido que existían hasta que se inventó el microscopio. Fueron descritas por primera vez a finales del siglo XVII por un holandés, **Antoni van Leeuwenhoek**, que las observó con la ayuda de un microscopio muy sencillo construido por él mismo.

En el siglo XIX el científico francés **Louis Pasteur** demostró que algunas bacterias podían producir enfermedades. Pasteur observó que el calor podía destruirlas. El uso de temperaturas muy elevadas para matar las bacterias de los instrumentos que se utilizan en los quirófanos se llama esterilización. Las bacterias pueden contaminar los alimentos y producir intoxicaciones. A ellas se deben enfermedades tan conocidas como la tuberculosis, la peste, la sífilis, el tétanos, el cólera y muchas formas de neumonía. La mayoría de las enfermedades producidas por bacterias se curan con antibióticos.¹⁵

2.3.1. *Staphylococcus aureus*

Caracteres micromorfológicos

El género *Staphylococcus* se incluye en la familia *Micrococcaceae*. En cultivos líquidos se encuentran cocos aislados, en pares, tétradas, cadenas cortas y principalmente en forma de racimos. La forma de coco tiende a ser de tamaño mucho más uniforme que los tipos morfológico de bacterias, tienen un diámetro aproximado de 1 μm , típicamente son casi perfectos en su forma esférica. Los cocos jóvenes son positivos a la tinción de Gram; al envejecer muchas células se vuelven Gram-negativas. Se caracterizan por ser inmóviles, no esporulados, anaerobios facultativos, que crecen con facilidad en los medios de laboratorio; son metabólicamente activos; fermentan carbohidratos; son catalasa positiva y producen pigmentos que van desde el blanco al amarillo intenso, muchas células son hemolíticas. Los estafilococos desarrollan, con rapidez, resistencia a muchos agentes antimicrobianos por lo que resulta difícil su tratamiento.¹⁶

Caracteres macromorfológicos

Los estafilococos proliferan fácilmente en los medios bacteriológicos bajo condiciones aerobias o microaerófilas a temperatura de 37 °C. Las colonias desarrolladas en medios sólidos (agar- sangre de carnero) en un

período de 18 - 24 horas tienen un diámetro de 1 - 3 mm. En incubación prolongada durante 5 días, las mismas, son redondas, lisas, elevadas y resplandecientes. *Staphylococcus aureus* suele formar colonias de color gris a amarillo dorado intenso, se caracterizan por fermentar con lentitud muchos carbohidratos y elaboran ácido láctico pero no gas.^{16, 17, 18}

Diagnóstico bacteriológico

Las muestras deben ser sembradas en placas de agar sangre, agar infusión cerebro- corazón, agar-soya-tripticosa o P-agar durante 18 - 24 horas a temperatura entre 34 - 37 °C. Se obtienen colonias circulares, lisas, elevadas y resplandecientes con un diámetro de 1 - 3 mm. Forman pigmentos a temperatura ambiente (20-25°C), de color amarillo dorado en *S. aureus*.^{16,18,19}

Las pruebas fisiológicas y bioquímicas que se realizan son:

Prueba de catalasa: Se coloca una gota de solución de peróxido de hidrogeno sobre un porta objetos y sobre esa solución se vierte una pequeña cantidad de bacterias en crecimiento. La formación de burbujas (liberación de oxígeno) indica una prueba positiva.

Prueba de la coagulasa: el plasma citrato de humano (o animal) se mezcla con un volumen igual de caldo de cultivo o colonias en crecimientos sobre agar y se incuba a 37 °C. Se incluye como control un tubo de plasma mezclado con caldo estéril. Si se forma con coágulos de 1 - 4 h la prueba es positiva. Los estafilococos coagulasa positivo se consideran patogénicos para los humanos, no obstante los estafilococos positivos de los perros (*S. intermedius*) muy pocas veces causan enfermedades en humanos.

Los estafilococos son capaces de crecer en presencia de cloruro de sodio al 7,5 %, que inhibe muchas bacterias y se han usado medios selectivos que contienen sal junto con manitol, y a veces rojo de fenol como

indicador ácido- básico, para aislar estafilococos de muestras muy contaminadas con otras bacterias. ¹⁶

Epidemiología

S. aureus es el principal patógeno humano perteneciente al género *Staphylococcus*. Es una bacteria de amplia distribución capaz de colonizar e infectar tanto al individuo sano como al inmunodeprimido. Suele encontrarse en cualquier superficie cutánea y mucosa. Sus infecciones se adquieren indistintamente en la comunidad y en el hospital. *S. aureus* produce varias enzimas y toxinas responsables de la patogenia y del cuadro clínico; son causa de absceso, forúnculos, infecciones piógenas diversas, sepsias mortales, síndrome de choque tóxico, meningitis, neumonía, pioartrosis, osteomielitis y ocasionan envenenamiento alimentario por la producción de enterotoxina tonsilitis, endocarditis, queratitis ulcerativa entre otras. Como agente secundario interviene en la viruela, difteria, angina séptica, escarlatina, tuberculosis y neumonía.

La lesión típica ocasionada por *S. aureus* es el furúnculo o absceso, interviene en la mayor parte de los procesos de supurados de heridas en el hombre y los animales. Puede localizarse en cualquiera de los tejidos corporales, por lo que es el germen que con más frecuencia produce piemia. ^{16,19}

Tratamiento

Infecciones locales

Drenaje, retirada del cuerpo extraño, antibióticos

Infecciones localizadas acompañadas de rash

Reposición hidroelectrolítica, soporte del estado general, antibióticos

Infecciones sistémicas

Bacteriemia: cloxacilina 2g/4h/IV un mínimo de quince días

Endocarditis derecha: cloxacilina 2g/4h/IV durante quince días

Endocarditis izquierda: cloxacilina 2g/4h/IV de cuatro a seis semanas

Neumonía: cloxacilina quince días

Osteomielitis y artritis aguda: cloxacilina IV de tres a cuatro semanas

Osteomielitis crónica: ciprofloxacina u ofloxacina más rifampicina por vía oral de tres a seis meses

a: si hay afectación del estado general y/o riesgo de diseminación.

b: antibióticos de administración oral con actividad antiestafilocócica: amoxicilina-ácido clavulánico, cefalosporinas de primera generación, quinolonas fluoradas.

c: si se demuestra infección localizada;

d: como alternativas se puede utilizar las cefazolina. En caso de alergia a los betalactámicos o de SAMRA (*S. aureus* resistente a la meticilina y aminoglucósidos): vancomicina o teicoplanina;

e: a los quince días del tratamiento, si no existen complicaciones locales se puede parar al tratamiento¹³. Si el tratamiento debe realizarse con glucopéptidos éste debe prolongarse por espacio de cuatro semanas;

f: en los casos de sepsis grave es aconsejable asociar gentamicina de tres a cinco días;

g: otras alternativas según antibiograma: cotrimoxazol o clindamicina;IV: por vía intravenosa ^{18,19}

2.3.4. *Bacillus subtilis*

Género: *Bacillus*

Caracteres micromorfológicos

Bacillus subtilis es una bacteria con forma cilíndrica, Gram-positiva, Catalasa-positiva, anaerobio facultativo comúnmente encontrada en el suelo. *B. subtilis* tiene la habilidad para formar una resistente endospora, permitiendo al organismo tolerar condiciones ambientalmente extremas.²⁰

Patogénesis

B. subtilis no es considerado patógeno humano; sin embargo puede contaminar los alimentos, pero raramente causa intoxicación alimenticia. Sus esporas pueden sobrevivir a temperaturas elevadas, que a menudo es usada para cocinar el alimento, y es responsable de causar la fibrosidad en el pan estropeado.²⁰

Utilidad de *B. subtilis*

Algunas cepas de *B. subtilis* tienen aplicaciones comerciales:

- Una variedad de *B. subtilis* antes conocido como *Bacillus natto* es usada en la producción comercial del manjar japonés Nattō.
- *B. subtilis* QST 713 (comercializado como QST 713 o Serenata) tiene una actividad fungicida natural, y es empleado como un agente de control biológico.
- Las enzimas producidas por *B. subtilis popo* y *B. licheniformis* son usadas extensamente como aditivos en detergentes de lavandería.
- *B. subtilis* pBE2C1 and *B. subtilis* pBE2C1AB son usados en la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de desechos de malta como fuente de bajo costo para la producción de PHA²⁰

B. subtilis como un organismo modelo

B. subtilis se ha grandemente en la manipulación genética, y se ha hecho, por tanto, extensamente adoptado como un organismo modelo para estudios de laboratorio. De manera más consistente, se ha empleado en estudios de esporulación, que es un ejemplo simplificado de la diferenciación celular. En términos de popularidad, como un organismo modelo de laboratorio, *B. subtilis* a menudo es usado como el equivalente Gram-positivo de *Escherichia coli*.²⁰

2.3.2 Salmonella enterica.

Género: Salmonella

La nomenclatura y clasificación de las bacterias que conforman este género se ha encontrado en constante cambio; actualmente se considera que el género *Salmonella* está integrado por una sola especie, *Salmonella enterica*, dentro de la cual se encuentran todos los serotipos descritos. Para la clasificación clínico epidemiológica es más usado el considerar el cuadro clínico que produce el serotipo infectante, de ahí que se dividan en tres clases: Salmonelas que producen cuadros septicémicos (*S. cholerae-suis*); salmonelas que producen fiebres intestinales (*S. typhi* y *S. paratyphi* A, B y C) y salmonelas que producen cuadros gastroentéricos (el resto de las salmonelas).^{16, 21,22}

Caracteres micromorfológicos

Las enterobacterias son bacilos que, en ocasiones, en cultivos jóvenes, se pueden observar formas cocobacilares y hasta cocoides. El tamaño promedio de la mayoría de estas bacterias oscila entre 0,5 - 2 µm de ancho y de 2 - 4 µm de largo. Sus bordes son rectos y sus extremos curvos. Son bacterias negativas a la tinción de Gram, móviles, anaerobias facultativas, con flagelos peritricos y que no desarrollan cápsula ni esporas. La familia *Enterobacteriaceae* se caracteriza por tener antígenos somáticos (O) que determinan los grupos serológicos. Algunas

enterobacterias como *Salmonella* poseen antígenos M, que son antígenos de superficie. El antígeno Vi es un antígeno somático externo que se halla en *Salmonella typhi*. Otros serotipos han sido descritos dentro de este género, hasta llegar en la actualidad a más de 2300.^{16,21}

Caracteres macromorfológicos

La temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de las especies de esta familia (*Enterobacteriaceae*) es de 37 °C aunque los representantes del género *Salmonella* toleran temperaturas de hasta 42 °C. Crecen bien en varios medios de cultivo tales como agar nutriente, agar-sangre, agar-sangre-chocolate o caldo nutritivo. En los medios sólidos se observan colonias relativamente grandes, de color grisáceo, de aspecto húmedo y de bordes definidos. En el caso de *Salmonella* crece con facilidad en agar sangre formando colonias de 2-3 mm de diámetro. En medio líquido crecen homogéneamente en todo el tubo, creando una turbidez completa.

22

Las diversas tribus, géneros y especies que conforman la familia *Enterobacteriaceae* no pueden ser diferenciados en los medios universales.

Son bacterias que producen sulfuro de hidrógeno (H₂S). Fermentan glucosa por poseer una enzima especializada, pero no lactosa, y no producen ureasa.²³

Epidemiología y tratamiento

Las *Salmonellas* son unas de las enterobacterias que causan importantes afectación en la salud del hombre. Son microorganismos que pasan desde las heces de las personas o animales a otras personas u otros animales. La bacteria vive en el tracto intestinal de los animales y humanos infectados.

Se transmite por contacto directo o contaminación cruzada durante la manipulación, en el proceso de alimentos o en el hogar; así como, por vía sexual.

La enfermedad surge generalmente entre las 6 - 72 h de ser expuesto y puede durar de 5 - 7 días. La infección por Salmonela generalmente no requiere tratamiento a menos que haya una deshidratación grave o que la infección se extienda más allá de los intestinos. ²⁶

La enfermedad varía de leve a severa.

Algunas personas no se sienten enfermas en absoluto, pero aun así pueden infectar a otros.

Algunos síntomas incluyen:

- Dolor de estómago/retortijones abdominales
- Diarrea
- Fiebre
- Náusea y vómitos

Puede manifestarse por fiebre prolongada o recurrente y asociarse a lesiones locales óseas, articulares, pleurales, pulmonares; y con aneurismas micóticas de la aorta abdominal, que es la manifestación observada en pacientes con infección VIH. Se recomienda la ciprofloxacina en dosis de 750 mg dos veces al día. Aparte de estos tratamientos, el de soporte es uno de los más recomendables, es decir, hidratar al paciente constantemente. ²⁶

2.3.3 *Shigella* sp.

Género: *Escherichia-Shigella*

Shigella spp. Es el agente etiológico de la disentería bacilar (shigelosis), una de las causas más frecuentes de diarrea. La relación del ADN de *Shigella* y *E. coli* es muy alta desde el punto de vista de sus reacciones fisiológicas son difíciles de distinguir y serológicamente presentan un alto entrecruzamiento entre ambos grupos.^{16,27}

Caracteres micromorfológicos

Shigella es un género de bacterias con forma de bacilo Gram negativas, no móviles, no formadoras de esporas e incapaces de fermentar la lactosa, que puede ocasionar diarrea en los seres humanos. Al igual que *Salmonella*, *E. coli* y *Klebsiella*, las shigelas se clasifican serológicamente en diferentes serogrupos.¹⁶

Caracteres macromorfológicos

Este microorganismo se presenta en los medios diferenciales y selectivos que contienen lactosa como colonias no fermentadoras de este carbohidrato, por lo cual se utiliza esta característica para la selección de colonias en los cultivos primarios. En el aislamiento de *Shigella* debe tenerse en cuenta que sus células son muy susceptibles a algunos inhibidores que contienen los medios selectivos y de enriquecimiento.²⁷

Shigella es inmóvil y lisina negativa, no produce gas a partir de la glucosa. No utiliza el citrato como fuente de carbono, no fermentan el mucato y no producen hidrólisis de la urea. En el medio agar Kligler-hierro no se observa la producción de H₂S.^{16,27}

Epidemiología:

La shigelosis es de distribución mundial, y es más común en aquellos países donde hay una precaria higiene.

El hombre es tanto reservorio como hospedero de *Shigella*. La infección se contrae; vía oral-fecal, siendo la forma más habitual de adquirir la enfermedad, la transmisión de persona a persona, debido a la baja dosis

infectante. En los países de vía de desarrollo son frecuentes las epidemias por agua y alimentos contaminados así como la transmisión por moscas.

El control de esta enfermedad se hace mejorando las condiciones higiénico-sanitarias; se ha planteado el uso de vacunas para la enfermedad, algunas han resultado efectivas, pero su uso sistemático de ellas no se ha establecido.^{16, 27}

Tratamiento

El tratamiento se plantea que sea la restitución del equilibrio hidro-mineral; el uso de antibióticos no está aconsejado en todos los casos, pues se señala que es una infección auto limitada. La resistencia a los antimicrobianos varía según los países y regiones.

La disentería severa puede ser tratada con ampicilina, TMP-SMX o quinolonas, así como ciprofloxacina.^{16,27}

2.3.5. *Escherichia coli*

Género: *Escherichia*

E. coli es el principal representante de la microbiota normal del hombre y los animales, sin embargo, existen cepas productoras de diarreas que pueden dar lugar a cuadros leves, evolucionar hasta la diarrea persistente u originar complicaciones que pueden llegar hasta la muerte del paciente. De acuerdo a los patrones clínicos, las características epidemiológicas y patogénicas, diferenciación serológica y diferentes formas de interactuar con la mucosa intestinal, la especie *E. coli* se divide en seis clases productoras de diarreas:

- *E. coli* enteropatógena (ECEP)
- *E. coli* enterotoxigénica (ECET)

- *E. coli* enteroinvasiva (ECEI)
- *E. coli* enterohemorrágica (ECEH)
- *E. coli* enteroagregativa (ECEA)
- *E. coli* difusamente adherente (ECDA) ¹⁶

Caracteres micromorfológicos

Como miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram-negativos, no esporulados, que fermentan y oxidan la glucosa y la lactosa, carecen de indol-fenol oxidasa, reducen los nitratos a nitritos y se hayan ampliamente distribuidos por la naturaleza; muchas de sus especies tienen como hábitat el intestino del hombre. Pueden ser móviles por medio de flagelos peritricos. En ocasiones, en cultivos jóvenes, se presentan en forma de cocos bacilares y hasta cocoides. Sus bordes son rectos y sus extremos curvos. El tamaño promedio de la mayoría de estas bacterias oscila entre 0.5-2 µm de ancho y de 2-4 µm de ancho. De acuerdo con sus requerimientos de oxígeno son anaeróbicas facultativas. ¹⁶

Caracteres macromorfológicos

La temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de subespecies es de 37 °C aunque *E. coli* tolera temperaturas hasta de 42 °C.

Los requerimientos de nutrientes en los que crecen estos microorganismos no son extremadamente exigentes. Así, pueden crecer bien desde un agar nutriente, agar-sangre, agar-sangre-chocolate o caldo nutritivo. No obstante, en el diagnóstico de laboratorio se realiza el aislamiento a partir de heces fecales recién emitidas en los primeros 6 días de la enfermedad. El aislamiento se hace en agar Mc Konkey con lactosa con sorbitol donde se observan las colonias blancas por la no utilización de este sustrato. ¹⁶

Epidemiología

Las especies que se encuentran en ella son de las que más frecuentemente se identifican en los laboratorios de microbiología clínica como causa de infecciones tanto comunitarias como nosocomiales.

Las infecciones más frecuentes debidas a *E. coli* son la urinarias. Así mismo, puede originar infecciones de las vías biliares, peritonitis, neumonía, meningitis neonatal y gastroenteritis, entre otras menos importantes. Aunque *E. coli* es un comensal normal del tubo digestivo puede causar infecciones en determinadas circunstancias, como son la emigración desde el intestino al tracto urinario, produciendo infección urinaria baja y eventualmente bacteriemia o infecciones focales por vía hematogena. Aunque la puerta de entrada más común es la urinaria, ello no significa que sea la única que permite el acceso de este germen a la circulación. En presencia de hepatopatía crónica se producen una serie de anastomosis portosistémicas que permiten el acceso de *E. coli* a la circulación general sin pasar por el filtro hepático, lo que puede originar una bacteriemia y facilita el desarrollo de peritonitis espontánea del cirrótico. También esta bacteria puede alcanzar el pulmón desde la faringe, especialmente en pacientes hospitalizados con enfermedades graves, ya que en estos pacientes *E. coli* forma parte de la flora orofaríngea.¹⁶

Tratamiento.

Las gastroenteritis por *E. coli* no precisan casi nunca de tratamiento con antibióticos y en general sólo es necesaria una adecuada hidratación. En las infecciones urinarias bajas no complicadas pueden usarse diferentes antibióticos por vía oral (cefalosporinas de primera o segunda generación, amoxicilina-ácido clavulánico, cotrimoxazol, quinolonas) durante cinco a siete días. Por el contrario, en las infecciones urinarias complicadas y pielonefritis, especialmente si cursan con bacteriemia, es preciso utilizar antibióticos parenterales. La gran mayoría de las cepas de *E. coli* son

actualmente resistentes a la ampicilina, por lo que es necesario el uso de aminoglucósidos o cefalosporinas de segunda o tercera generación en esta situación. La resistencia cada vez mayor a quinolonas puede dificultar en el futuro empleo de estos fármacos.¹⁶

3. Materiales y métodos

Se seleccionó el Manajú, con reportes de acción antibacteriana, antihemorrágica, antirreumático, pero sin efectos comprobados experimentalmente. Esta selección se realizó tomando como criterio la revisión bibliográfica, los respetos populares y la disponibilidad de las mismas.⁵

La biomasa fue recolectada en los alrededores del Parque Nacional “Desembarco del Granma” en estado fresco (verde) y al momento de llegar al laboratorio la misma fue clasificada con el fin de eliminar las que no se encontraban en condiciones óptimas para dicho proceso, luego se procedió al lavado, el cual se realizó tres veces con agua destilada con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de impurezas presentes en el material vegetal, a continuación el material vegetal fue secado mediante dos tipos de secado: el secado natural durante 7 días a temperatura ambiente y el secado artificial que se realizó con la ayuda de una estufa de marca mLw de fabricación alemana a una temperatura de 60 °C por 1 h. Después se realizó un molido el cuál se realiza manualmente con el objetivo de disminuir el diámetro de la masa vegetal hasta llegar a un tamaño adecuado para su posterior empleo. A continuación pesamos el material vegetal con una balanza analítica (SARTORIUS) destinado tanto para tinturas (50 g) y para los extractos (10 g).

3.1. Preparación de formulaciones

3.1.1. Extractos (etéreo, alcohólico, acuoso)

Para la obtención de los diferentes extractos, se pesan 10 g de la muestra en balanza analítica (SARTORIUS), se le realizan extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente (éter de petróleo, alcohol y agua) con la finalidad de lograr un mayor agotamiento del material vegetal seco.

3.1.2. Tintura al 20%

La tintura al 20% fue obtenida después de ser recolectado el material vegetal, secado apropiadamente y tamizado a 0,5 mm de diámetro, utilizando como menstuo alcohol al 70 %. Se utilizaron 50 g de la droga cruda para obtener 250 mL de tintura al 20%. La extracción de las tinturas se realizó por maceración de la droga pulverizada, por un tiempo de 7 días, según Norma Ramal de Salud Pública 312 (1998);²⁸ la Norma Cubana de Salud Pública 313 (1998)²⁹ y el Programa de Medicina Tradicional y Natural (1999).³

Después de realizada la extracción y lograda la homogeneidad y transparencia total de cada producto, se colocó en frasco ámbar para evitar la descomposición de la sustancia activa por acción de la luz, ya que muchas sustancias activas extraídas de plantas son fotosensibles.

3.1.3. Extracto seco

El extracto seco de las hojas del Manajú fue obtenido a partir de la tintura al 20%. Se toma una muestra de 100 mL se lleva a un balón de 500 mL y luego a un roto-evaporador (KIKA-WERKE---RV05-ST, Alemania) para la obtención de masa consistente donde se elimina el solvente a 50 °C y a una velocidad de rotación de 60 rpm.

3.2. Especificaciones de Calidad

La tintura 20 % se deja reposar por tres días en refrigeración y luego es sometida al análisis de calidad, mediante la aplicación de los métodos de ensayos para la determinación de los requisitos de los extractos fluidos y tinturas: determinación del pH, del índice de refracción, de la densidad relativa y de los sólidos totales. El control de calidad de la tintura 20 % fue hecho según la Norma Ramal de Salud Pública 312 (1998)²⁸ y NC 92-02.³⁰

Determinación de pH: Se determina según se establece en la NC 90-13-13³¹ con un pH-metro (HANNA 211, Portugal).

Determinación del índice de refracción

El índice de refracción fue según se establece en la NC 90-13-11³²

Procedimiento: Sobre el prisma de medición de un refractómetro (Abbé YA-2S, China). Se coloca 1 gota de agua, utilizando para ello una varilla de vidrio que no tenga cantos agudos; se espera 10 minutos y se ajusta el instrumento al índice de refracción correspondiente el agua a una temperatura de 25 °C, con una tolerancia de $\pm 0,2$ °C. Se limpian las primas cuidadosamente empleando un algodón humedecido con una solución de alcohol y éter etílico 50 % v/v.

Con la varilla de vidrio se coloca en el prisma fijo, sin tocarlo 1 ó 2 gotas de la muestra de ensayos. Se cierra el doble prisma y se esperan unos minutos antes de efectuar la lectura, hasta que la temperatura sea estable.

Si la muestra de ensayos es de color claro o transparente, se utiliza luz transmitida, o sea, se coloca una gota de la muestra de ensayos sobre el prisma de medición, se cierra el termoprisma y se enfoca la luz a través del prisma de iluminación.

Si la muestra de ensayo es de color oscuro u opaco, se utiliza luz reflejada, o sea, se coloca una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma de medición se cierra el termoprisma y se enfoca la luz por medio del espejo de modo tal que la misma incida sobre la abertura de entrada del prisma de medición.

Determinación de sólidos totales

Procedimiento: De la muestra de ensayos previamente homogenizada se transfieren 5 mL a una cápsula de porcelana limpia, seca y previamente tarada; la cápsula se coloca en un baño de agua y se evapora hasta que el residuo esté aparentemente seco; posteriormente se pasa a una estufa a una temperatura de 105 ± 2 °C durante 3 h.

Se retira la cápsula de la estufa, se coloca en una desecadora hasta que alcance la temperatura ambiente y se pesa. Se repite el proceso anterior, pero empleando solo 60 minutos de secado, las veces necesarias, hasta obtener masa constante.

Expresión de los resultados

Método para cálculos: los sólidos totales S_t se calculan mediante la fórmula siguiente.

$$S_t = (P_r - P/V)100$$

Dónde:

P_r: Masa de la cápsula más el residuo (g)

P: Masa de la cápsula vacía (g)

V: Volumen de la porción de ensayos (mL)

100: Factor matemático

Aproximación de los resultados e informe: El ensayo se realiza por duplicado.

Los valores se aproximan hasta la décima. Se informa la cantidad de sólidos totales g / 100 mL.

3.3. Metodología del Tamizaje Fitoquímico

Como paso lógico de la ruta crítica para la investigación científica de los productos naturales, se realizó el análisis de la composición fitoquímica de los extractos de las partes de la planta en experimentación.

El tamizaje fitoquímico fue realizado en el Laboratorio de Productos Naturales del Centro de Estudio de Química (CEQA) de la Universidad de Granma, utilizando la metodología para el tamizaje fitoquímico de plantas

medicinales reportada por Payo (2001),³³ Sandoval (1990)³⁴ y Peña (2002).¹

A los diferentes extractos se le realizaron los ensayos que a continuación se relacionan.

Extracto etéreo

Se concentran a sequedad cada una de las fracciones y se llevan a cabo los siguientes ensayos:

- Ensayo de Dragendorff y Mayer (alcaloides)
- Ensayo de Baljet (coumarinas)
- Ensayo de Sudán III (ácidos grasos)

Extracto alcohólico

- Ensayo de Resinas
- Ensayo de Liebermann- Burchard (triterpenos y/o esteroides)
- Ensayo de Espuma (saponinas)
- Ensayo de Ninhidrina (aminoácidos libres)
- Ensayo de Dragendorff y Mayer (alcaloides)
- Ensayo de Baljet (coumarinas)
- Ensayo de Fehling (carbohidratos reductores)
- Ensayo de cloruro férrico (fenoles y/o taninos)
- Ensayo de Borntrager (quinonas)
- Ensayo de Shinoda (flavonoides)

- Ensayo de antocianidinas

Extracto acuoso

- Ensayo de Espuma (saponinas)
- Ensayo de Fehling (carbohidratos reductores)
- Ensayo de Shinoda (flavonoides)
- Ensayo de cloruro férrico (fenoles y/o taninos)
- Ensayo de Dragendorff y Mayer (alcaloides)
- Ensayo de mucílagos

Descripción de los ensayos a realizar:

Ensayo de Sudán III:

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos, para lo cual a la alícuota de la fracción en el solvente de extracción se le añade 1 mL de una solución diluida en agua del colorante Sudán III o Sudán IV. Se calienta en baño de agua hasta evaporación del solvente.

La presencia de compuestos grasos se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos, respectivamente.

Ensayo de Dragendorff:

Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, si la alícuota está disuelta en un solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de HCl (1%). Si el extracto es acuoso a la alícuota se le añade una gota de ácido clorhídrico concentrado, se calienta suavemente y se deja enfriar hasta acidez. Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo añadiendo 3 gotas del

reactivo de Dragendorff. Si hay opalescencia se considera positivo (+), turbidez definida (++) y precipitado (+++).

Ensayo de Mayer:

Permite también identificar alcaloides se procede de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida. Se añade una pizca de NaCl en polvo, se agita y filtra. Se añaden 2 o 3 gotas de la solución reactiva de Mayer, si se observa opalescencia (+), turbidez definida (++) , precipitado coposo (+++).

Observación: En el caso de alcaloides cuaternarios y/o **aminoácidos** libres, estos solo se encontrarán en el extracto acuoso y para considerar su presencia la reacción debe ser (++) o (+++) en todos los casos, ya que un resultado (+) puede provenir de una extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias.

Ensayo de Wagner:

Se parte al igual que en los casos anteriores de la solución ácida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo, clasificando los ensayos de la misma forma.

Ensayo de Baljet:

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular coumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo el ensayo. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1 mL). En estas condiciones se adiciona 1 mL de reactivo, considerándose la aparición de una coloración (+) y un precipitado (++) .

Ensayo de Borntrager:

Permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de NaOH, KOH o NH₄OH al 5% en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación. Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado a rojo, el ensayo se considera positivo (+), coloración rosada (++), coloración roja (+++).

Ensayo de Liebermann- Burchard:

Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, ya que ambos tipos de productos poseen un núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5 - 6. Para ello si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo se dejan correr 2 - 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio de coloración:

1. Rosado- azul muy rápido.
2. Verde intenso, visible aunque rápido.
3. Verde oscuro- negro, final de la reacción.

A veces el ensayo queda en dos fases o desarrollo de color. Muy pocas veces puede observarse el primer cambio. El tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos. Esta reacción también se emplea para diferenciar las estructuras esteroidales de las triterpénicas, las primeras producen coloraciones que van desde azul a azul verdoso, mientras que para las

segundas se observa rojo, rosado o púrpura. Estas coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantofilas y esteroides saturados que puedan estar presentes.

Observación: Para realizar este ensayo no puede haber agua en el medio de reacción, ya que con el ácido sulfúrico puede reaccionar de forma violenta.

Ensayo de Resinas:

Para detectar la presencia de resinas, adicione a 2 mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada. La aparición de un precipitado indica un ensayo positivo.

Ensayo de Fehling:

Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1-2 mL de agua. Se adicionan 2 mL del reactivo (recién preparado) y se calienta en baño de agua de 5-10 min El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece un precipitado rojo.

Ensayo de Espuma:

Permite reconocer la presencia de saponinas, tanto del tipo esferoidal como triterpénicas. De modo que si la alícuota se encuentra en etanol, se diluye en 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 min El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de espesor o altura y persiste por más de 2 min

Ensayo de Cloruro Férrico:

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos. Si el extracto de la planta se realiza con etanol el ensayo determina tanto

fenoles como taninos; a una alícuota del extracto etanólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica. Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos; a una alícuota del mismo se le añade acetato de sodio para neutralizar y 3 gotas de la solución reactiva. Un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- Desarrollo de una coloración rojo – vino, compuestos fenólicos en general.
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

Ensayo de Ninhidrina:

Permite reconocer la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general. Se toma una alícuota del extracto en alcohol, o el residuo de la concentración en baño de agua si el extracto se encuentra en otro solvente orgánico, se mezcla con 2 mL de la solución de ninhidrina al 2%. La mezcla se calienta durante 10 min en baño de agua. Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color violáceo.

Ensayo de Shinoda:

Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en etanol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálica. Después de la reacción se esperan 5 min, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que las mismas se separen. Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado. El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en todos los casos.

Ensayo de Antocianidinas:

Permite identificar en los extractos la presencia de estas estructuras de secuencia C₆-C₃-C₆ del grupo de los flavonoides. Se calientan 2 mL del extracto en etanol durante 10 min con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado. Se deja enfriar y se adiciona 1 mL de agua y 2 mL de alcohol amílico. Se agita y se espera a que las dos fases se separen. La aparición de un color rojo a marrón en la fase amílica es indicativa de un ensayo positivo.

Ensayo de Mucílagos:

Permite reconocer en un extracto la presencia de estructuras tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa, que aumenta la densidad del agua donde se extrae. Para ello una alícuota del extracto en agua se enfría de 0-5 °C y si la solución toma una consistencia gelatinosa el ensayo es positivo.

Además de los ensayos anteriormente relacionados, pueden a modo de reafirmación o diferenciación realizarse otros que permitan establecer estos criterios.

3.4. Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de Manajú.

Para la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos secos de hojas de Manajú se empleó el método de difusión en agar por diseminación superficial en disco (*Bauer-Kirby*) con algunas modificaciones. Este método fue publicado por la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) y la *Organización Mundial de la Salud* (**WHO**, del inglés, *World Health Organization*) y adoptada por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (**CLSI**, antes NCCLS) como norma de aceptación general.³⁵

Principio

El disco impregnado en antibiótico (o extracto vegetal) hace contacto con la superficie del agar. El agua es absorbida por el papel de filtro y el antibiótico difunde hacia el medio circundante. La velocidad de difusión del antibiótico (o extracto vegetal) fuera del disco es mayor que la de su difusión hacia el medio, de modo que la concentración del antibiótico inmediatamente adyacente al disco puede exceder la del mismo disco. Sin embargo, a medida que aumenta la distancia al disco, ocurre una reducción logarítmica de la concentración del antibiótico hasta que se llega a un punto en el que el desarrollo bacteriano de la superficie del agar ya no es inhibido. El resultado es una zona de inhibición del desarrollo microbiano con bordes bien definidos denominado *halo de inhibición*.¹⁶

Procedimiento

Microorganismos evaluados

Las cepas utilizadas en el ensayo de actividad antibacteriana son de referencia internacional, depositadas en el *American Type Culture Collection (ATCC)* y forman parte de una batería mínima de cepas que se emplean para este tipo de estudios y se relacionan a continuación: *Escherichia coli* (ATCC 113-3), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC), *Staphylococcus aureus* (ATCC) y *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), esta última no patógena.

También se emplearon dos cepas salvajes de *Salmonella* sp. Y *Shigella* sp., aisladas en el Centro de Higiene y Epidemiología de Manzanillo, Granma, de pacientes con afecciones gastrointestinales.

Preparación de los discos de antibióticos empleados

Se emplearon discos de antibióticos comerciales (Sensi-Disc™, Francia) de amplio espectro para cepas bacterianas. En este sentido se emplearon discos de Gentamycin (**CN**) de 30 µg y Chloranphenicol © de 30 µg.

Para la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos secos de hojas de Manajú se resuspendieron 0,6 g de los extractos secos en 1 mL de etanol al 70 % para una concentración final de 600 µg/mL. A partir de esta solución *stock* se prepararon 3 soluciones de 25 µg/mL, 50 µg/mL y 100 µg/mL de concentración. De cada una de estas tres soluciones se aplicaron 10 µL en discos de papel de filtro (pb, sa, Brasil) de 7 mm de diámetro para una concentración final de 250, 500 y 1000 µg/disco de extracto seco. Una vez cargados los discos con cada una de las soluciones se dejaron secar a 50°C por 15 min antes de dispensarlos en las placas inoculadas.

Como control negativo se emplearon discos de papel de filtro de 7 mm de diámetro cargados con 10 µL de etanol al 70 %, que fue el solvente empleado en la preparación de las soluciones a evaluar. Estos sufrieron los mismos procedimientos que los extractos vegetales a evaluar.

Preparación de los inóculos

Se tomaron de tres a cinco colonias semejantes y se trasladaron con un asa de inoculación a 4-5 mL de caldo nutriente (Biocen, Cuba). Los cultivos en caldo se incubaron en agitación a 100 rpm en una zaranda (MLW, Alemania) y 35±2°C durante 2 – 6 h. La turbidez de los mismos se ajustó equivalentemente al patrón de turbidez 0,5 de McFarland para una concentración de aproximadamente 1 – 2 x 10⁸ UFC/mL.

Inoculación de las placas de agar y dispensación de los discos de antibióticos

Se tomó un hisopo estéril y se llevó a la suspensión, se eliminó el exceso de líquido presionando y rotando el hisopo sobre las paredes del tubo por encima del nivel del líquido. Se estrió la superficie del medio agar Mueller-Hinton, contenido en placas petri (Alumbra, China) de 90 mm de diámetro, en tres direcciones con 60° de diferencia entre ellas para obtener una siembra uniforme en césped. Se dejó secar la placa de 3-5 min

Posteriormente se depositaron los discos de antibióticos en la placa petri, inoculada con la suspensión bacteriana, empleando una pinza (Bochem Stainless, Inland) estéril. Los discos se colocaron a una distancia no menor de 10 mm del borde de la placa y una separación entre ellos no menor de 30 mm para evitar la superposición de los halos de inhibición. Las placas se incubaron a 35 ± 2 °C por un período de 16-18 h en una incubadora (Sartorius, China).

Evaluación de los resultados

La zona de inhibición es el área que rodea al disco donde el crecimiento ha sido completamente inhibido. Los resultados se expresaron como el diámetro del halo de inhibición del crecimiento, medido en mm, con una regla milimetrada (Wenquan, China).

Análisis estadístico

Se empleó un ANOVA de clasificación simple en la comparación de varias muestras por el test de Fisher, en los casos en que hubo diferencias estadísticamente significativas para un valor de $p < 0.05$ se realizó un test de rangos múltiples para determinar las medias que diferían. El método utilizado para discernir entre las medias fue el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (**LSD**).

4. Resultados y discusión

4.1. Tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico, acuoso, seco y tintura 20 % del Manajú.

Las propiedades farmacológicas de los extractos naturales obtenidos de plantas medicinales dependen de la composición de metabolitos secundarios y de la concentración de los mismos. Como resultado de la determinación de la composición fitoquímica de los extractos empleados tenemos los siguientes resultados:

Tabla 1. Tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso

Manajú	Extracto etéreo	Extracto alcohólico	Extracto Acuoso
Saponinas	°	+	-
Flavonoides	°	+	-
Aminoácidos libres	°	-	°
Quinonas	°	+++	+++
Triterpenos y/o esteroides	°	-	°
Coumarinas	++	++	°
Fenoles y/o taninos	°	+	°
Resinas	°	-	°

Antocianidinas	°	+	°
Carbohidratos reductores	°	+	+
Alcaloides (w)	°	+++	°
Alcaloides (M)	++	+++	-
Ácidos Grasos	+	°	°
Mucílagos	°	°	-

Leyenda:

(-) = Ausencia; (+) = Presencia; (++) y (+++) = Abundante, (°) = No realizado

En la tabla 1 se muestran los resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos etéreo, alcohólico y acuoso donde se muestra la alta variabilidad de metabolitos secundarios presentes en las hojas del Manajú, tales como: alcaloides, coumarinas, quinonas, saponinas, flavonoides, triterpenos y/o esteroides, fenoles y taninos; siendo estos los posibles responsables de la actividad antibacteriana.

Es importante destacar que en el extracto alcohólico es donde se encuentran disueltos la mayor cantidad de metabolitos que posee la planta, por esta razón es escogido como solvente ideal para la preparación de formulaciones.

4.2. Comparación del tamizaje fitoquímico de la tintura 20 % y el extracto seco.

Tabla 2. Comparación del tamizaje fitoquímico de la tintura 20% y extracto seco.

Manajú	Tintura 20%	Extracto seco
Saponinas	+	+
Flavonoides	+	+
Aminoácidos libres	-	-
Quinonas	+++	+++
Triterpenos y/o esteroides	++	+
Coumarinas	-	+
Fenoles y/o taninos	+	+
Resinas	-	-
Antocianidinas	+	+
Carbohidratos reductores	+	+

Alcaloides (w)	++	++
Alcaloides(M)	+++	++

Leyenda:

(-) = Ausencia; (+) = Presencia; (++) y (+++) = Abundante

En la **tabla 2** se muestran los resultados del estudio fitoquímico que se le realizó a la tintura 20 % y al extracto seco, observando que ambas son muy ricas en metabolitos secundarios, predominando las quinonas y alcaloides.

Se comprueba que la composición de la tintura y el extracto seco se mantienen similares con excepción de las coumarinas que no se detectan en la tintura y si en el extracto, como consecuencia del aumento de la concentración en el extracto seco.

4.3. Control de la calidad realizado a la tintura 20 %

Tabla 3. Control de calidad de la tintura 20%.

Planta	Sólidos Totales (%)	Índice de refracción	pH
Manajú (Hojas)	4,808	1,3678	5,06

En la tabla 3 se muestran los resultados de la determinación de los controles de calidad de la tintura 20% de las hojas del Manajú. La cual fue tomada como materia prima para la obtención de los extractos secos, estos resultados están en los rangos de calidad que establecen las normas establecidas^{31, 32} esto garantiza el empleo óptimo de la misma, el valor de los sólidos totales es de 4,808 lo que indica una concentración adecuada de principios activos, el pH se estabilizó por debajo de 7, lo que muestra que son soluciones ligeramente ácidas, hecho éste que unido al medio alcohólico permite su estabilización y conservación.

Esto fue corroborado por el análisis de calidad de las muestras testigos, después de un período de seis meses de reposo sin observarse la formación de sólidos. Se comprobó que los parámetros de calidad mostrados en la tabla 3 se mantienen constantes indicando que la composición y la calidad de las mismas no varían durante este período, lo que se considera como garantía de calidad para las condiciones del experimento.

4.4. Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de Manajú.

Para la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos secos de hojas de Manajú se empleó el método de difusión en agar por diseminación superficial en disco (*Bauer-Kirby*). Este método fue adoptado por el *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, antes NCCLS)* como norma de aceptación general.³⁵

Las cepas utilizadas en el ensayo de actividad antibacteriana son de referencia internacional, depositadas en el *American Type Culture Collection (ATCC)* e incluyen *Escherichia coli* (ATCC 113-3), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) y *Staphylococcus aureus* (ATCC). También se emplearon dos cepas salvajes de *Salmonella* sp. y *Shigella* sp., aisladas de pacientes con infecciones gastrointestinales.

En este ensayo se emplearon discos de antibióticos comerciales como controles positivos y discos de papel de filtro (7 mm de diámetro) conteniendo el solvente, empleado en la preparación de las soluciones de los extractos secos de hojas de Manajú (etanol al 70 %), como control negativo. Se evaluaron tres concentraciones de los extractos secos de hojas de Manajú preparadas en diluciones dobles. A partir de tres soluciones de 25 µg/mL, 50 µg/mL y 100 µg/mL de concentración se depositaron 10 µL de cada una en discos de papel de filtro (7 mm de diámetro) para una concentración final de 250, 500 y 1000 µg/disco. Los resultados se evaluaron por la medición en milímetros (mm) del diámetro del halo de inhibición que aparece alrededor del disco.

En la figura 1 se muestran los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos secos de hojas de Manajú frente a 6 cepas bacterianas. En esta figura se evidencia que los controles positivos presentan halos de inhibición entre 15 - 23 mm de diámetro (Anexo 1), que según la tabla de clasificación de la susceptibilidad de los microorganismos (Anexo 3), publicada por el CLSI, las cepas de *Escherichia coli* (ATCC 113-3), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC), *Salmonella* sp. y *Staphylococcus aureus* (ATCC) son susceptibles (**S**) mientras que las cepas de *Shigella* sp. y *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) tienen sensibilidad intermedia (**I**) a ellos.³⁶

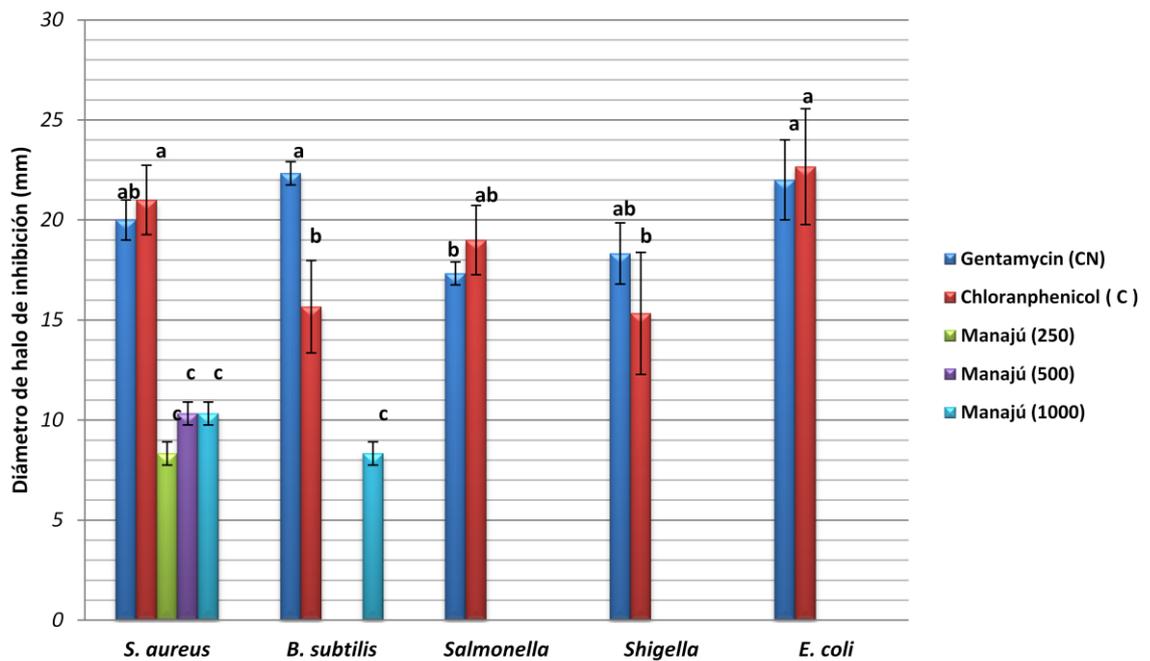


Figura 1. Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos secos de hojas de Manajú, mediante el método de difusión superficial en disco (Bauer-Kirby) frente a 5 cepas bacterianas de interés clínico. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

Se evidencia también que el extracto seco de hojas de Manajú tiene actividad antibacteriana frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC) a las concentraciones de 250, 500 y 1000 $\mu\text{g}/\text{disco}$ y a la cepa de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), a la concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{disco}$, con halos de inhibición de 8, 10, 10 y 8 mm de diámetro, respectivamente. Estos resultados, conjuntamente con la ausencia de halo de inhibición alrededor del disco conteniendo etanol al 70 % (control negativo), nos sugieren que las hojas de Manajú presentan metabolitos secundarios, solubles en etanol al 70 %, con actividad antibacteriana frente a bacterias Gram +. En este sentido nuestros resultados son similares a los obtenidos por Mothana *et al* (2009)³⁷ quienes concluyeron que los extractos vegetales evaluados tenían actividad antibacteriana principalmente frente a bacterias Gram + y que sólo para dos de las 26 plantas evaluadas se obtuvieron resultados positivos frente a bacterias Gram -, lo cual nos

sugiere que nuestros resultados no son consistentes con otros reportes en la literatura.

A partir de estos resultados se pudo constatar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los efectos de ninguna de las concentraciones de extracto de Manajú evaluadas para la cepa de *S. aureus*. Estos resultados sugieren que a mayores concentraciones de extracto seco de hojas de Manajú no se obtendrán mejores resultados frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC). En el caso del *Staphylococcus aureus* (ATCC) estos resultados pudieran explicarse teniendo en cuenta que los sistemas biológicos presentan una concentración de saturación de la actividad, basado en que el mecanismo de acción del principio activo pudiera estar mediado por reconocimiento molecular y no por acción inespecífica.

Los extractos de Manajú a las tres concentraciones evaluadas mostraron diferencias estadísticamente significativas para la cepa de *B. subtilis*, específicamente, sólo la disolución de 100 µg/mL de concentración mostró un efecto antibacteriano frente a esta cepa. Estos resultados sugieren que es probable que se obtengan mejores resultados ante esta cepa aplicando mayores concentraciones de extracto seco de Manajú.

Estos resultados también pudieran estar influidos por la sensibilidad y principio del método empleado ya que, a medida que aumenta la distancia al disco, ocurre una reducción logarítmica de la concentración del antibiótico hasta que se llega a un punto en el que el desarrollo bacteriano de la superficie del agar ya no es inhibido.¹⁶ En este sentido, es de esperar que al aumentar la concentración del principio activo sea mayor el diámetro de inhibición correspondiente, sin embargo, se debe tener en cuenta que la solubilidad en agua de los principios activos pueda no ser la mejor, por lo que pudiera estar afectando los procesos de difusión y por tanto enmascarando los resultados. Por lo antes expuesto, es probable que empleando otro método de evaluación de la actividad antibacteriana como los basados en diluciones seriadas en caldo, mediante los cuales se

determina la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Mínima Bactericida (MCB), se obtengan resultados diferentes.

Aunque la clasificación de las cepas de *S. aureus* y *B. subtilis* frente a los extractos secos evaluados es resistente (R) a diferencia de los antibióticos comerciales evaluados ante los cuales estas cepas tienen susceptibilidad intermedia o son completamente susceptibles, los resultados obtenidos no son desalentadores por cuanto hay que tener en cuenta la posible diferencia de concentraciones de los principios activos entre los discos de antibióticos comerciales y los que contienen los extractos secos de hojas de Manajú. En este sentido, los discos comerciales contienen el principio activo con altos niveles de pureza en tanto para los discos de papel de filtro que contienen los extractos vegetales las concentraciones reportadas se refieren a la masa de sustancias solubles en etanol. Entre las familias de compuestos químicos que se encontraron en las hojas de Manajú se encuentran: saponinas, flavonoides, coumarinas, fenoles y/o taninos, antocianidinas, alcaloides y quinonas, identificadas en este trabajo.

Es de gran importancia conocer los principios activos responsables de la actividad antibacteriana de los extractos secos de las hojas de Manajú, por lo que se debe trabajar en el aislamiento y purificación de ellos para probar su verdadero potencial antibacteriano. No obstante, es posible sugerir que la mayoría de las familias químicas identificadas en el tamizaje fitoquímico de los extractos secos de hojas de Manajú pudieran contener ejemplares con posible actividad antibacteriana.^{37, 38, 39, 40, 41} Es de destacar que los compuestos químicos pertenecientes a la familia de las quinonas y los alcaloides son los más abundantes en estos extractos de Manajú, por lo que es posible que estas familias de compuestos químicos sean las principales responsables de la actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *B. subtilis*.

Los resultados de la actividad antiestafilocócica de los extractos secos de hojas de Manajú son similares a los obtenidos por Bhandari *et al* (2000)⁴²

frente a *Staphylococcus aureus* quienes emplearon discos con 1 mg/disco de extracto seco de *Berberis asiática*.

En la actualidad no existe una organización o institución que legisle o estandarice las concentraciones de extractos secos vegetales a emplear en la evaluación de la actividad antibacteriana de las plantas medicinales por el método de difusión superficial en disco (*Bauer-Kirby*). Es por ello que en la literatura aparecen valores de diámetros de inhibición del crecimiento bacteriano que difieren mucho, unos de otros, sin embargo hay que tener muy presente las concentraciones empleadas para ellos.

En este sentido, los estudios realizados por Mothana *et al* (2009)³⁷ con 26 especies de plantas pertenecientes a 17 familias botánicas diferentes, en los cuales se realizaron extracciones con metanol, los resultados arrojaron que 23 de estas plantas mostraron actividad antiestafilocócica y que sólo 11 de ellas tuvieron actividad antibacteriana frente a *B. subtilis*, con halos de inhibición entre 8 - 31 mm y 21 mm de diámetro, respectivamente. No obstante, estos autores emplearon concentraciones 16 y 4 veces mayores que la mínima concentración efectiva en nuestros estudios para *S. aureus* y *B. subtilis*, respectivamente.

Así mismo, en un amplio estudio realizado por Duraipandiyan *et al* (2006),⁴³ en la India, con 18 especies de plantas medicinales de ese país frente a 9 cepas bacterianas se muestran resultados similares a los obtenidos en nuestro trabajo. En este sentido, para 3 de las plantas evaluadas por los autores no se encontraron principios activos solubles en metanol con actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, resultando mejores nuestros resultados en cuanto al posible empleo de estas plantas en el tratamiento de enfermedades estafilocócicas. Por otro lado, aunque el resto de las plantas evaluadas presentaron actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* para la fracción metanólica, para la mínima concentración (1,5 mg/disco) que emplearon los autores en los ensayos de actividad antibacteriana, que es la más similar a la máxima concentración que empleamos en nuestra

investigación, solo tres de las 18 plantas evaluadas mostraron halos de inhibición y diámetros muy similares a los obtenidos en nuestra investigación. Así mismo, los resultados obtenidos por los autores para *B. subtilis* revelaron que sólo dos de las plantas estudiadas mostraron actividad antibacteriana ante este microorganismo a la concentración de 1,5 mg/disco. Por lo antes expuesto, podemos destacar que nuestros resultados son muy promisorios por cuanto a concentraciones tan bajas como 0,25 mg/disco se obtienen halos de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* semejantes a los obtenidos para estas tres plantas mencionadas anteriormente. En este sentido, si tenemos en cuenta que para las 12 plantas restantes la actividad antiestafilocócica se evidencia con concentraciones superiores a 2,5 mg/disco, lo cual representa una concentración 10 veces mayor que la mínima concentración a la cual se observó la actividad antiestafilocócica en nuestro estudio, podemos afirmar que sería mucho más rentable el empleo de formulaciones farmacéuticas preparadas a partir de la hojas de Manajú que las preparadas a partir de cualquiera de las 12 plantas antes tratadas.

Aunque *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) no es un microorganismo de interés clínico fue evaluado en este trabajo por ser una bacteria Gram + al igual que *Staphylococcus aureus* (ATCC) y como el resto (4 del total) de los microorganismos evaluados son Gram -, nos propusimos tener criterios para sugerir un posible mecanismo de acción general de los principios activos. En este sentido, como los extractos secos de hojas de Manajú sólo mostraron actividad antibacteriana frente a *S. aureus* y *B. subtilis* y no así frente a las bacterias Gram -, entonces podemos proponer que los principios activos tengan un mecanismo de acción específico frente a las bacterias Gram + como lo tiene, por ejemplo, la penicilina, que afecta solamente a las bacterias Gram +. Adicionalmente se pone de manifiesto como aunque los extractos secos de Manajú mostraron actividad antibacteriana frente a las dos cepas de bacterias Gram +, las mínimas concentraciones efectivas fueron muy diferentes. En este sentido se

observa cómo estos extractos son más efectivos frente a *S. aureus* que frente a *B. subtilis*. Estos resultados pudieran explicarse sobre la base del conocimiento de que los compuestos químicos requieren de una concentración umbral a partir de la cual se activa su acción biológica y que es diferente para diferentes sistemas biológicos.

No obstante, es preciso realizar evaluaciones de la actividad antibacteriana frente a otras cepas bacterianas para poder llegar a una conclusión más fundamentada.

5. Conclusiones

1. Se obtuvieron los extractos (etéreo, etanólico, acuoso), tintura al 20% y extracto seco, determinándose la composición fitoquímica preliminar y se comprobó que en este predominan alcaloides, coumarinas, ácidos grasos, flavonoides, quinonas, fenoles, antocianidinas y carbohidratos reductores.
2. Se determinó las especificaciones de la calidad de tinturas al 20% las cuales se encuentran dentro de los rangos establecidos dentro de las normas NR313.
3. Se demostró que la composición del extracto seco es similar al de la tintura al 20% con excepción de coumarinas.
4. Se demostró mediante ensayos biológicos que el extracto seco tiene acción antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.

6. Recomendaciones

1. Determinar la Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) y la Mínima Concentración Bactericida (MBC) de los extractos del Manajú para las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.
2. Evaluar las formulaciones farmacéuticas de las hojas del Manajú en pacientes afectados por enfermedades producida por *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.
3. Realizar estudios de toxicidad a los extractos de la planta estudiada.
4. Ampliar los estudios *in vitro* a otros microorganismos no empleados en dicho estudio especialmente a bacterias Gram +.
5. Aislar y purificar los principios activos responsables de la actividad antibacteriana.
6. Realizar el estudio de la actividad antifúngica de las hojas del Manajú.
7. Realizar estudios *in vivo* para corroborar las observaciones *in vitro*.

7. Bibliografía

1. Peña, R. A., “Algunas consideraciones sobre el empleo de productos naturales en la medicina natural y tradicional”, Monografía, **2002**, Bayamo.
2. <http://www.geosalud.com/medicinanatural/Medicina%20Natural.htm>, Domingo 6/05/10 Hora 2:30 pm.
3. Programa Nacional de Medicina Tradicional y Natural, Ministerio de Salud Pública, Septiembre **1999**.
4. www.maca-peruana.com/analisis.htm, Domingo 9/05/10 Hora 3:30 pm.
5. Roig, J. T., “Plantas medicinales aromáticas o venenosas de Cuba”, *Tomo II*, Editorial Científico-Técnica, La Habana, **1988**, 605-606.
6. Colectivo de autores, “Plantas medicinales”, FITOMED III, Editorial Ciencias médicas, La Habana, **1994**.
7. http://es.wikipedia.org/wiki/Rheedia_aristata, Domingo 9/05/10 Hora 2:30 pm.
8. http://toptropicals.com/catalog/uid/rheedia_aristata.htm, Domingo 9/05/10 Hora 3:15 pm.
9. <http://www.azurina.cult.cu/sitios/patrimonio/museos/gallego/plantas/manaju.htm>, Domingo 9/05/10 Hora 3:30 pm.
10. Cuellar, A., “Química de los fármacos naturales”, Editorial Universitaria, La Habana, **2002**.
11. http://es.wikipedia.org/wiki/Metabolitos_secundarios_de_las_plantas
12. Plantas medicinales Universidad para todos, Editorial Abril, 13-16.
13. www.dsalud.com/fitoterapia_numero17.htm Domingo 24/05/10 Hora 3:30 pm.
14. Abad, G. Cuba, F., *et al.*, “Monografía de metabolismo secundario” Universidad de Granma, **2004**.
15. Enciclopedia Encarta, **2009**.
16. Llop A. H., *et al.* Microbiología y Parasitología Médicas, La Habana, Editorial Ciencias Médicas, **2001**.
17. http://es.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus

Domingo 9/05/10 Hora 6:09 pm

18. http://www.medicosecuador.com/espanol/articulos_medicos/122.htm

Domingo 09/05/10 Hora 6:30 pm

19. <http://www.netdoctor.es/XML/verArticuloMenu.jsp?XML=000534>

domingo 09/05/10 hora 6:45 pm

20. http://es.wikipedia.org/wiki/Bacillus_subtilis jueves 27/05/10 hora: 15.50 pm.

21. <http://es.wikipedia.org/wiki/Salmonella> Jueves 27/05/10 hora 14:32 pm.

22. <http://www.aibarra.org/Guias/7-25.htm> Jueves 27/05/10 Hora: 15.15 pm

23. http://www.health.state.ny.us/es/diseases/communicable/salmonellosis/fact_sheet.htm Jueves 27/05/10 hora 14:42 pm

24. http://www.co.marion.or.us/NR/rdonlyres/3B61B171-9704-484E-BF4E-D852C780E9E9/0/Spanish_Salmonella408.pdf Jueves 27/05/10 hora 14:32 pm

25. http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9562%2526ISID%253D457,00.html Jueves 27/05/10 hora 15:32 pm

26. http://www.fsis.usda.gov/es/Salmonella_Preguntas_y_Respuestas/index.asp Jueves 7/05/10 hora 14:40 pm

27. <http://es.wikipedia.org/wiki/Shigella> Viernes 11/06/10 hora 11:30 am

28. Norma Ramal de Salud Pública 312, “Métodos de ensayos para la determinación de los requisitos de los extractos fluidos y tinturas”, La Habana, **1998**.

29. Norma Cubana Salud Pública 313, Métodos de ensayos a partir de drogas crudas, Salud Pública, **1998**.

30. 13-NC 92-02 Control de la calidad. Muestreo de líquidos.

31. 14-NC 90-13-13 Aseguramiento metrológico. Medidores de pH. Reglas generales para efectuar mediciones de pH.

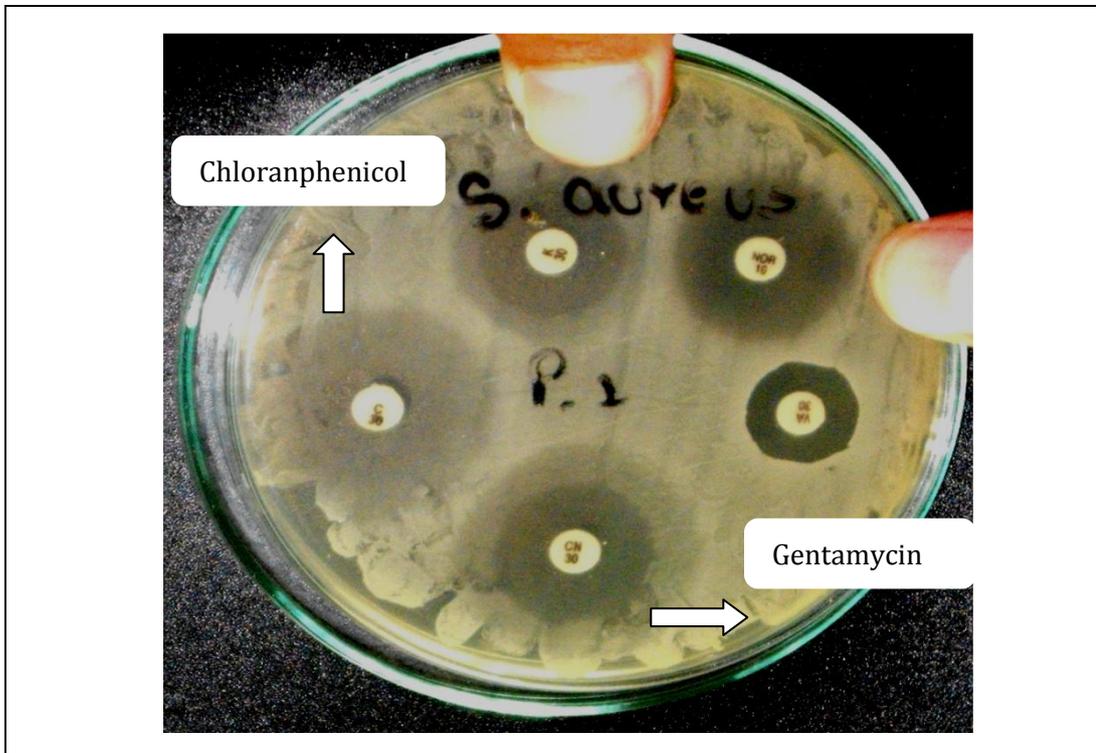
32. 15-NC 90-13-11 Aseguramiento metrológico. Refractómetros. Reglas generales para efectuar determinaciones refractométricas.

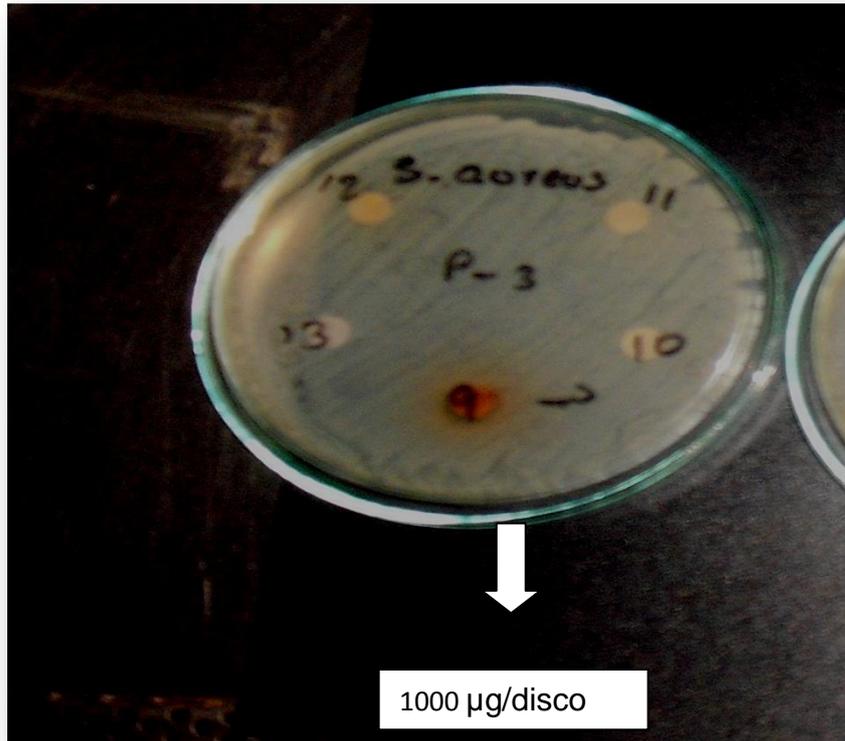
33. Payo, A., “Tamizaje Fitoquímico del *Croteun L.* Revista Cubana de Farmacia”, Ciudad de la Habana, **2001**, 35 (3).

34. Sandoval, D. y Suárez, O., “Estudio Fitoquímico preliminar de detección de alcaloides y saponinas en plantas que crecen en Cuba”, **1990**, *24(2)*, 288-296.
35. Clinical and Laboratory Standards Institute, M100-S17 (M2). Disk Diffusion Supplemental Tables, *CLSI*, Wayne Pa, **2007**.
36. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S17 (M2). Disk Diffusion Supplemental Tables, *CLSI*, Wayne Pa. **2007**.
37. Mothana, R. A, Lindequist, U., Gruenert, R. and Bednarski, “Studies of the *in vitro* anticancer, antimicrobial and antioxidant potentials of selected Yemeni medicinal plants from the island Soqatra”, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **2009**, 9: 7.
38. Nweze, EL, Okafor JI and Njoku O., “Antimicrobial activities of methanolic extracts of *Trema guineensis* (Schumm and Thorn) and *Morinda Lucida* Benth used in Nigeria herbal medicinal practice”, *Journal of Biological Research and Biotechnology*, **2004**, 2 (1), 36-39.
39. Cowan M. M., “Plant products as antimicrobial agents”, *Clinical Microbiology Reviews*, **1999**, 12, 564-582.
40. Camarada L., Dayton T., Di Stefano V., Pitonzo R., Schillaci D., “Chemical composition and antimicrobial activity of some oleogum resin essential oils from *Boswellia* spp. (Bursaceae)”. *Ann Chim*, **2007**, 97 (9), 837-844.
41. Madureira, A. M., Ascenso, J. R., Valdeira, L., Duarte, A., Frade, J. P., Freitas, G., Ferreira, M. J., “Evaluation of the antiviral and antimicrobial activities of triterpenes isolated from *Euphorbia segetalis*”, *Nat Prod Res* **2003**, 17 (5), 375-380.
42. Bhandari, D. K., Nath, G., Ray, A. B. and Tewari, P. V., “Antimicrobial activity of crude extracts from *Berberis asiatica* stem bark”, *Pharmaceutical Biology*, **2000**, 38(4), 254-57.
43. Duraipandiyar, V., Ayyanar, M. and Ignacimuthu, S., “Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India”, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **2006**,

ANEXO 1: Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos secos (250, 500 y 1000 $\mu\text{g}/\text{disco}$) de hojas de Manajú, mediante el método de difusión superficial en disco (Bauer-Kirby) frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC).

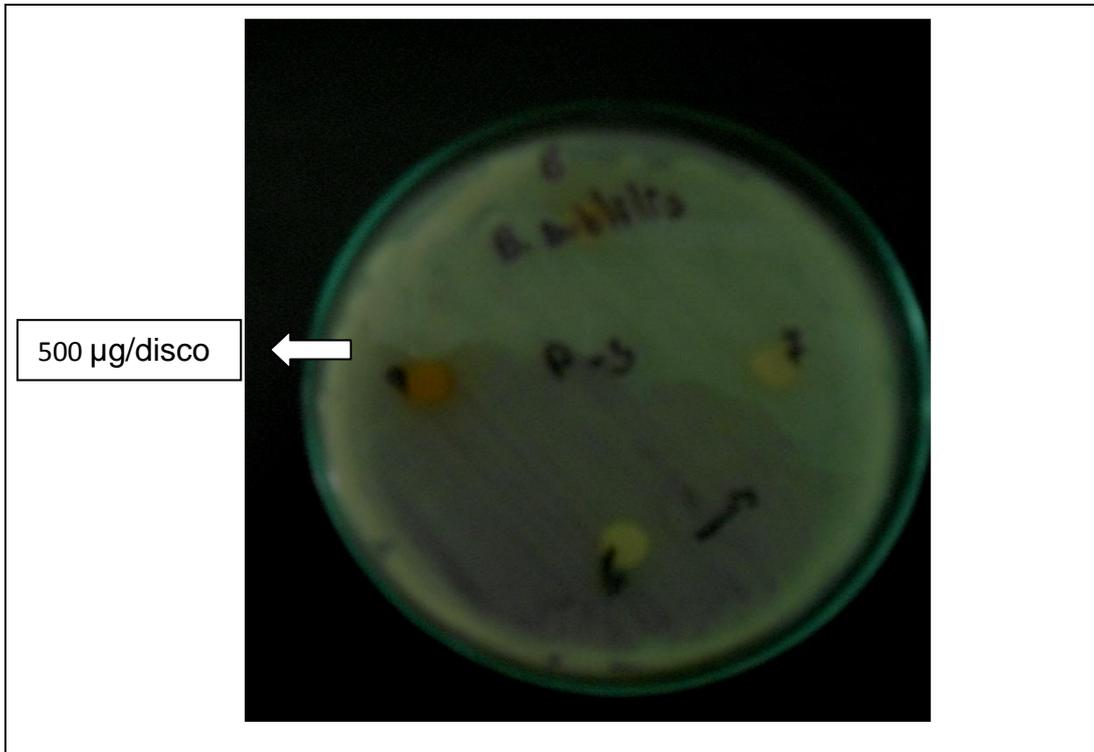
CONTROLES POSITIVOS





ANEXO 2: Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos secos (250, 500 y 1000 $\mu\text{g}/\text{disco}$) de hojas de Manajú, mediante el método de difusión superficial en disco (Bauer-Kirby) frente a *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).

HALOS DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO SECO



Anexo 3: Tabla de interpretación de halos de inhibición del crecimiento

Zone Diameter Interpretive Chart †												
Antimicrobial Agent	Code	Disc Potency	Zone Diameter Interpretive Standards (mm)			Control Zone Diameter Limits (mm)						
			Resistant	Intermediate ^a	Susceptible ^b	E. coli	S. aureus	P. aeruginosa	H. influenzae	H. influenzae	N. gonorrhoeae	S. pneumoniae
						ATCC 25922	ATCC 25923	ATCC 27853	ATCC 49247 ^c	ATCC 49766 ^c	ATCC 49226 ^d	ATCC 49619 ^e
Amdinocillin^f <i>Enterobacteriaceae</i>	AMD-10	10 µg	≤15	—	≥16	23 – 29	—	—	—	—	—	—
Amikacin <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci	AN-30	30 µg	≤14	15 – 16	≥17	19 – 26	20 – 26	18 – 26	—	—	—	—
Amoxicillin/ Clavulanic Acid^{g,h,j} <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Staphylococcus</i> spp. ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^{c,k}	AmC-30	20/10 µg	≤13	14 – 17	≥18	18 – 24 ^{g,ii}	28 – 36	—	—	15 – 23 ^c	—	—
Ampicillin^{h,j} <i>Enterobacteriaceae^l</i> and <i>V. cholerae^m</i> <i>Staphylococci^{l,ii}</i> <i>Enterococcus</i> spp. ^{n,o,ii} <i>Listeria monocytogenes^f</i> <i>Haemophilus</i> spp. ^{c,k,p} Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β-hemolytic only) ^{e,i,aaa,ccc}	AM-10	10 µg	≤13	14 – 16	≥17	16 – 22	27 – 35	—	—	13 – 21 ^c	—	30 – 36 ^e
Ampicillin/ Sulbactam^{g,h,i} <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter^q</i> and staphylococci ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^{c,k}	SAM-20	10/10 µg	≤11	12 – 14 ⁱⁱ	≥15 ⁱⁱ	19 – 24 ^{g,ii}	29 – 37	—	—	14 – 22 ^c	—	—
Azithromycin <i>Staphylococcus</i> spp. ^f <i>Haemophilus</i> spp. ^c <i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^{e,r,s}	AZM-15	15 µg	≤13	14 – 17	≥18	—	21 – 26	—	—	13 – 21 ^c	—	19 – 25 ^e
Azlocillin <i>P. aeruginosa</i>	AZ-75	75 µg	≤17	—	≥18	—	—	24 – 30	—	—	—	—
Aztreonam <i>Enterobacteriaceae</i> , ^f <i>P. aeruginosa</i> & <i>Acinetobacter</i> <i>Haemophilus</i> spp. ^c	ATM-30	30 µg	≤15	16 – 21	≥22	28 – 36	—	23 – 29	—	30 – 38 ^c	—	—
Bacitracin^f <i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Acinetobacter</i> <i>P. aeruginosa</i>	B-10	10 U	≤ 8	9 – 12	≥13	—	12 – 22	—	—	—	—	—
Carbenicillin <i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Acinetobacter</i> <i>P. aeruginosa</i>	CB-100	100 µg	≤19 ⁱⁱ	20 – 22 ⁱⁱ	≥23	23 – 29	—	18 – 24	—	—	—	—
Cefador^{h,j} <i>Enterobacteriaceae^u</i> and staphylococci ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^{c,k}	CEC-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	23 – 27	27 – 31	—	—	25 – 31 ^c	—	—
Cefamandole <i>Enterobacteriaceae</i> and staphylococci ^j	MA-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	26 – 32	26 – 34	—	—	—	—	—
Cefazolin <i>Enterobacteriaceae^u</i> and staphylococci ^j	CZ-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	21 – 27 ⁱⁱ	29 – 35	—	—	—	—	—
Cefdinir^h <i>Enterobacteriaceae^{kk}</i> and methicillin-susceptible staphylococci ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^c	CDR-5	5 µg	≤16	17 – 19	≥20	24 – 28	25 – 32	—	—	24 – 31 ^c	—	—
Cefepime^{h,j} <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^c <i>N. gonorrhoeae^d</i> Viridans Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i>) ^{e,ccc} Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β-hemolytic only) ^{aaa,ccc}	FEP-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	31 – 37 ⁱⁱ	23 – 29	24 – 30	—	25 – 31 ^c	—	37 – 46 ^{d,ii} 28 – 35 ^e
Cefixime^h <i>Enterobacteriaceae^v</i> <i>Haemophilus</i> spp. ^c <i>N. gonorrhoeae^d</i>	CFM-5	5 µg	≤15	16 – 18	≥19	23 – 27	—	—	25 – 33 ^c	—	—	37 – 45 ^d
Cefmetazole <i>Enterobacteriaceae</i> and staphylococci ^j <i>N. gonorrhoeae^d</i>	CMZ-30	30 µg	≤12	13 – 15	≥16	26 – 32	25 – 34	—	—	—	—	31 – 36 ^d
Cefonicid <i>Enterobacteriaceae</i> and staphylococci ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^{c,k}	CID-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	25 – 29	22 – 28	—	—	30 – 38 ^c	—	—
Cefoperazone <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^j	CFP-75	75 µg	≤15	16 – 20	≥21	28 – 34	24 – 33	23 – 29	—	—	—	—

bacteriano

Cefotaxime ^h	CTX-30	30 µg		29 – 35	25 – 31	18 – 22			
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{t,x} <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^j			≤14	15 – 22 ⁱⁱ	≥23 ⁱⁱ				
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			—	—	≥26		31 – 39 ^c	—	
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			—	—	≥31				38 – 48 ^d
Viridans Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i>) ^{e,i,ccc}			≤25	26 – 27	≥28				31 – 39 ^e
Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β-hemolytic only) ^{aaa,ccc}			—	—	≥24 ⁱⁱ				
Cefotaxime/ Clavulanic Acid ^t	CTX/CLA	30/10 µg							
Cefotetan	CTT-30	30 µg		28 – 34	17 – 23	—			
<i>Enterobacteriaceae</i> and staphylococci ^j			≤12	13 – 15	≥16				
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			≤19	20 – 25 ^w	≥26				30 – 36 ^d
Cefoxitin	FOX-30	30 µg		23 – 29	23 – 29	—			
<i>Enterobacteriaceae</i> and staphylococci ^{j,aa}			≤14	15 – 17	≥18				
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			≤23	24 – 27 ^w	≥28				33 – 41 ^d
Cefpodoxime ^{h,i}	CPD-10	10 µg		23 – 28	19 – 25	—			
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{t,4,v} and staphylococci ^j			≤17	18 – 20	≥21				
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			—	—	≥21		25 – 31 ^c	—	
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			—	—	≥29				35 – 43 ^d
Cefprozil ^{h,i}	CPR-30	30 µg		21 – 27	27 – 33	—			
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{u,y} and staphylococci ^j			≤14	15 – 17	≥18				
<i>Haemophilus</i> spp. ^{c,k}			≤14	15 – 17	≥18		—	20 – 27 ^c	
Ceftazidime	CAZ-30	30 µg		25 – 32	16 – 20	22 – 29			
<i>Enterobacteriaceae</i> ^t <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^j			≤14	15 – 17	≥18				
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			—	—	≥26		27 – 35 ^c	—	
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			—	—	≥31				35 – 43 ^d
Ceftazidime/ Clavulanic Acid ^t	CAZ/CLA	30/10 µg							
Ceftibuten ^{h,j}	CTB-30	30 µg		27 – 35	—	—			
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{z,ii}			≤17	18 – 20	≥21				
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			—	—	≥28		29 – 36 ^{c,ii}	—	
Ceftizoxime ^{h,j}	ZOX-30	30 µg		30 – 36	27 – 35	12 – 17			
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{t,x} <i>P. aeruginosa</i> , ⁱⁱ <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^j			≤14	15 – 19	≥20				
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			—	—	≥26		29 – 39 ^c	—	
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			—	—	≥38				42 – 51 ^d
Ceftriaxone ^h	CRO-30	30 µg		29 – 35	22 – 28	17 – 23			
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{t,x} <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^j			≤13	14 – 20 ⁱⁱ	≥21 ⁱⁱ				
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			—	—	≥26		31 – 39 ^c	—	
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			—	—	≥35				39 – 51 ^d
Viridans Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i>) ^{e,i,ccc}			≤24	25 – 26	≥27				30 – 35 ^e
Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β-hemolytic only) ^{aaa,ccc}			—	—	≥24 ⁱⁱ				
Cefuroxime (sodium) ^{h,i} CXM-30		30 µg		20 – 26	27 – 35	—			
<i>Enterobacteriaceae</i> ^u and staphylococci ^j (parenteral)			≤14	15 – 17	≥18				
<i>Haemophilus</i> spp. ^{c,k}			≤16	17 – 19	≥20		—	28 – 36 ^c	
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			≤25	26 – 30 ^w	≥31				33 – 41 ^d
Cephalothin	CF-30	30 µg		15 – 21	29 – 37	—			
<i>Enterobacteriaceae</i> ^u and staphylococci ^j			≤14	15 – 17	≥18				

Zone Diameter Interpretive Chart †												
Antimicrobial Agent	Code	Disc Potency	Zone Diameter Interpretive Standards (mm)			Control Zone Diameter Limits (mm)						
			Resis- tant	Inter- mediate ^a	Suscep- tible ^b	E. coli ATCC 25922	S. aureus ATCC 25923	P. aeruginosa ATCC 27853	H. influenzae ATCC 49247 ^c	H. influenzae ATCC 49766 ^c	N. gonorrhoeae ATCC 49226 ^d	S. pneumoniae ATCC 49619 ^e
Chloramphenicol	C-30	30 µg				21 – 27	19 – 26	—				
<i>Enterobacteriaceae</i> , ^f <i>P. aeruginosa</i> , ^f <i>Acinetobacter</i> , ^f staphylococci, ^f enterococci, ^{f,y,y} and <i>V. cholerae</i> ^{bb,f}			≤12	13 – 17	≥18							
<i>Haemophilus</i> spp. ^{c,f}			≤25	26 – 28	≥29				31 – 40 ^c	—		
<i>S. pneumoniae</i> ^{e,f}			≤20	—	≥21							23 – 27 ^e
Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i>) ^{e,f}			≤17	18 – 20	≥21							
Cinoxacin	CIN-100	100 µg				26 – 32	—	—				
<i>Enterobacteriaceae</i>			≤14	15 – 18	≥19							
Ciprofloxacin	CIP-5	5 µg				30 – 40	22 – 30	25 – 33				
<i>Enterobacteriaceae</i> , ^{ddd} <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> , staphylococci and enterococci			≤15	16 – 20	≥21							
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			—	—	≥21				34 – 42 ^c	—		
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			≤27	28 – 40 ^w	≥41							48 – 58 ^d
Clarithromycin	CLR-15	15 µg				—	26 – 32	—				
<i>Staphylococcus</i> spp. ^f			≤13	14 – 17	≥18							
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			≤10	11 – 12	≥13				11 – 17 ^c	—		
<i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^{e,f,s}			≤16	17 – 20	≥21							25 – 31 ^e
Clindamycin ^r	CC-2	2 µg				—	24 – 30	—				
<i>Staphylococcus</i> spp. ⁱⁱ			≤14	15 – 20	≥21							
<i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^e			≤15	16 – 18	≥19							19 – 25 ^e
Colistin ^{aa,dd}	CL-10	10 µg				11 – 15	—	—				

Doxycycline ^{ee}	D-30	30 µg			18 – 24	23 – 29	—		
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{aa} , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> ^{aa} , staphylococci and enterococci ^{yy}			≤12	13 – 15	≥16				
Enoxacin	ENX-10	10 µg			28 – 36	22 – 28	22 – 28		
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{ddd} and staphylococci ^{ff} <i>N. gonorrhoeae</i> ^d			≤14	15 – 17	≥18				
			≤31	32 – 35	≥36				43 – 51 ^d
Ertapenem ^{h,i}	ETP-10	10 µg			29 – 36	24 – 31	13 – 21		28 – 35
<i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Staphylococcus</i> spp. ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^c			≤15	16 – 18	≥19			20 – 28	27 – 33
			—	—	≥19				
Erythromycin	E-15	15 µg			—	22 – 30	—		
<i>Staphylococcus</i> spp. ^r and enterococci ^{ryy} <i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^{e,t,s}			≤13	14 – 22 ⁱⁱ	≥23 ⁱⁱ				
			≤15	16 – 20	≥21				25 – 30 ^e
Fosfomycin ^z	FOS-200	200 µg			22 – 30 ⁱⁱ	25 – 33	—		
<i>E. coli</i> and <i>E. faecalis</i> only			≤12	13 – 15	≥16				
Gatifloxacin	GAT-5	5 µg			30 – 37	27 – 33	20 – 28 ^{mm}		
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{ddd} and <i>Staphylococcus</i> spp. ^{aa} <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> spp. and enterococci ^z <i>H. influenzae</i> ^c and <i>H. parainfluenzae</i> ^c <i>N. gonorrhoeae</i> ^d <i>S. pneumoniae</i> and other streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β-hemolytic only) ^e			≤14	15 – 17	≥18				
			≤14 ⁱⁱ	15 – 17 ⁱⁱ	≥18 ⁱⁱ				
			—	—	≥18			33 – 41 ^c	—
			≤33	34 – 37	≥38				45 – 56 ^d
			≤17 ⁱⁱ	18 – 20 ⁱⁱ	≥21 ⁱⁱ				24 – 31 ^e
Gemifloxacin	GEM-5	5 µg			29 – 36	27 – 33 ⁱⁱ	19 – 25 ^{mm,ii}		
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{l,ddd} <i>H. influenzae</i> ^c and <i>H. parainfluenzae</i> ^c <i>S. pneumoniae</i> ^e			≤15	16 – 19	≥20				
			—	—	≥18			30 – 37	—
			≤19	20 – 22	≥23				28 – 34
Gentamicin									
Testing enterococci GM-120 120 µg for high level resistance ^{n,o,gg}			6	7 – gh	≥10	—	—	—	
<i>Enterobacteriaceae</i> , GM-10 10 µg <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci			≤12	13 – 14	≥15	19 – 26	19 – 27	16 – 21	
Imipenem ^{h,i}	IPM-10	10 µg			26 – 32	—	20 – 28		
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^c			≤13	14 – 15	≥16				
			—	—	≥16			21 – 29 ^c	—
Kanamycin	K-30	30 µg			17 – 25	19 – 26	—		
<i>Enterobacteriaceae</i> and staphylococci			≤13	14 – 17	≥18				
Levofloxacin	LVX-5	5 µg			29 – 37	25 – 30	19 – 26		
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{ddd} , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> , staphylococci ^{aa} and enterococci <i>Haemophilus</i> spp. ^c <i>S. pneumoniae</i> and other streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β-hemolytic only) ^e			≤13	14 – 16	≥17				
			—	—	≥17			32 – 40 ^c	—
			≤13	14 – 16	≥17				20 – 25 ^e
Linezolid	LZD-30	30 µg			—	25 – 32 ⁱⁱ	—		
<i>Staphylococcus</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp. <i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^e			—	—	≥21				
			≤20	21 – 22	≥23				
			—	—	≥21				25 – 34 ^{e,ii}
Lomefloxacin	LOM-10	10 µg			27 – 33	23 – 29	22 – 28		
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{ddd} , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci <i>Haemophilus</i> spp. ^c <i>N. gonorrhoeae</i> ^d			≤18	19 – 21	≥22				
			—	—	≥22			33 – 41 ^c	—
			≤26	27 – 37	≥38				45 – 54 ^d
Loracarbef ^{h,i}	LOR-30	30 µg			23 – 29	23 – 31	—		
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{u,kk} and staphylococci ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^{c,k}			≤14	15 – 17	≥18				
			≤15	16 – 18	≥19			—	26 – 32 ^c
Meropenem ^{h,i}	MEM-10	10 µg			28 – 34	29 – 37 ⁱⁱ	27 – 33		
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^c			≤13	14 – 15	≥16				
			—	—	≥20			20 – 28 ^c	—
Mezlocillin ⁱⁱ	MZ-75	75 µg			23 – 29	—	19 – 25		
<i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Acinetobacter</i> <i>P. aeruginosa</i>			≤17	18 – 20	≥21				
			≤15	—	≥16				
Minocycline ^{ee}	MI-30	30 µg			19 – 25	25 – 30	—		
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{aa} , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> ^{aa} , staphylococci and enterococci ^{yy}			≤14	15 – 18	≥19				
Moxalactam	MOX-30	30 µg			28 – 35	18 – 24	17 – 25		
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^j			≤14	15 – 22	≥23				
Moxifloxacin	MXF-5	5 µg			28 – 35	28 – 35	— ^{aa}		
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{f,ddd} and <i>Staphylococcus</i> spp. ^{aa} <i>H. influenzae</i> ^c and <i>H. parainfluenzae</i> ^c <i>S. pneumoniae</i> ^e			≤15	16 – 18	≥19				
			—	—	≥18			31 – 39 ^c	—
			≤14	15 – 17	≥18				25 – 31 ^e
Nafcillin	NF-1	1 µg			—	16 – 22	—		
<i>Staphylococcus aureus</i> ^{j,nn}			≤10	11 – 12	≥13				
Nalidixic Acid	NA-30	30 µg			22 – 28	—	—		
<i>Enterobacteriaceae</i> ^z			≤13	14 – 18	≥19				
Neomycin ^f	N-30	30 µg			17 – 23	18 – 26	—		
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci			≤12	13 – 16	≥17				
Netilmicin	NET-30	30 µg			22 – 30	22 – 31	17 – 23		
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci			≤12	13 – 14	≥15				
Nitrofurantoin	F/M-300	300 µg			20 – 25	18 – 22	—		
<i>Enterobacteriaceae</i> , staphylococci and enterococci			≤14	15 – 16	≥17				
Norfloxacin ⁱⁱ	NOR-10	10 µg			28 – 35	17 – 28	22 – 29		
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{ddd} , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> , staphylococci and enterococci			≤12	13 – 16	≥17				
Novobiocin ^f	NB-30	30 µg			—	22 – 31	—		
(Mueller Hinton agar with sheep blood for veterinary use)			≤14	15 – 16	≥17				

Ofloxacin	OFX-5	5 µg		29 – 33	24 – 28	17 – 21		
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{ddd} , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^{aa}			≤12	13 – 15	≥16			
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			—	—	≥16		31 – 40 ^c	—
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			≤24	25 – 30 ^w	≥31			43 – 51 ^d
<i>S. pneumoniae</i> ^e and other streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β-hemolytic only) ^e			≤12	13 – 15	≥16			16 – 21 ^e
Oxacillin	OX-1	1 µg		—	18 – 24	—		
<i>Staphylococcus aureus</i> ^{j,nn,oo}			≤10	11 – 12	≥13			
Staphylococci, coagulase-negative ^{j,nn}			≤17	—	≥18			
<i>S. pneumoniae</i> (for penicillin G susceptibility) ^{e,h}			—	—	≥20			≤12 ^e ,bbb
Oxolinic Acid ^f	OA-2	2 µg	≤10	—	≥11	20 – 24	10 – 13	—
Penicillin ^h	P-10	10 U				—	26 – 37	—
<i>Staphylococcus</i> spp. ^{j,pp}			≤28	—	≥29			
<i>Enterococcus</i> spp. ^{n,o}			≤14	—	≥15			
<i>L. monocytogenes</i> ^f			≤19	20 – 27	≥28			
<i>N. gonorrhoeae</i> ^{d,qq,ii}			≤26	27 – 46 ^w	≥47			26 – 34 ^d
Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β-hemolytic only) ^{e,i,rr,aaa,ccc}			—	—	≥24 ⁱⁱ			24 – 30 ^e
Piperacillin	PIP-100	100 µg				24 – 30 ^g	—	25 – 33
<i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Acinetobacter</i> <i>P. aeruginosa</i>			≤17	18 – 20	≥21			
			≤17	—	≥18			
Piperacillin/ Tazobactam ^g	TZP-110	100/10 µg				24 – 30 ^g	27 – 36	25 – 33 ⁱⁱ
<i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Acinetobacter</i> ⁱⁱ			≤17	18 – 20	≥21			
Staphylococcus spp. ^{j,ii} and <i>P. aeruginosa</i> ⁱⁱ			≤17	—	≥18			
Polymyxin B ^{aa,dd}	PB-300	300 U	≤8	9 – 11	≥12	12 – 16	—	—
Quinupristin/Dalfopristin SYN-15	4.5/10.5 µg					—	21 – 28 ⁱⁱ	—
Staphylococcus spp., <i>Enterococcus faecium</i> and <i>S. pyogenes</i> ^e only			≤15	16 – 18	≥19			
Rifampin	RA-5	5 µg				8 – 10	26 – 34	—
<i>Staphylococcus</i> spp. and <i>Enterococcus</i> spp. ^{yy}			≤16	17 – 19	≥20			
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			≤16	17 – 19	≥20			
<i>S. pneumoniae</i> ^e			≤16	17 – 18	≥19			25 – 30 ^e
Sparfloxacin	SPX-5	5 µg				30 – 38	27 – 33	21 – 29 ⁱⁱ
<i>Staphylococcus</i> spp. <i>S. pneumoniae</i> ^e			≤15	16 – 18	≥19			
			≤15 ⁱⁱ	16 – 18	≥19			21 – 27 ^e
Spectinomycin	SPT-100	100 µg				—	—	—
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			≤14	15 – 17 ^w	≥18			23 – 29 ^d
Streptomycin								
Testing enterococci for high level resistance ^{n,o,gg}			6	7 – 9 ^{hh}	≥10			
<i>Enterobacteriaceae</i>			≤11	12 – 14	≥15	12 – 20	14 – 22	—
Sulfisoxazole ^{tt}	G-.25	250 µg				15 – 23	24 – 34	—
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> , staphylococci and <i>V. cholerae</i> ^m			≤12	13 – 16	≥17			
Telithromycin	TEL-15	15 µg				—	24 – 30	—
<i>S. aureus</i>			— ^{aa}	— ^{aa}	≥22			
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			≤11	12 – 14	≥15			17 – 23
<i>S. pneumoniae</i> ^e			≤15	16 – 18	≥19			27 – 33
Tetracycline ^{ee}	Te-30	30 µg				18 – 25	24 – 30	—
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{aa} , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> ^{aa} , staphylococci, enterococci ^{yy} and <i>V. cholerae</i> ^m			≤14	15 – 18	≥19			
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			≤25	26 – 28	≥29			
<i>N. gonorrhoeae</i> ^{d,uu}			≤30	31 – 37 ^w	≥38			
<i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^e			≤18	19 – 22	≥23			14 – 22 ^c
Ticardillin	TIC-75	75 µg				24 – 30	—	21 – 27 ⁱⁱ
<i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Acinetobacter</i> <i>P. aeruginosa</i>			≤14	15 – 19	≥20			
			≤14	—	≥15			
Ticardillin/ Clavulanic Acid ^g	TIM-85	75/10 µg				24 – 30 ^{g,ii}	29 – 37	20 – 28
<i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Acinetobacter</i> <i>P. aeruginosa</i>			≤14	15 – 19	≥20			
<i>Staphylococcus</i> spp. ^j			≤14	—	≥15			
			≤22	—	≥23			
Tigecycline	TGC-15	15 µg				20 – 27	20 – 25	9 – 13 ^{mm}
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{f,ss}			≤14	15 – 18	≥19			
<i>S. aureus</i> (including MRSA) ^f			—	—	≥19			
<i>E. faecalis</i> (vancomycin-susceptible isolates only) ^f			—	—	≥19			
Streptococcus spp. (other than <i>S. pneumoniae</i>) ^{e,f}			—	—	≥19			23 – 29 ^{cc}
Tobramycin	NN-10	10 µg				18 – 26	19 – 29	19 – 25
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci			≤12	13 – 14	≥15			
Trimethoprim	TMP-5	5 µg				21 – 28	19 – 26	—
<i>Enterobacteriaceae</i> and staphylococci			≤10	11 – 15	≥16			

Zone Diameter Interpretive Chart †												
Antimicrobial Agent	Code	Disc Potency	Zone Diameter Interpretive Standards (mm)			Control Zone Diameter Limits (mm)						
			Resistant	Intermediate ^a	Susceptible ^b	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247 ^c	<i>H. influenzae</i> ATCC 49766 ^c	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226 ^d	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619 ^e
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole ^{tt}	SXT	1.25 µg 23.75 µg				23 – 29 ⁱⁱ	24 – 32	—				
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> , staphylococci and <i>V. cholerae</i> ^m			≤10	11 – 15	≥16							
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			≤10	11 – 15	≥16				24 – 32 ^c	—		
<i>S. pneumoniae</i> ^e			≤15	16 – 18	≥19							20 – 28 ^e
Vancomycin	Va-30	30 µg				—	17 – 21	—				
<i>Staphylococcus</i> spp. ^{vv,ii}			—	—	≥15							
<i>Enterococcus</i> spp. ^{n,o,ww}			≤14	15 – 16	≥17							
<i>S. pneumoniae</i> ^{xx} and other streptococci ^e			—	—	≥17							20 – 27 ^e