

CEDOBF



04202

D DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
E CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA



CONFIRMACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
DE TRES ESPECIES DEL GENERO LIPPIA

JULIA CRISTINA MENDOZA CRUZ

QUIMICO BIOLOGO

Guatemala, Abril 1995.

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

CONFIRMACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE TRES
ESPECIES DEL GENERO LIPPIDIA



ESTUDIANTE DE LA CARRERA DE
QUIMICO BIOLOGO



Guatemala, abril de 1,995

QB0508
c.3

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

DECANO	LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
SECRETARIO	LICDA. ELEONORA GAITAN IZAGUIRRE
VOCAL I	LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA
VOCAL II	LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN
VOCAL III	LIC. MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME
VOCAL IV	Br. JORGE LUIS GALINDO AREVALO
VOCAL V	Br. EDGAR ANTONIO GARCIA DEL POZO

QB0508
c.3

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

DECANO	LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
SECRETARIO	LICDA. ELEONORA GAITAN IZAGUIRRE
VOCAL I	LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA
VOCAL II	LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN
VOCAL III	LIC. MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME
VOCAL IV	Br. JORGE LUIS GALINDO AREVALO
VOCAL V	Br. EDGAR ANTONIO GARCIA DEL POZO

TESIS QUE DEDICO

A: GUATEMALA

A: LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A: LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

A: MI ASESOR: LIC. ARMANDO CACERES ESTRADA

INDICE

	Pág.
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCION.....	3
3. ANTECEDENTES	
3.1 Medicina tradicional en Guatemala.....	4
3.2 Acción antimicrobiana vegetal.....	5
3.3 Estudio sobre la actividad antimicrobiana de plantas en Guatemala.....	7
3.4 Descripción general sobre las plantas en estudio..	9
3.5 Descripción e infecciones causadas por los microorganismos en estudio.....	14
4. JUSTIFICACION.....	20
5. OBJETIVOS.....	21
6. HIPOTESIS.....	22
7. MATERIALES Y METODOS	
7.1 Universo de trabajo.....	23
7.2 Muestra.....	23
7.3 Recursos.....	23
7.4 Procedimiento.....	25
7.5 Diseño estadístico.....	28
8. RESULTADOS.....	30
9. DISCUSION DE RESULTADOS.....	38
10. CONCLUSIONES.....	41
11. RECOMENDACIONES.....	42
12. REFERENCIAS.....	43
13. ANEXOS.....	48



INDICE

	Pág.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
ANTECEDENTES	
3.1 Medicina tradicional en Guatemala.....	4
3.2 Acción antimicrobiana vegetal.....	5
3.3 Estudio sobre la actividad antimicrobiana de plantas en Guatemala.....	7
3.4 Descripción general sobre las plantas en estudio..	9
3.5 Descripción e infecciones causadas por los microorganismos en estudio.....	14
JUSTIFICACION.....	20
OBJETIVOS.....	2
HIPOTESIS.....	2
MATERIALES Y METODOS	
7.1 Universo de trabajo.....	2
7.2 Muestra.....	2
7.3 Recursos.....	2
7.4 Procedimiento.....	2
7.5 Diseño estadístico.....	2
RESULTADOS.....	
DISCUSION DE RESULTADOS.....	
0. CONCLUSIONES.....	
1. RECOMENDACIONES.....	
2. REFERENCIAS.....	
3. ANEXOS.....	



RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo con el propósito de confirmar la actividad antimicrobiana de tres especies del género *Lippia* (*L. alba*, *L. dulcis* y *L. graveolens*), popularmente conocidas como Salvia sija, Orozú y orégano. Estas han sido utilizadas ampliamente en el país para aliviar y curar diversos tipos de afecciones. En este estudio se ensayaron dos órganos de cada planta siendo ellos hoja y raíz, contra diferentes cepas bacterianas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli*), y hongos (*Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium gypseum* y *Trichophyton rubrum*).

Se llevaron a cabo tres fases experimentales, la primera consistió en el tamizaje antimicrobiano y antimicótico de las hojas y raíces de las tres especies en estudio, seleccionándose las hojas de *L. dulcis* (orozú) y *L. graveolens* (orégano) como el mejor órgano, debido a que mostraron mayor actividad antimicrobiana que el otro órgano, inhibiendo a las bacterias ensayadas, lo que indica que la parte aérea tiene mayor actividad que la parte subterránea.

Las hojas de *L. alba* (salvia sija) inhibieron a *M. gypseum*, las de *L. dulcis* (orozú) a *C. albicans* y *M. gypseum* y las de *L. graveolens* (orégano) a los cinco hongos estudiados.

La siguiente fase consistió en averiguar que tipo de disolvente, es el más adecuado para obtener el principio activo antimicrobiano según su polaridad, empleando para ello una técnica de percolación en frío y extracción con jeringa, obteniéndose tres extractos con disolventes de diferente polaridad: acuoso, etanólico y diclorometano. Para esta fase se trabajó con los microorganismos más susceptibles a las plantas. Con agua no hubo inhibición de bacterias únicamente de hongos, para el caso de *L. graveolens*, con etanol se obtuvo inhibición de los microorganismos siempre por *L. graveolens* y con el diclorometano fueron inhibidas las bacterias tanto por *L. dulcis* como por *L. graveolens* y los hongos en su mayoría inhibidos por *L. graveolens*.

Los aceites esenciales obtenidos de las hojas de las tres especies presentaron potente acción inhibitoria contra las bacterias y hongos lo que demuestra que es el aceite esencial quien posee la mayor cantidad de principio activo con actividad antimicrobiana.

Se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de los extractos, con los microorganismos que fueron inhibidos, obteniéndose que el extracto etanólico al 80% de las hojas de *L. graveolens* inhibe a *S. aureus* en concentración de 1.75 mg/ml y a *M. gypseum* y *T. rubrum* a una concentración de 2.5 mg/ml. El extracto diclorometánico de *L. graveolens* inhibe a cuatro de los cinco hongos ensayados hasta una concentración de 2.5 mg/ml.

De las tres especies estudiadas, la que mejor acción antimicrobiana presentó, conforme a los métodos empleados fué la hoja de *L. graveolens* (orégano).

El análisis estadístico de los resultados se realizó por medio de un análisis binomial: siendo las variables: éxito = inhibición del crecimiento (+), fracaso = crecimiento (-). Todos los ensayos que se presentan como positivos (+) representan los cuatro resultados positivos (repeticiones), lo que indica que existe una actividad antimicrobiana estadísticamente significativa ($p < 0.1$)

2 INTRODUCCION

Guatemala es un país rico en tradiciones y cuenta con una herencia cultural, en la cual la medicina natural ocupa un importante lugar. Esto unido a que ecológicamente hay una gran diversidad botánica que se encuentra ampliamente distribuida en las distintas regiones del país, hacen que el uso de éstas sea una alternativa de tratamiento con buenas posibilidades de éxito.

Desde hace varios años se están llevando a cabo estudios y se han establecido métodos y técnicas experimentales para validar científicamente el uso popular de las plantas medicinales en el tratamiento de diversas condiciones patológicas.

En nuestro país se han realizado diversas investigaciones de laboratorio sobre las propiedades antimicrobianas de diversas plantas, pero se hacen necesarios más trabajos al respecto, a fin de determinar cuáles de ellas poseen efectivamente dicha acción antimicrobiana y así mismo estandarizar una metodología adecuada que permita obtener resultados concisos y confiables.

El presente estudio pretende confirmar la actividad antimicrobiana contra bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*), y hongos (*Aspergillus flavus*, *C. albicans*, *Epidermophyton floccosum* y *Trichophyton rubrum*), de los extractos de tres especies del género *Lippia* (*L. alba*, *L. dulcis*, *L. graveolens*), preliminarmente evaluadas en estudios anteriores. Es necesario evaluar con mayor profundidad dicha acción, utilizando una metodología que permita confirmarla y validar de esta manera en forma científica, el uso popular de estas plantas para el tratamiento de una variedad de procesos infecciosos.



3 ANTECEDENTES

3.1 Medicina tradicional en Guatemala

La práctica médica tradicional no ha surgido casualmente en Guatemala, sino que es el resultado de la acumulación histórica de conocimientos aportados por la cultura aborígen y la incorporación de aquellos traídos por los conquistadores y colonizadores españoles en el siglo XVI. Esta acumulación, que siguió un peculiar proceso histórico, fue más tarde enriquecida por los avances médicos logrados en otros países de Europa y en los Estados Unidos de América (1).

Los Mayas, a semejanza de muchos pueblos cultos de la antigüedad, dieron a la medicina un carácter sagrado cuya liturgia solo era conocida y ejercida por iniciados y sacerdotes, que la heredaban como patrimonio familiar de generación a generación (2).

Las enfermedades fueron consideradas por los indios como un castigo de los dioses, especialmente en los casos graves o en aquellos cuya curación ignoraban. Recurrían a hechiceros que mediante invocación, uso de plantas alucinógenas y ritos singulares, procuraban aplacar a los dioses para lograr la curación del enfermo. Los hueseros, cirujanos y hierberos curaban las enfermedades con infusiones, emplastos, operaciones sencillas, entablillados y masajes (3, 4).

Entre las enfermedades descritas por los Mayas están el asma, neumonía, diarrea, disentería y parasitismo intestinal. La neumonía era frecuente y en algunos casos con resultados fatales. La diarrea y la disentería, posiblemente endémica, se trataban en forma mágico-religiosa o por medio de plantas (5).

El Popol-Vuh, texto indígena prehispánico de gran significación histórica, plasma la realidad vivida por los pueblos Maya-Quiché, según su propia cosmovisión. En él se contemplan los aspectos mágico-religiosos que intervienen en el arte de curar (1).

Testimonios de historiadores y religiosos de la época colonial (siglo XVI) enriquecen la historia de la medicina tradicional en Guatemala. Así, el historiador Francisco Antonio de Fuentes y Guzmán, dedicó varios capítulos en su obra "Recordación Florida" a la descripción de algunos especímenes botánicos utilizados por los indígenas de la época prehispánica como medios terapéuticos. Igualmente, relata casos tratados y curados por médicos indígenas (6).

Francisco Ximénez (1721), en su crónica "Historia Natural del Reino de Guatemala", describe a un gran número de plantas y árboles enfatizando sobre la utilidad medicinal de éstos (7).

Pedro Cortez y Larraz, religioso español, llegó a Guatemala en el año de 1768 para hacerse cargo del arzobispado de la región que comprendía los actuales territorios de Guatemala, El Salvador y Nicaragua. Cortéz, en forma muy generalizada, relata el rechazo de los indígenas a los medicamentos recetados por los boticarios

y su preferencia a caminar grandes distancias en busca de los curanderos (1).

No obstante que los siglos XV al XVII, son reconocidos como períodos de auge y florecimiento de la medicina en España, estos conocimientos no llegaron a Guatemala sino hasta el siglo XVIII. La población criolla estuvo a expensas de los boticarios, que fungían como médicos y de los barberos que practicaban la cirugía. A finales del siglo XIX y transcurso del siglo XX, ha sido la medicina de los países desarrollados del Norte la que ha alcanzado un mayor auge y dominio, razón por lo que ha influido para institucionalizarse en los países de América Latina (1).

La historia pone de manifiesto que la medicina académica no ha sido un recurso al alcance de los estratos socioeconómicos bajos de la población Latinoamericana y que los grandes cambios logrados en la medicina tradicional de Guatemala, se desarrollaron durante el período de la conquista y colonización española. Sin embargo muchos de los elementos básicos de la medicina tradicional se mantienen gracias a la lucha del pueblo por mantener vigente su cultura (1).

3.2 Acción antimicrobiana vegetal

El término antibiótico fue inicialmente aplicado a sustancias producidas por hongos o bacterias que inhibían los procesos vitales de microorganismos distintos de su especie. Actualmente, se ha extendido a constituyentes de plantas superiores con efectos similares aunque en menores concentraciones (8).

Los antibióticos actúan a nivel celular y su acción se basa principalmente en uno de cuatro mecanismos:

- 3.2.1 Interfiriendo con el ácido para - aminobenzóico (que participa en la síntesis de folatos) e inhibiendo así la multiplicación celular.
- 3.2.2 Inhibiendo la síntesis de pared celular por un bloqueo de transpeptidasa.
- 3.2.3 Disociando la estructura lipoprotéica de la pared celular.
- 3.2.4 Impidiendo la síntesis protéica bacteriana.

Muchos compuestos de origen natural son investigados año con año en la búsqueda de nuevas estructuras con actividad antimicrobiana. El valor terapéutico de un nuevo antibacteriano depende de muchas propiedades y de sus interacciones (8).

Entre los principales estudios relacionados con la acción antimicrobiana de las plantas, podemos mencionar:

- Mitscher y colaboradores, realizaron experimentos

utilizando extractos etanólicos de 1248 especies de plantas superiores en 7 microorganismos representantes de bacterias Gram positivo, Gram negativo, ácido resistentes y levaduras; encontrando que 26% de las plantas tuvieron efecto contra alguno de los microorganismos (9).

- Macrae y colaboradores, colectaron y prepararon extractos de 34 plantas de la familia *Euphorbiaceae* del Amazonas, de las cuales 16 se usan como agente medicinal. Los extractos fueron evaluados por su habilidad para inhibir el crecimiento de bacterias como *E. coli* y *S. aureus*; hongos levaduriformes *S. cerevisiae* y *C. albicans*; hongos dermatofitos, *M. canis*, *M. fulvum*, *M. gypseum* y *T. gallinae*. Ellos reportaron que el crecimiento de *E. coli* fue inhibido por extractos de sólo dos de las 34 especies, mientras que *S. aureus* fue inhibido por 26 (76%), *C. albicans* fue resistente para todos los extractos y *S. cerevisiae* fue inhibido por los extractos de sólo dos especies. Los cuatro hongos dermatofitos que evaluaron, fueron más sensibles a la presencia de los extractos. *M. gypseum* fue inhibido por extractos de 97 por ciento, de las especies, aunque 6 extractos fueron efectivos sólo en altas concentraciones (mayor de 2 mg/ml). *M. fulvum* fue inhibido por 91 por ciento de las especies evaluadas, 21 por ciento de estas empezaron con una baja actividad y *T. gallinae* fue sensible al 94 por ciento de los extractos y 12 por ciento empezó con baja potencia (10).
- Khan y colaboradores, reportan que 98 por ciento y 18 por ciento de 60 especies de plantas medicinales africanas inhibieron el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli* (10).
- Ríos y colaboradores, evaluaron métodos de difusión y dilución para estudiar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. Un número de modificaciones se han hecho en la técnica y en el orden para obtener mejores resultados. Hay algunos factores como lo son: composición de medios de cultivo, microorganismos evaluados, métodos de extracción, pH, solubilidad de algunas muestras en los medios de cultivo, pueden cambiar los resultados por lo que es difícil usar estos métodos para estandarizar un procedimiento para el estudio de plantas antimicrobianas (11).

Pellecer y colaboradores, obtuvieron resultados diferentes; para *E. coli* a partir de dos extractos diferentes (fenol y aceite esencial de *Thymus*). Actividad similar se observó al emplear el disco de difusión con halos de inhibición de 41 y 42 mm. respectivamente, pero cuando hicieron el ensayo por un método de dilución, el aceite esencial fue más activo que el fenol. El aceite esencial fué más activo contra *S. aureus* por el disco de difusión, pero *E. coli* fue más sensible cuando emplearon el método de dilución (11).



3.3 Estudios sobre la Actividad Antimicrobiana de Plantas en Guatemala

En nuestro medio, el reconocimiento empírico de las propiedades antimicrobianas de muchos vegetales data desde tiempos prehispánicos. El uso del Balché, bebida de miel fermentada con corteza de *L. longistylus* con fines terapéuticos, aparece en los libros del Chilam Balam; en la actualidad han sido demostradas las propiedades de ésta bebida (12).

Fray Bernardino de Sahagún en su Codex Florentino, relata el uso de hierbas y raíces aplicadas en forma local, como también el uso de una bebida preparada con raíces conocidas como "tecpatlí" por los conquistadores, para el tratamiento de la lepra (13).

Batres Jauregui refiere que en 1935 se introdujo en la materia médica la zarzaparrilla que los indios utilizaban desde hacía cientos de años para curaciones, además de otros remedios como el guayacán y el achiote, de los cuales la Farmacopea recibió muchos beneficios (14).

En nuestro país es cada vez mayor el número de antropólogos, químicos, botánicos, etc; que muestran interés por dedicarse al estudio de plantas medicinales (15).

El Centro Mesoamericano de Estudios Sobre Tecnología Apropiada (CEMAT), ha realizado varios estudios para demostrar la acción antimicrobiana de extractos vegetales en Guatemala entre los cuales tenemos:

Un estudio acerca de 200 plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de enfermedades dermatomucosas. Basándose en revisiones de literatura, fueron seleccionadas 89 plantas para medir su actividad antimicrobiana *in vitro* contra microorganismos usualmente causantes de infecciones en la piel y mucosas. Se prepararon maceraciones etanólicas y se impregnaron en papel absorbente, una vez secadas, fueron aplicadas por encima del inóculo estandarizado de *C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Las zonas de inhibición fueron medidas luego de una posterior incubación, observándose que 28 de las plantas exhibieron alguna inhibición *in vitro* de los microorganismos evaluados (16).

Se llevó a cabo un estudio demostrando que desordenes gastrointestinales son causa importante de morbilidad en países desarrollados y que uno de los caminos tradicionales de tratamiento de estas enfermedades en Guatemala es llevarlas a cabo con plantas medicinales, 385 plantas de 95 familias son empleadas en Guatemala, para el tratamiento de desordenes gastrointestinales. La actividad de 84 de las plantas usadas más comunmente, fueron demostradas *in vitro* contra cinco enterobacterias patógenas al hombre (*E. coli* enteropatógena, *S. enteritidis*, *S. typhi*, *S. dysenteriae* y *S. flexneri*). Los resultados indican que 34 (40.48%) plantas inhiben una o más de

las enterobacterias evaluadas. La bacteria más comunmente inhibida fue *S. typhi* (33.73%) y la más resistente fue *E. coli* (7.35%). Las plantas de origen americano que mejor demostraron la actividad antimicrobiana fueron: *B. crassifolia*, *D. binioides*, *G. stramineum*, *G. ulmifolia*, *P. guajava*, *S. mexicana*, *S. glauca*, *S. lundelii*, *S. purpurea* y *T. lucida*. Estos resultados indican una base científica para el uso de estas plantas medicinales contra infecciones enterobacterianas en el hombre (17).

En otro estudio de 100 plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de dermatofitosis, se escogió una muestra de 52 plantas para evaluación de su actividad contra dermatofitos. Los resultados indican que los extractos de 26 plantas inhiben uno o más dermatofitos (*E. floccosum*, *M. canis*, *M. gypsum*, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*). Los más inhibidos fueron *E. floccosum* (36%), *T. rubrum* (32%) y *T. mentagrophytes* (29%); los menos inhibidos fueron *M. canis* (24%) y *M. gypseum* (23%). De las plantas americanas que mostraron mejor actividad son: *B. crassifolia*, *C. grandis*, *C. occidentalis*, *D. carthagenensis*, *D. robinoides*, *G. sepium*, *P. piscipula*, *S. regelii*, *S. americanum* y *S. nigrescens*. Se demostró actividad fungicida y fungistática determinándose la concentración inhibitoria mínima. Los resultados indican que el uso empírico de las plantas para el tratamiento de dermatofitosis en el hombre es adecuado (18).

En Guatemala durante los años de 1986 a 1988 se realizó un estudio donde se emplearon 234 plantas de 75 familias de origen americano para el tratamiento de infecciones respiratorias. Tres bacterias Gram positivo que causaron infecciones respiratorias (*S. aureus*, *S. neumoniae* y *S. pyogenes*) fueron utilizadas, para escoger 68 de las más comunmente utilizadas por su actividad, 28 (41.2%) de estas, inhibieron el crecimiento de una o más bacterias en esta prueba. *S. aureus* fue inhibida por 18 extractos de plantas mientras que 7 extractos fueron efectivos contra *S. pyogenes*. Las plantas de origen americano que exhibieron actividad antimicrobiana fueron *L. alba*, *L. dulcis*, *G. viscosum*, *Ph. philadelphica*, *S. brownei*, *S. nigrescens* y *T. lucida* (19).

De un estudio de la actividad antigonorrea de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de enfermedades transmitidas sexualmente, las plantas utilizadas con mayor actividad y de origen americano fueron: *B. orellana*, *C. edulis*, *C. dioica*, *D. robinoides*, *E. odoratum*, *G. sepium*, *P. edulis*, *Ph. angulata*, *P. aduncum* y *P. juliflora*. Estas plantas fueron maceradas con alcohol al 50 por ciento, evaluándose la actividad *in vitro* de los extractos contra *N. gonorrhoeae* empleando cepas aisladas de pacientes sintomáticos y confirmados por procedimientos estándares bacteriológicos (20).



3.4 Descripción general sobre las plantas en estudio

3.4.1 *Lippia alba* Mill N. E. Brown.

3.4.1.1 Familia: *Verbenaceae*

3.4.1.2 Sinónimos: *Lantana alba* (Mill), *L. geminata* HBK

3.4.1.3 Nombres comunes: Juanilama, Salvia santa, Salvia sija.

3.4.1.4 Origen y distribución: nativa de Guatemala, encontrada usualmente en laderas zarzosas y a lo largo de caminos, algunas veces en las orillas de los ríos, se desarrolla en los jardines de viviendas como una planta medicinal (21). Se localiza además en Texas, México, Belice hasta Panamá, islas del Caribe y en América del Sur (22, 23).

3.4.1.5 Zona de vida: Bosque seco-subtropical

3.4.1.6 Departamentos: El Progreso, Chiquimula, Guatemala, Alta Verapaz, Escuintla, Huehuetenango, Sacatepequez y Sololá.

3.4.1.7 Descripción

3.4.1.7.1 Hábito: Arbustos de 2 m de alto, esparcidamente ramificados, un poco densamente puberulentos a estrigosos (21).

3.4.1.7.2 Hojas: Opuestas o algunas veces ternadas, los peciolo de 2 a 10 hasta de 14 mm de largo; los limbos de 2 a 7 cm de largo, oblongos, lanceolados-oblongos u ovalados-oblongos, agudos u obtusos en el ápice, cuneados o atenuados hacia la base y decurrente en el peciolo, estrigosos-hirtelosos o puberulentos, algunas veces canescentes, los márgenes finamente aserrados (21).

3.4.1.7.3 Flores: En espigas primeramente subglobosis, cerca de 6 mm de largo, usualmente alargándose de 8 a 12 mm de largo; brácteas puberulentas, ovaladas, abruptamente acuminadas, algunas de las de abajo, mucronadas, de 3 a 5 mm de largo. Pedúnculos usualmente solitarios en las axilas. Cáliz vellosos, de 1.5 a 2 mm de largo. Corola lila pálida, púrpura o blanco con púrpura, de 5 a 6 mm de largo (22, 23).

3.4.1.8 Usos: El cocimiento de la planta es un remedio doméstico para disturbios intestinales y respiratorios, como sedante y en la diabetes, como desinfectante en forma de baños, diaforéticas y emenagoga (24).

La infusión de las hojas y flores sirve como sedante gastrointestinal, antiespasmódico en cólicos hepáticos y para la colitis (25). La decocción de las ramas y flores frescas o secadas, tomada como un té por las noches y por las mañanas, actúan como estomáquico, febrífugo, la disentería, calambres abdominales y frios (26).

3.4.1.9 Componentes químicos: La planta contiene un 1.2 por ciento de aceite volátil, compuesto por geraniol (34.1%), neral (23%), linalool (1.1 %), citronello (5.8%) (25).

3.4.1.10 Actividad antimicrobiana: El extracto etanólico de las hojas inhibe el crecimiento de algunas bacterias causales de infección respiratoria, como *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* y *S. typhi* (27).

- 3.4.2 *Lippia dulcis* Trev
- 3.4.2.1 Familia: *Verbenaceae*
- 3.4.2.2 Sinónimos: *Zapania scaberrima* (Juss), *L. scaberrima* (Sond), *Phyla dulcis* (Moldenke), *Phyla scaberrima* (Moldenke y Fedde).
- 3.4.2.3 Nombre común: Orozus
- 3.4.2.4 Origen y distribución: Nativa de Guatemala, en matorrales húmedos o secos y terrenos abandonados, en las orillas de los ríos enmontados. Algunas veces alrededor de terrenos cultivados. Se extiende del Sur de México, Belice hasta Panamá e islas del Caribe (21, 28).
- 3.4.2.5 Zona de vida: Bosque seco sub-tropical
- 3.4.2.6 Departamentos: El Progreso, Zacapa, Chiquimula, Guatemala, El Petén, Retalhuleu, Sacatepequez, Santa Rosa y Sololá.
- 3.4.2.7 Descripción
- 3.4.2.7.1 Hábito: Una hierba semileñosa, perenne, erecta o decumbente, de 40 cm de alto, fuertemente olorosa, los tallos a menudo enraizando abajo de los nudos, estrigosos o glábros (21).
- 3.4.2.7.2 Hojas: Opuestas, en peciölos de 5 - 1.5 cm de largo, los limbos rómbicos a ovalados de 1 - 6 cm de largo, agudos o algunas veces acuminados en el ápice, ampliamente cuneados en la base; los márgenes crenado-acerrados, el haz estrigoso, rugoso al tacto, esparcida o densamente rugosos en el envés y oscuramente glandulares (28, 29).
- 3.4.2.7.3 Flores: En espigas ovoide-globosas al principio, luego cilíndricas, cerca de 6 mm de grueso, las cabezuelas ocasionalmente alargándose, tanto como 3 cm de largo en la maduración; pero usualmente más cortas, pedúnculos solitarios en las axilas de 1.5 cm de largo; bráctea cuneado-ovalado, obtusas y abruptamente acuminadas (21, 28).
- 3.4.2.8 Usos medicinales: El agua de las hojas y flores hervidas es bebida para los cólicos. Para casos de tos corriente y tosferina. En México su cocimiento se emplea como remedio para la tos, catarro, bronquitis, asma y cólico (21, 30).



La planta en cocimiento (100 g/lit de agua), es tomada como un remedio para la tos, catarros, bronquitis, asma y cólicos. En infusión como un té de la planta, se ha bebido como un demulcente y expectorante en bronquitis y como sedativo para aliviar la tos y el cólico gastrointestinal (21).

Las hojas como infusión son consideradas como emenagogas, antiespasmódicas de dolores menstruales, estimulantes y diuréticos (21).

3.4.2.9 Componentes químicos: En tallos y hojas, aceites eterio olor alcanforado, ácidos: arácnico, butírico, fórmico, linoléico. Alcoholes insaturados y esteroides: fitoesterol, hendriacosano, heptacosano, lippianol (21).

Componentes en flor, tallo y hojas: alcaloides no cuaternarios, alcaloides cuaternarios, polifenoles (21).

3.4.2.10 Actividad antimicrobiana: Las maceraciones etanólicas y metanólicas de *L. dulcis* han presentado acción inhibitoria *in vitro* sobre *S. typhi* (31, 32).

El extracto etanólico de la planta inhibe el crecimiento de algunas bacterias causales de infecciones respiratorias, como *S. aureus*, *S. pyogenes* y *S. pneumoniae* (27).

3.4.3 *Lippia graveolens* HBK

3.4.3.1 Familia: *Verbenaceae*

3.4.3.2 Sinónimos: *Lantana origanoides*, *L. berlandieri*, *Gonioschym graveolens*.

3.4.3.3 Nombre común: Orégano

3.4.3.4 Origen y distribución: Es nativa de Guatemala, se encuentra en pendientes pedregosas muy secas, en planicies o matorrales húmedos o secos; es habitual en la aldea, Casas de Pinto, de Rio Hondo, Zacapa y forma rodales densos en los cerros de la aldea Paso de los Jalapas, de El Jícaro, El Progreso. Se reporta del Sur de T́exas, México y Nicaragua (21).

3.4.3.5 Zona de vida: Bosque seco subtropical, monte espinoso subtropical.

3.4.3.6 Descripción

3.4.3.6.1 Hábito: Arbustos delgados de 2 m de alto, las ramas con pubescencia cortamente pilosa (21).

3.4.3.6.2 Hojas: En peciolos usualmente de 5 a 10 mm de largo, los limbos oblongos a elíptico y ovalado a ovalado-oblongo; de 2 a 4 cm de largo, usualmente obtusos o

redondeado en el ápice, algunas veces agudos, redondeados o subcordados en la base, densamente pilulosos en el haz, suave al tacto, glandular y densamente tomentosos o pilosa en el envés, los márgenes finamente crenados (21).

3.4.3.6.3 Flores: En espigas subglobosas a oblongas, de 4 a 12 mm de largo; brácteas en cuatro filas, ovaladas o lanceoladas, agudas, glandular y densamente pilosa; pedúnculos axilares de 2 a 6, de 4 a 12 mm de largo. Caliz de 1 a 2 mm de largo, glanduloso y velludo. Corola blanca, el tubo estribo, de 3 a 6 mm de largo (21).

3.4.3.7 Usos medicinales: La decocción de las hojas es tomada como un eficaz antiespasmódico en cólicos estomacales, vómitos, como expectorante y en forma de baños para la gripe. La planta en cocimiento con sal y aplicada en forma de lienzos es muy usada para los golpes (21).

La infusión de las hojas y flores se ha usado como estimulante, en menagogo y demulcente, la decocción se ha empleado como antiespasmódico contra el dolor de estómago y las diarreas (34).

Las hojas en infusión con leche, se ha bebido en afecciones bronquiales y asma (33). La decocción de la hoja es tomada (2 cucharadas grandes cada dos horas), para detener la disentería y como antiséptica intestinal (26).

3.4.3.8 Usos comestibles

3.4.3.8.1 Locales: Las hojas secas del orégano son utilizadas en las cocinas como condimento, en guacamole, ensaladas, chirmol, etc. (21).

3.4.3.8.2 Revisión bibliográfica: Las hojas verdes son muy usadas para sazonar pescado, salchichas o embutidos y otros alimentos y en la elaboración de un té. (21).

3.4.3.9 Componentes químicos: Contiene el aceite esencial carvacrol, de color amarillo, olor fuerte y muy picante (25).

3.4.3.10 Actividad antimicrobiana
En bibliografía consultada, no se ha reportado actividad antimicrobiana.

3.5 Descripción e infecciones causadas por los microorganismos en estudio.

3.5.1 Bacterias

Entre las infecciones causadas por las bacterias en estudio están las infecciones respiratorias y las infecciones gastrointestinales. Las infecciones respiratorias en Guatemala son la segunda causa de muerte. Los agentes patógenos más importantes de afecciones agudas son los virus, las infecciones virales son aceptadas en general como factores predisponentes para infecciones bacterianas las que ocurren a menudo durante el período de recuperación. En Guatemala las infecciones gastrointestinales constituyen la principal causa de morbimortalidad sobre todo en la población infantil, de un 60 - 70 por ciento de los niños que presentan diarrea mueren a causa de la deshidratación (35).

3.5.1.1 *Pseudomona aeruginosa*

Bacilo recto o ligeramente curvo, Gram negativo, no produce esporas, con flagelos polares monotricos, móvil, catalasa positivo, crece a 42°C., produce un olor característico debido a aminoacetofenona, y produce dos pigmentos la piocianina, y la que la hacen fluorescente. Crece con facilidad en los medios de cultivo, no fermenta la lactosa. Se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo, el agua, las aguas negras y en el aire. Algunas cepas de *P. aeruginosa* son resistentes a los antibióticos, por lo que son peligrosas en infecciones nosocomiales, en general las *Pseudomonas* son sensibles a los aminoglucósidos, por ejemplo la amikacina, gentamicina, penicilina y kanamicina (37).

3.5.1.2 *Staphylococcus aureus*

S. aureus suele agruparse en pares, tétradas, cadenas cortas y en racimos. Son bacterias Gram positivo, inmóviles. No formadores de esporas y no poseen cápsulas.

Las cepas patógenas suelen ser coagulasa positivo, hemolíticas y fermentan el manitol (38, 39). La virulencia de *S. aureus* se debe en gran parte a su capacidad de resistir o sobrevivir a la fagocitosis. La toxina alfa tiene diversas propiedades que aumentan su virulencia. Esta proteína mata las células fagocíticas, constriñe los músculos lisos, paraliza las paredes de los vasos sanguíneos, es dermonecrotica y en dosis suficiente mata a los animales de experimentación (38).

Probablemente el factor más importante para producir enfermedades por *S. aureus* sea la disminución de las defensas del huésped. El recién nacido es rápidamente colonizado por este microorganismo, y las infecciones estafilocócicas son frecuentes durante la infancia y la pubertad (40).

Puede causar infecciones respiratorias muy graves. Su principal patología es la neumonía que puede ser primaria o secundaria; la primera se manifiesta por fiebre alta, escalofríos múltiples, cianosis, disnea, dolor de tórax y producción de esputo viscoso, amarillento rojizo. En la secundaria o hematógena suele observarse múltiples infiltrados periféricos que se asemejan a lesiones embólicas que evolucionan hasta necrosis con formación de abscesos y una elevada frecuencia de empiema y neumotórax (41). Otras patologías importantes son la faringitis que se presenta en pacientes inmunodeprimidos, y la bronconeumonía que se caracteriza por estertores gruesos y finos (40).

3.5.1.3 *Streptococcus pyogenes*

Pertenece al género *Streptococcus* y es clasificado dentro del grupo A de Lancefield. Es un coco Gram positivo, esférico u ovoide, de un diámetro menor a 1 μm , se agrupan en cadenas formadas por pares de cocos íntimamente unidos, se dividen en un plano perpendicular al eje mayor de la cadena (42).

Es anaerobio facultativo, su metabolismo es fermentativo y el principal producto del mismo es el ácido láctico. Es catalasa y oxidasa negativo, no contiene ningún compuesto hemo. Su crecimiento es óptimo con un pH de 7.4 a 7.6 y a una temperatura de 36°C (41).

La gran mayoría de los estreptococos del grupo A, poseen cápsula, la cual está compuesta de ácido hialurónico. Esta no es inmunogénica, probablemente debido a la similitud estructural se mantiene con el sarcolema de los mamíferos, se ha postulado que juega un papel importante en la virulencia de la cepa. Dependiendo de la cantidad de ácido hialurónico que posea la cepa, así varía la morfología de la colonia en medios artificiales de cultivo, que puede ser mate, mucóide o lustrosa (42).

Entre las sustancias de mayor importancia liberadas por los estreptococos del grupo A, se encuentran la estreptolisina O y S, la toxina eritrogénica, la hialuronidasa, y varios tipos de nucleasas (42).

Se encuentra en el tracto respiratorio superior como causa común de faringitis aguda. Las infecciones causadas por esa bacteria presentan frecuentemente complicaciones, como: adenitis cervical, otitis media, mastoiditis y neumonía. Puede dejar graves secuelas como: fiebre reumática y glomerulonefritis aguda (43). Es universalmente susceptible a la penicilina G, por lo que puede excluirse la prueba de sensibilidad antibiótica en las cepas aisladas, amén que el paciente sea alérgico a ésta. En casos como estos, puede recurrirse al uso de tetraciclina o eritromicina, como tratamiento alternativo, pero se han reportado cepas resistentes (39).



3.5.1.4 *Salmonella typhi*

Los organismos del género *Salmonella* son bacilos móviles Gram negativo, aerobios que en forma característica no fermentan la lactosa y que son patógenos para el hombre, y los animales por vía bucal, son no esporulados, de longitud variable. La mayoría de las especies son móviles merced a flagelos peritrícos (excepto *S. pullorum* y *S. gallinarum*). Las salmonelas crecen fácilmente en los medios de cultivo ordinarios, pero no fermentan lactosa, sacarosa, ni salicina; forman ácidos y generalmente gas a partir de glucosa, maltosa, manitol y dextrina (37).

Las salmonelas presentan tres antígenos principales: los antígenos "H" o flagelares, los antígenos "O" somáticos (forman parte de la pared de la célula bacteriana), y los antígenos "Vi", antígenos K capsulares especializados se encuentran presentes en la extrema periferia de la bacteria. Contienen en su membrana lipopolisacáridos (37).

Es el agente causal de fiebre tifoidea, infección que se caracteriza clínicamente por malestar general, anorexia, cefalea y fiebre. Puede o no haber diarrea, si se presenta es de consistencia líquida contiene gran número de leucocitos polimorfo nucleares (44).

El cloranfenicol es la droga de elección para el tratamiento de fiebre tifoidea, se ha reportado el uso de trimetoprim-sulfametoxazole, ampicilina y furazolidone como antibióticos para tratamiento alternativo; sin embargo se han encontrado cepas resistentes al tratamiento de elección (45).

3.5.1.5 *Shigella flexneri*

Las shigelas, son bacilos Gram negativo, delgados, no capsulados, inmóviles, no esporulados. En cultivos jóvenes pueden presentar formas cocobacilares. Son microorganismos anaerobios facultativos, pero crecen mejor en aerobiosis. Forman colonias redondas, convexas, transparentes, de bordes enteros que alcanzan un diámetro de cerca de 2 mm en 24 hrs. Pueden reconocerse generalmente en los medios diferenciales por su incapacidad para fermentar la lactosa, permaneciendo por lo tanto incoloras, mientras que las colonias de los fermentadores de la lactosa forman colonias cromógenas. Todas las shigelas fermentan la glucosa; ninguna fermenta la salicina, con la excepción de *S. sonnei*. La variación de la forma colonial lisa (S) a rugosa (R) está asociada con la pérdida de la invasividad (37).

El género incluye cuatro especies: *S. dysenteriae*, *S. boydii*, *S. sonnei* y *S. flexneri*, las cuales pueden causar disentería bacilar. La shigelosis es usualmente endémica y es una causa importante de morbilidad y mortalidad (37).

Es un microorganismo que tiene la capacidad de invadir las células epiteliales de la mucosa del intestino delgado, donde proliferan provocando muerte celular. No se conoce si produce

una toxina *in vivo*. Es suficiente una pequeña dosis de la bacteria para provocar una infección clínicamente manifiesta. La infección en su forma clínica más leve se manifiesta por deposiciones líquidas, malestar general y cólicos. Los casos graves se manifiestan por fiebre alta, cólicos abdominales intensos, tenesmo y disentería (46).

Generalmente las shigelas son sensibles a la ampicilina, tetraciclina, estreptomina, sulfamida, kanamicina, ácido nalidíxico, cloranfenicol y colistina; sin embargo se han reportado cepas resistentes (45).

3.5.1.6 *Escherichia coli*

Bacilo Gram negativo, no esporulado, cuyo hábitat natural es el intestino del hombre y de los animales, microorganismo facultativo, crece bien en muchos medios comúnmente utilizados. Algunas cepas producen beta hemólisis en agar sangre. En medios de aislamiento entérico, muchas cepas aparecen como colonias fermentadoras. Muchas cepas son no pigmentadas, móviles, producen lisina descarboxilasa y utilizan acetato como única fuente de carbono, fermenta la lactosa, el gas de glucosa es positivo. La tipificación serológica de los antígenos de *E. coli*, antígeno O, K y H proporciona una útil herramienta epidemiológica (47).

Es la causa más común de infección de las vías urinarias en el hombre, también puede causar neumonía que se presenta como una bronconeumonía en parches, a menudo del lóbulo inferior. Puede producirse empiema, especialmente en pacientes que han tenido la enfermedad durante más de 6 días. *E. coli* es una causa mayor de meningitis neonatal, pero rara vez causa meningitis en poblaciones de mayor edad, puede invadir el torrente circulatorio durante cualquiera de las infecciones ya mencionadas (47).

Se considera susceptible a la mayoría de los antibióticos usados comúnmente contra bacilos Gram negativo. Sin embargo, se han reportado cepas resistentes a la ampicilina, cefalotina, neomicina y trimetoprim-sulfametoxazol (39).

3.5.2 Hongos

La clasificación de los dermatofitos (hongos queratinofílicos taxonómicamente relacionados como un grupo) se basa en sus características morfológicas macro y microscópicas (48).

Actualmente hay 39 especies reconocidas de dermatofitos, clasificadas en tres géneros llamados: *Microsporum* (16 especies), *Trichophyton* (21 especies) y *Epidermophyton* (2 especies) (48).



3.5.2.1 *Aspergillus flavus*

Presenta estructuras tabicadas filamentosas que, por lo general se ramifica en dicotomía. Los cultivos sobre medio Sabouraud-agar incubados a 37-40°C se desarrollan como colonia de color gris-verde con domo central de conidióforos. Estos sostienen a las cadenas radiantes de conidios que son características (37).

Produce un grupo de compuestos relacionados, la aflatoxina que son muy tóxicas (al igual que carcinógenas) para los animales (37).

3.5.2.2 *Epidermophyton floccosum*

Es un hongo de crecimiento lento, su colonia es de color blanco y algodonosa al principio, luego se torna seca y aterciopelada, de color verde a canela, la superficie es plana o radiada, en el reverso presenta un pigmento de color café canela. Presenta numerosas macroconidias en forma de mazo con 1-5 células. Las microconidias están ausentes. Las hifas en forma de espiral son raras, aparecen clamidosporas solo en cultivos viejos. No requiere de condiciones nutricionales especiales para su cultivo. Agente común de tinea pedis, tinea unguium y tinea cruris. Este hongo invade la piel y las uñas nunca el cabello (49).

3.5.2.3 *Microsporum gypsum*

Ataca la piel, el pelo y uñas. Es de crecimiento rápido y de aspecto pulverulento tiene color pardo claro, algunas cepas desarrollan un micelio aéreo blanco, lanudo que más tarde toma aspecto polvoriento y color pardo claro en el centro con surcos radiantes. El reverso de la colonia tiene color pardo rojizo a anaranjado (50).

En el exámen microscópico pueden verse grandes macroconidias en cadena, de pared delgada, elipsoide, con 4 a 6 tabiques. En los cultivos primarios se encuentran microconidias en maza, unicelulares pequeños (50).

Es una especie geofílica que produce tiña esporádica en niños y adultos. Se ha aislado del suelo en el mundo entero (50).

3.5.2.4 *Trichophyton rubrum*

Las colonias presentan crecimiento lento planas o abultadas en el centro, con una superficie velloza, blanca (algunas cepas pulverulentas o rugosas), algodonosa que se torna rosada, pueden tener mucho o poco micelio. En el reverso la colonia se forma un pigmento rojo oscuro en el 95 por ciento de las cepas, mientras que el 5 por ciento restante de las cepas se observa un pigmento más café o no lo tienen. Las microconidias son delgadas en forma de clava, adheridas en forma alterna a hifas indiferenciadas o en tallos cortos. No tienen macroconidias, a excepción de la cepa africana que las tiene abundantes alargadas y elongadas. No requiere de condiciones especiales de nutrición, es un agente común de tineas en piel, uñas y menos frecuente del

pelo. Es un hongo antropofílico (39).

3.5.3 Levaduras

Se refiere a un grupo de hongos que tienen características morfológicas y fisiológicas de levaduras. Todas producen colonias húmedas de consistencia cremosa. Morfológicamente son esencialmente organismos unicelulares, sin embargo algunos de los hongos de este grupo producen micelio además de las formas unicelulares (50).

3.5.3.1 *Candida albicans*

Es el agente causal de candidiasis, la cual es una infección aguda o subaguda, que puede producir lesiones en: boca, vagina, piel, uña, bronquios o pulmones y ocasionalmente septicemia, endocarditis y meningitis. Factores predisponentes: diabetes sacarina, trastornos del sistema hematopoyético, lesiones, etc (50).

Las levaduras o blastosporas son redondas, ovales u oblongas y miden 2.5 por 3 a 14 μm aparecen solas o en grupos o cadenas. En medios nutricionales pobres desarrollan abundantes pseudohifas. La producción de tubos germinales y clamidosporas esféricas son características útiles para su identificación. Su crecimiento es aeróbico y de 24 a 36 horas aparecen colonias pequeñas que llegan a tener 1.5 a 2 mm en 7 días en agar Sabouraud. Las colonias son blancas pero pueden pasar a crema o beige con el tiempo (39).

4 JUSTIFICACION

Existe en la naturaleza gran variedad de plantas, que sus efectos han sido positivos contra diversas afecciones, razón por la cual estas han sido bien aceptadas y se pueden encontrar a la venta en los mercados o en establecimientos comerciales llamados "Centros Naturistas".

La ventaja de estos productos, es que la población los acepta con facilidad por ser de origen natural y debido a la situación económica del país, al alto costo de las medicinas y a la aceptación cultural generalizada, las plantas constituyen la primera medida de tratamiento al alcance de la mayoría de habitantes.

Se ha demostrado preliminarmente una cierta actividad antimicrobiana de los extractos, de tres especies del género *Lippia* (*L. alba*, *L. dulcis*, *L. graveolens*). Es necesario evaluar con mayor profundidad dicha acción, utilizando una metodología que permita confirmarla y validar de esta manera en forma científica, el uso popular de estas plantas para el tratamiento de una variedad de procesos infecciosos.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- 5.1.1 Contribuir a validar el uso de plantas medicinales empleadas popularmente para el tratamiento de los procesos infecciosos.

5.2 Objetivos Específicos

- 5.2.1 Confirmar la actividad antimicrobiana contra bacterias (*S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi* y *S. flexneri*), y hongos (*A. flavus*, *C. albicans*, *M. gypseum* y *T. rubrum*) de extractos de tres especies del género *Lippia*, cuyas propiedades han sido evaluadas en forma preliminar en trabajos anteriores.
- 5.2.2 Determinar el órgano de la planta que posee mayor actividad antimicrobiana
- 5.2.3 Determinar en que disolvente se obtiene la mayor actividad antimicrobiana, sobre los microorganismos en estudio y la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).



6 HIPOTESIS

- 6.1 La parte aérea, tiene mayor actividad que la parte subterránea de las plantas en estudio.
- 6.2 *Lippia graveolens* posee la mayor actividad antimicrobiana respecto a las otras especies en estudio.

7 MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo de trabajo

Plantas que han mostrado actividad antimicrobiana *in vitro*, bacterias causales de infecciones gastrointestinales, respiratorias y de la piel, diferentes disolventes para la extracción disponibles en el mercado nacional.

7.2 Muestra

7.2.1 Parte aérea y subterránea de: *L. alba*, *L. dulcis* y *L. graveolens*.

7.2.2 Cepas de seis bacterias

Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Salmonella typhi INCAP ST-001

Shigella flexneri INCAP CDC

Streptococcus pyogenes INCAP 90809

Escherichia coli ATCC 9637

7.2.3 Cepas de cinco hongos

Candida albicans ATCC 10231

Aspergillus flavus A-75

Epidermophyton floccosum IGSS 761

Microsporium gypseum M-71

Trichophyton rubrum T-3.5

7.3 Recursos

7.3.1 Recursos humanos

Autor: Br. Julia Cristina Mendoza Cruz

Asesor: Lic. Armando Cáceres

7.3.2 Materiales

7.3.2.1 Recursos físicos

Laboratorio de productos fitofarmacéuticos FARMAYA.

Departamento de Cito histología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia USAC.

7.3.2.2 Disolventes y medios

Etanol al 50% y 95%

Diclorometano

Agua destilada

Agar Mueller Hinton

Agar Sabouraud para producción de esporas de Takashio

Agar sangre de carnero al 5%

7.3.2.3 Equipo y cristalería

Balanza analítica

Autoclave

Refrigerador

Incubadora

Mechero

Campana microbiológica

Unidad de filtración con bomba de vacío

Vortex o mezclador

Papel filtro Whatman N° 1

Filtros milipore 0.45 mm

Soporte con anillo gravesande

Tubos con tapón de rosca

Pipetas serológicas

Probeta graduada

Erlenmeyer de 250 y 500 ml

Embudo de vástago corto

Cajas de petri de 15 mm



Algodón

Gaza

Asa de nicromo calibrada

Frascos de color ambar de 3 onzas fluidas

Agitadores de vidrio

7.4 Procedimiento

7.4.1 Selección de plantas

Se escogieron tres plantas que presentaron alguna acción antimicrobiana en trabajos anteriores como lo son tres especies del género *Lippia* (*L. alba*, *L. dulcis* y *L. graveolens*).

7.4.2 Recolección y clasificación

Se recolectaron las plantas en los departamentos de Guatemala y El Progreso para su clasificación.

7.4.3 Preparación de las plantas

Las partes de las plantas trabajadas se colocaron en secadores especiales para el proceso, posteriormente se cortaron en pedazos pequeños y se molieron hasta alcanzar estructuras de igual tamaño. Finalmente se almacenaron en bolsas plásticas selladas.

7.4.4 Obtención de las tinturas vegetales

Para la obtención de la tintura vegetal se utilizaron 10 g de la materia vegetal y se mezclaron con 100 ml de etanol al 50 por ciento durante 3 días. Se filtró con membrana de papel filtro Whatman N° 1.

7.4.5 Obtención de aceites esenciales

Se utilizaron 100 g de las hojas de cada una de las plantas y se mezclaron con 1000 ml de agua destilada durante un día. Se efectuó la destilación por arrastre con vapor de agua, el destilado (agua + aceite) obtenido de cada una de las plantas se mezcló con eter y se colocó en una ampolla de decantación para poder separar el aceite del agua, posteriormente se guardaron en frascos de color ambar refrigerándose hasta su utilización.

7.4.6 Preparación del medio (Método de Mitscher *et al.* 1972) para bacterias y levaduras.

Se prepararon 9 ml de Mueller Hinton y se le adicionó 1 ml del extracto vegetal de cada planta, posteriormente se virvió en una caja de petri para su confrontación microbiana. Se incubó a 35°C durante 24 horas para observar crecimiento bacteriano, almacenándose las cajas libres de contaminación en bolsas plásticas a 4°C.

7.4.7 Preparación del inóculo

Se purificaron los microorganismos a ensayar e inocularon en un tubo con 8 ml de agar tripticasa soya inclinado e incubaron a 35°C durante 24 horas. Se inoculó una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5 ml de caldo tripticasa soya, incubándose a 35°C durante 24 horas, para el caso de las bacterias se diluyó 0.1 ml de la suspensión en 10 ml de solución salina estéril (SSE) y en el caso de las levaduras, un mililitro de la suspensión en 10 ml de solución salina estéril.

7.4.8 Demostración de la actividad

Se inoculó en las cajas con extracto crudo una asada de cada uno de los microorganismos, siguiendo un patrón de ocho partes iguales con una zona clara en el centro de la caja, se dejó reposar durante 5 a 10 minutos y se incubó a 35°C durante 24 horas.

7.4.9 Interpretación de resultados

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

Si hubo crecimiento (- = negativo) Actividad

Si hay alteración morfológica (p = parcial)

Si hay apareamiento de colonias a lo largo del inóculo (R = resistencia).

Presencia de microorganismos fuera del lugar de los inóculos (C=contaminación).

7.4.10 Preparación del medio (Método de Takashio) para hongos.

Se elaboró agar Sabouraud modificado según la técnica de Takashio, para la mayor producción de esporas se inocularon los hongos a estudiar, luego se incubaron a 27°C durante 15 días. Se adicionaron tres mililitros de agua destilada estéril a cada tubo y se agitó con una varilla de vidrio para hacer una suspensión homogénea del hongo, se mezcló la suspensión en un vortex durante 1 minuto, luego se efectuó el conteo de esporas en una cámara de Neubauer para llevar a cabo una concentración de 300 esporas por mililitro y de 100 por mililitro para *A. flavus*, almacenándose en viales a 4°C hasta su utilización.

7.4.11 Preparación del agar-planta para hongos (Método de Mac Rae et al. 1980)

Se prepararon tubos de ensayo conteniendo 13.5 ml de medio Sabouraud estéril y cuando alcanzaron una temperatura aproximada de 50°C se le agregaron 1.5 ml del extracto del órgano a ensayar (dilución 1:10). Se virvió el agar-planta en cajas de petri estériles, se esperó a que solidificara y posteriormente se guardaron en refrigeración durante 24 horas.

7.4.12 Demostración de la actividad

Se perforaron 4 pocitos en el agar-planta con la boca de una campana de Durhan (6 mm de diámetro), inoculándose 30 µl de la suspensión de esporas preparada previamente, se incubó a 27°C durante 24 horas, posteriormente se les dió vuelta a las cajas e incubaron a 27°C durante 15 días.

7.4.13 Interpretación de los resultados

Después de 15 días de incubación se midieron los diámetros de crecimiento de las colonias alrededor de cada inóculo. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento comparando el diámetro de las colonias control con el de las colonias en cajas con agar y planta. Se eligieron como positivos aquellos órganos de la planta que redujeron el diámetro de la colonia control en un 75 por ciento.

7.4.14 Selección del mejor disolvente

Una vez determinado el o los órganos con mejor actividad antimicrobiana, se obtuvieron extractos con diclorometano, etanol y agua. El extracto con diclorometano se concentró en rotavapor hasta alcanzar una consistencia de miel. Finalmente se suspendió cada extracto en su respectivo disolvente obteniéndose una dilución 1:10, se almacenaron en frascos de color ámbar hasta el momento de la prueba.

Para probar el mejor disolvente, se utilizó el mismo procedimiento de tamizaje usándose el o los órganos que demostraron mayor actividad.

7.4.10 Preparación del medio (Método de Takashio) para hongos.

Se elaboró agar Sabouraud modificado según la técnica de Takashio, para la mayor producción de esporas se inocularon los hongos a estudiar, luego se incubaron a 27°C durante 15 días. Se adicionaron tres mililitros de agua destilada estéril a cada tubo y se agitó con una varilla de vidrio para hacer una suspensión homogénea del hongo, se mezcló la suspensión en un vortex durante 1 minuto, luego se efectuó el conteo de esporas en una cámara de Neubauer para llevar a cabo una concentración de 300 esporas por mililitro y de 100 por mililitro para *A. flavus*, almacenándose en viales a 4°C hasta su utilización.

7.4.11 Preparación del agar-planta para hongos (Método de Mac Rae et al. 1980)

Se prepararon tubos de ensayo conteniendo 13.5 ml de medio Sabouraud estéril y cuando alcanzaron una temperatura aproximada de 50°C se le agregaron 1.5 ml del extracto del órgano a ensayar (dilución 1:10). Se virió el agar-planta en cajas de petri estériles, se esperó a que solidificara y posteriormente se guardaron en refrigeración durante 24 horas.

7.4.12 Demostración de la actividad

Se perforaron 4 pocitos en el agar-planta con la boca de una campana de Durhan (6 mm de diámetro), inoculándose 30 µl de la suspensión de esporas preparada previamente, se incubó a 27°C durante 24 horas, posteriormente se les dió vuelta a las cajas e incubaron a 27°C durante 15 días.

7.4.13 Interpretación de los resultados

Después de 15 días de incubación se midieron los diámetros de crecimiento de las colonias alrededor de cada inóculo. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento comparando el diámetro de las colonias control con el de las colonias en cajas con agar y planta. Se eligieron como positivos aquellos órganos de la planta que redujeron el diámetro de la colonia control en un 75 por ciento.

7.4.14 Selección del mejor disolvente

Una vez determinado el o los órganos con mejor actividad antimicrobiana, se obtuvieron extractos con diclorometano, etanol y agua. El extracto con diclorometano se concentró en rotavapor hasta alcanzar una consistencia de miel. Finalmente se suspendió cada extracto en su respectivo disolvente obteniéndose una dilución 1:10, se almacenaron en frascos de color ámbar hasta el momento de la prueba.

Para probar el mejor disolvente, se utilizó el mismo procedimiento de tamizaje usándose el o los órganos que demostraron mayor actividad.

7.4.15 Determinación de la CIM.

Se ensayó el órgano con el mejor disolvente que demostró mayor actividad contra tres concentraciones (10, 5 y 1 mg) en el caso de bacterias y levaduras, con los hongos se confrontaron los extractos que presentaron mayor inhibición.

7.5 Diseño estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó por medio de un análisis binomial.

Para la realización de la parte experimental, se inició con un tamizaje para bacterias y un tamizaje para hongos para determinar el mejor órgano de las tres plantas en estudio, luego se determinó el mejor disolvente y finalmente se realizó la concentración inhibitoria mínima del mejor disolvente.

7.5.1 Diseño estadístico para tamizaje de bacterias

Diseño al azar.

Para este estudio se usará un alfa de 0.1, la prueba de hipótesis binomial será:

H_0 : La planta no tiene efecto inhibitorio ($p = 0.5$).

H_a : La planta si tiene efecto inhibitorio ($p > 0.5$).

H_0 . Se rechazará si la probabilidad de error es menor a alfa = 0.1

Variable binomial: Exito = inhibición (+).

Fracaso = crecimiento (-).

7.5.2 Diseño estadístico para tamizaje de hongos

Diseño al azar

Criterio de clasificación

Si hay inhibición: El diámetro deberá ser menor o igual al 25% del diámetro del control.

No hay inhibición: El diámetro deberá ser mayor o igual al 26% del diámetro del control.

Variable binomial: Exito = inhibición (+).

Fracaso = crecimiento (-).

7.5.3 Diseño estadístico para el mejor disolvente.

Se trabajó con tres disolventes, el diseño fué el mismo que para el tamizaje.

7.5.4 Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

Se trabajó el o los órganos que presentaron mayor actividad, se trabajaron tres concentraciones (10, 5 y 1 mg), el diseño fue el mismo que para el tamizaje para bacterias y hongos según sea el caso.



8 RESULTADOS

En éste estudio se trabajaron las tinturas de las hojas y raíces de tres especies del género *Lippia* (*L. alba*, *L. dulcis* y *L. graveolens*), con el propósito de determinar la actividad antimicrobiana contra: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. flexneri*, *S. aureus*, *S. pyogenes* y antimicótica para *A. flavus*, *E. floccosum*, *M. gypseum*, *T. rubrum* y *C. albicans*.

En la primera parte del estudio se realizó un tamizaje de las tinturas contra las bacterias y los hongos a estudiar empleando para las bacterias y hongos levaduriformes el método de Mitscher, el cual consiste en un método de dilución en agar inoculado por estrias y en el caso de los hongos se utilizó el método de MacRae siempre por dilución en agar y perforando cuatro agujeros equidistantes en el agar de cada caja con la boca de una campana de Durhan.

Los resultados obtenidos de los extractos vegetales para cada bacteria en la fase de tamizaje a una concentración de las tinturas de 10 mg/ml fueron positivos para las hojas de *L. dulcis* y *L. graveolens* a excepción de *E. coli* que no fue inhibido por *L. dulcis* y negativo para las hojas de *L. alba* ya que únicamente *S. aureus* fue inhibida. En el caso de las raíces ningún extracto dio actividad antimicrobiana (Tabla 1).

Tabla 1. Fase de Tamizaje de la Actividad Antibacteriana de las tres especies del género *Lippia*, Etanol al 50%.

Planta	Parte usada	Bacterias					
		A	B	C	D	E	F
<i>Lippia alba</i>	hoja	-	-	-	-	+	-
<i>Lippia alba</i>	raíz	-	-	-	-	-	-
<i>Lippia dulcis</i>	hoja	-	+	+	+	+	+
<i>Lippia dulcis</i>	raíz	-	-	-	-	-	-
<i>Lippia graveolens</i>	hoja	+	+	+	+	+	+
<i>Lippia graveolens</i>	raíz	-	-	-	-	-	-

Bacterias ensayadas: A = *E. coli*, B = *P. aeruginosa*, C = *S. typhi*, D = *S. flexneri*, E = *S. aureus*, F = *S. pyogenes*. + = Positivo: Inhibición (no crecimiento); - = Negativo: No inhibición (crecimiento).

La actividad antimicótica donde la concentración utilizada fue de 10 mg/ml, los extractos de las hojas de *L. alba* fueron activos únicamente contra *M. gypseum*, *L. dulcis* inhibió tanto a *M. gypseum* como a *C. albicans*, sin embargo *L. graveolens* inhibió a los cinco hongos estudiados. Esta actividad no se demostró en la tintura de las raíces (Tabla 2).

Tabla 2. Fase de Tamizaje de la Actividad Antimicótica de las tres especies del género *Lippia*, Etanol al 50%.

Planta	Parte usada	H o n g o s				
		A	B	C	D	E
<i>Lippia alba</i>	hoja	-	-	+	-	-
<i>Lippia alba</i>	raíz	-	-	-	-	-
<i>Lippia dulcis</i>	hoja	-	-	+	-	+
<i>Lippia dulcis</i>	raíz	-	-	-	-	-
<i>Lippia graveolens</i>	hoja	+	+	+	+	+
<i>Lippia graveolens</i>	raíz	-	-	-	-	-

Hongos ensayados: A = *A. flavus*, B = *E. floccosum*, C = *M. gypseum*, D = *T. rubrum*, E = *C. albicans*. + = Positivo: Inhibición, significativo de porcentaje de crecimiento $\leq 25\%$; - = Negativo: No inhibición, representativo de un porcentaje de crecimiento $> 25\%$.

Los aceites esenciales obtenidos de las hojas de las tres especies en estudio, inhibieron totalmente a los microorganismos excluyendo a *S. pyogenes*, ya que ésta fue inhibida únicamente por el aceite esencial de *L. graveolens* (Tabla 3).



Una vez determinado el órgano con mejor actividad antimicrobiana, se llevó a cabo la fase de evaluación del mejor disolvente (agua, diclorometano y etanol al 80%), donde los resultados obtenidos de *L. dulcis* con los tres disolventes fueron negativos para el extracto acuoso y positivos para el extracto con diclorometano excluyendo a *E. coli* y *S. pyogenes*, el etanol al 80% inhibió a *S. aureus* únicamente y el resto de microorganismos no fue inhibido (Tabla 5), mientras que para *L. graveolens* el diclorometano y etanol al 80% inhibieron a todas las bacterias a excepción de *S. pyogenes* que fue inhibido únicamente por etanol al 80% (Tabla 5).

Tabla 5. Actividad Antibacteriana de las hojas de *L. dulcis* y *L. graveolens* contra tres disolventes.

Planta	Disolvente	Bacterias					
		A	B	C	D	E	F
<i>Lippia dulcis</i>	diclorometano	-	+	+	+	+	-
	etanol al 80%	-	-	-	-	+	-
	agua	-	-	-	-	-	-
<i>Lippia graveolens</i>	diclorometano	+	+	+	+	+	-
	etanol al 80%	+	+	+	+	+	+
	agua	-	-	-	-	-	-

Bacterias ensayadas: A = *E. coli*, B = *P. aeruginosa*, C = *S. typhi*, D = *S. flexneri*, E = *S. aureus*, F = *S. pyogenes*. + = Positivo: Inhibición (no hubo crecimiento); - = Negativo: No inhibición (crecimiento).

Esta fase, en el caso de hongos fue empleada para las hojas de las tres especies ya que *M. gypseum* fue inhibido por *L. alba* y *L. dulcis*, en tanto que para *L. graveolens* inhibió los cuatro hongos (Tabla 6).



Tabla 6. Actividad antimicótica de las hojas de las tres especies del género *Lippia* con tres disolventes.

Planta	Disolvente	H o n g o s				
		A	B	C	D	E
<i>Lippia alba</i>	diclorometano	°	°	-	°	°
	etanol al 80%	°	°	-	°	°
	agua	°	°	-	°	°
<i>Lippia dulcis</i>	diclorometano	°	°	+	°	+
	etanol al 80%	°	°	-	°	-
	agua	°	°	-	°	-
<i>Lippia graveolens</i>	diclorometano	+	+	+	+	+
	etanol al 80%	+	+	+	+	+
	agua	-	+	+	+	-

Hongos ensayados: A = *A. flavus*, B = *E. floccosum*, C = *M. gypseum*, D = *T. rubrum*, E = *C. albicans*. + = Positivo: Inhibición, significativo de porcentaje de crecimiento $\leq 25\%$; - = Negativo: No inhibición, representativo de un porcentaje de crecimiento $> 25\%$ del diámetro del control, ° = No ensayados.

La fase de determinación de la CIM, se llevo a cabo para las hojas de *L. dulcis* por haber presentado inhibición para bacterias y hongos de los que *E. coli* y *S. pyogenes* no fueron inhibidos a una concentración de 10 mg/ml por el diclorometano sin embargo el resto de microorganismos fueron inhibidos. *S. aureus* fue el único microorganismo inhibido por el extracto con etanol al 80% hasta 2.5 mg/ml (Tabla 7).

Tabla 7. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de las hojas de *L. dulcis*.

Disolvente	Microorganismos	Concentración (mg/ml)			
		10	5	2.5	1
Diclorometano	<i>E. coli</i>	-	-	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	+	-	-	-
	<i>S. typhi</i>	+	+	-	-
	<i>S. flexneri</i>	+	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	+	-	-	-
	<i>S. pyogenes</i>	-	-	-	-
Etanol al 80%	<i>E. coli</i>	-	°	°	°
	<i>P. aeruginosa</i>	-	°	°	°
	<i>S. typhi</i>	-	°	°	°
	<i>S. flexneri</i>	-	°	°	°
	<i>S. aureus</i>	+	+	+	-
	<i>S. pyogenes</i>	-	°	°	°

+ = Positivo: Significativo de inhibición, - = Negativo: No inhibición. ° = No ensayados.

Para el caso de los hongos se realizó esta fase empleando el extracto diclorometánico contra *M. gypseum* y *C. albicans* en el que la CIM fue de 5 mg/ml para *M. gypseum* y para *C. albicans* de 10 mg/ml (Tabla 8).

Tabla 8. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de las hojas de *L. dulcis* contra *M. gypseum* y *C. albicans*.

Disolvente	Hongos	Concentración (mg/ml)			
		10	5	2.5	1
Diclorometano	<i>M. gypseum</i>	+	+	+	-
	<i>C. albicans</i>	+	-	-	-

+ = Positivo: Inhibición, significativo de porcentaje de crecimiento $\leq 25\%$; - = Negativo: No inhibición representativo de un porcentaje de crecimiento $> 25\%$ del diámetro del control.

Se emplearon también las hojas de *L. graveolens* ya que en la parte anterior mostraron cierta inhibición tanto para bacterias como para hongos con diclorometano y etanol al 80%, la CIM para *S. aureus* con extracto etanólico de *L. graveolens* fue de 1.75 mg/ml (Tabla 9).

Tabla 9. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de las hojas de *L. graveolens*.

Disolvente	Microorganismos	Concentración (mg/ml)				
		10	5	2.5	1.75	1
Diclorometano	<i>E. coli</i>	+	-	-	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	+	-	-	-	-
	<i>S. typhi</i>	+	-	-	-	-
	<i>S. flexneri</i>	+	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	+	-	-	-	-
	<i>S. pyogenes</i>	-	-	-	-	-
Etanol al 80%	<i>E. Coli</i>	+	-	-	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	+	-	-	-	-
	<i>S. Typhi</i>	+	-	-	-	-
	<i>S. flexneri</i>	+	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	-
	<i>S. pyogenes</i>	+	-	-	-	-

+ = Positivo: Significativo de inhibición (No hubo crecimiento);
 - = Negativo: No inhibición (Crecimiento).

La CIM para hongos fué de 1 mg/ml (Tabla 10).

Tabla 10. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de las hojas de *L. graveolens* contra los cinco hongos en estudio.

Disolvente	Hongos	Concentración (mg/ml)			
		10	5	2.5	1
Diclorometano	<i>C. albicans</i>	+	+	-	-
	<i>A. flavus</i>	+	+	+	-
	<i>E. floccosum</i>	+	+	+	-
	<i>M. gypseum</i>	+	+	+	-
	<i>T. rubrum</i>	+	+	+	-
Etanol al 80%	<i>C. albicans</i>	+	-	-	-
	<i>A. flavus</i>	+	-	-	-
	<i>E. floccosum</i>	+	-	-	-
	<i>M. gypseum</i>	+	+	+	-
	<i>T. rubrum</i>	+	+	+	-
Agua	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-
	<i>E. floccosum</i>	+	-	-	-
	<i>M. gypseum</i>	+	-	-	-
	<i>T. rubrum</i>	+	-	-	-

+ = Positivo: Inhibición, significativo de porcentaje de crecimiento $\leq 25\%$; - = Negativo: No inhibición, representativo de un porcentaje de crecimiento $> 25\%$ del diámetro del control.

Se realizó ésta fase únicamente para el aceite esencial de *L. graveolens* contra *T. rubrum* llegándose a una CIM de 5 mg/ml. No se efectuó para las otras dos plantas debido a la poca cantidad de aceite obtenido.

Todos los ensayos que se presentan como actividad positiva (+), representan las cuatro repeticiones, lo que indica que hay una actividad antimicrobiana estadísticamente significativa de $t < 0.1$.



9 DISCUSION DE RESULTADOS

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

Sin embargo en éste estudio se llevó a cabo la preparación del medio para bacterias y levaduras empleando la prueba de dilución en agar de Mitscher *et al.* debido a que es rápida, simple, sensible, de bajo costo y se puede determinar la CIM de una maceración contra 6 u 8 microorganismos al mismo tiempo. Esta prueba consistió en añadir al extracto vegetal el medio aún líquido luego se vertió en cajas de petri y se hicieron estrias de inóculos bacterianos en forma radial.

Mientras que los hongos fueron ensayados con una modificación del método de dilución en agar basándose en el método de MacRae *et al.* el cual posee la ventaja de poder medir el diámetro del halo del hongo ensayado y así cuantificar el grado de inhibición de las plantas ensayadas con respecto a los hongos en estudio.

De acuerdo a estudios efectuados anteriormente, se confirmó la actividad antimicrobiana de las tres especies del género *Lippia* (*L. alba*, *L. dulcis* y *L. graveolens*) mediante tres fases, mejor órgano, mejor disolvente y CIM contra algunos microorganismos y se demostró por primera vez la actividad en otros.

En la fase de elección del mejor órgano (tamizaje), los extractos de las hojas y raíces fueron enfrentados a bacterias y hongos a una concentración de 10 mg/ml. Debe tomarse en cuenta que para el estudio de tamizaje efectuado anteriormente para estas tres especies, se trabajaron únicamente bacterias gram-positivo, por lo que se pone en evidencia por primera vez la acción presentada contra las bacterias gram-negativo y hongos. Las hojas de las tres especies fueron las que inhibieron tanto a bacterias como a hongos; *L. alba* inhibió únicamente a *S. aureus*, mientras que *L. dulcis* presentó actividad contra la mayoría de las bacterias a excepción de *E. coli* y *L. graveolens* inhibió a todas las bacterias ensayadas. En el caso de los hongos *L. alba* inhibió solamente a *M. gypseum*, *L. dulcis* a *M. gypseum* y *C. albicans* y *L. graveolens* a los cinco hongos en estudio. Las raíces de las tres plantas no demostraron actividad antimicrobiana.

En esta forma se comprueba la primera hipótesis planteada que afirma que la parte aérea, tiene mayor actividad que la parte subterránea de las plantas en estudio. Por lo que el órgano que debe trabajarse para continuar con la elucidación estructural y

ensayos clínicos son las hojas, por poseer buena actividad antimicrobiana y a la vez por ser un órgano naturalmente abundante.

En la segunda parte del estudio, se buscaba comprobar con que disolvente se obtiene el extracto con mayor actividad antimicrobiana. Para ello se usaron disolventes de diferente polaridad (diclorometano, etanol al 80% y agua). Se trabajaron las hojas de las tres especies a una concentración de 10 mg/ml tanto para bacterias como para hongos. Los microorganismos ensayados con los tres extractos de *L. dulcis* fueron negativos para el extracto acuoso y positivos para el extracto con diclorometano excluyendo a *E. coli* y *S. pyogenes*, el etanol al 80% inhibió a *S. aureus* únicamente y el resto de bacterias no fueron inhibidos, mientras que los extractos de *L. graveolens* con diclorometano y etanol al 80% inhibieron a todas las bacterias a excepción de *S. pyogenes* que fue inhibido solamente por el etanol al 80% y el extracto acuoso siempre de *L. graveolens* no inhibió a ninguna bacteria. Los tres extractos de *L. alba* fueron enfrentados contra *M. gypseum*, y los de *L. dulcis* contra *M. gypseum* y *C. albicans* comprobándose que el de *L. dulcis* con diclorometano fué el único que inhibió ambos hongos. Los extractos de *L. graveolens* inhibieron a los cinco hongos, excluyendo el extracto acuoso que no presentó actividad contra *A. flavus* y *C. albicans*, resultados que nos evidencian que el diclorometano y el etanol al 80% fueron los mejores disolventes que extrajeron el principio antibacteriano y antimicótico de las hojas de las tres especies.

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de las hojas de las tres especies presentaron resultados interesantes, de los cuales podemos apreciar su actividad contra las bacterias y hongos por lo que es de vital importancia utilizar estos aceites para la elaboración de productos medicinales accesibles a la población y así contribuir al uso popular de las plantas, en afecciones causadas por algunos de los microorganismos ensayados.

En cuanto a la determinación de la CIM de los extractos cuya actividad fue detectada en la fase anterior se emplearon concentraciones de 10, 5, 2.5 y 1 mg/ml de cada extracto. De los que *L. dulcis* con diclorometano presentó inhibición de *M. gypseum* hasta 2.5 mg/ml, y de *C. albicans* en concentración de 10 mg/ml. *L. graveolens* con etanol al 80% inhibió a *S. aureus* a 1.75 mg/ml. Los tres extractos de *L. graveolens* fueron ensayados para los hongos, el extracto acuoso presentó actividad positiva a 10 mg/ml para *E. floccosum*, *M. gypseum* y *T. rubrum*. El extracto con diclorometano inhibió hasta 2.5 mg/ml a cuatro de los cinco hongos y el etanol al 80% a *M. gypseum* y *T. rubrum*, sin embargo *A. flavus*, *E. floccosum* y *C. albicans* fueron inhibidos solamente con 10 mg/ml del mismo extracto. Con esto podemos indicar que la mejor concentración de inhibición es de 10 mg/ml debido a que la mayoría de inhibiciones tanto de bacterias y hongos se dieron a ésta concentración.

Con este estudio se confirma la actividad de *L. alba* contra *S. aureus* y de *L. graveolens* contra *S. pyogenes*, estudio llevado a cabo preliminarmente (51) que nos indica a la vez que tanto *L. dulcis* como *L. graveolens* no inhiben a *S. aureus*, pero en el presente estudio se demostró que si la inhibe. Esta diferencia podría deberse a que las plantas para cada estudio fueron recolectadas en regiones distintas y en diferentes épocas del año y trabajadas a concentraciones diferentes. La época de recolección es de vital importancia, puesto que la cantidad y a veces la naturaleza de los principios activos, no son constantes a lo largo del año. Además la edad de las plantas influyen no solo en la cantidad total de principios activos producidos, sino también en las proporciones relativas de los componentes de la mezcla activa. Existen otros factores que alteran el desarrollo de las plantas entre ellos están: las lluvias, orientación del terreno, duración del día, altitud, temperatura, intensidad de la luz y manejo post-cosecha.

L. graveolens (orégano) fue de las especies estudiadas, la que presentó los mejores resultados, tanto para las bacterias como para hongos. Esta planta fue la única que inhibió a *A. flavus*, que es un hongo sumamente resistente, lo que nos demuestra la gran actividad antimicótica y es por eso que deberá identificarse su principio activo y luego analizar las propiedades antibióticas y tóxicas, para que posteriormente los médicos puedan hacer estudios clínicos y preclínicos con grupos de personas.

Debido a que los resultados obtenidos de los aceites esenciales fueron interesantes tanto para bacterias como para hongos, es necesario averiguar si la actividad se mantiene en el extracto luego de aislar el aceite.



10 CONCLUSIONES

- 10.1 Las hojas de las tres especies en estudio fueron las que mejor actividad presentaron contra las bacterias y hongos estudiados, mientras que las raíces no demostraron actividad antimicrobiana.
- 10.2 En la fase de tamizaje efectuada para las hojas y raíces de *L. alba* se presentó muy poca actividad, ya que únicamente *S. aureus* fue inhibida.
- 10.3 *L. dulcis* (hoja) en la fase de tamizaje presentó actividad contra la mayoría (5/6) de las bacterias en estudio y en el caso de los hongos únicamente para *C. albicans* y *M. gypseum*.
- 10.4 Los aceites esenciales obtenidos de las hojas de las tres especies en estudio presentaron potente acción inhibitoria contra las bacterias y hongos.
- 10.5 El diclorometano y el etanol al 80% fueron los mejores disolventes que extrajeron el principio antibacteriano y antimicótico de *L. graveolens*.
- 10.6 Se confirma la actividad de las tres especies contra *S. aureus* y *S. pyogenes*.
- 10.7 *L. graveolens* fue la que presentó mejor actividad antimicrobiana y antimicótica respecto a las otras especies en estudio en las tres fases empleadas.

11 RECOMENDACIONES

- 11.1 Continuar el estudio para demostrar el espectro de inhibición de *L. graveolens*, empleando varias cepas de diferentes bacterias.
- 11.2 Iniciar los estudios fitoquímicos tendientes a la elucidación estructural del principio activo responsable de la actividad antimicrobiana.
- 11.3 Determinar la toxicidad aguda, subcrónica y crónica de estas especies del género *Lippia* para poder propiciar su uso.
- 11.4 Informar a la población sobre los resultados del estudio, haciendo ver la importancia que representa el uso de estas plantas medicinales en el tratamiento de una variedad de procesos infecciosos.



12 REFERENCIAS

1. Villatoro EM. Etnomedicina en Guatemala. Guatemala: Centro de Estudios Folklóricos, Universidad de San Carlos, 1984. 316p.
2. Martínez C. Las Ciencias Médicas en Guatemala; Origen y Evolución. 3 ed. Guatemala: Editorial Universitaria, 1964. 428p.
3. Naranjo P. Medicina Indígena y Popular de América Latina y Medicina Contemporánea. Guatemala Indígena. Guatemala: Instituto Indigenista Nacional, Vol. XIII, 1978. 617p.
4. Holland WR. Medicina Maya en los Altos de Chiapas. México: Instituto Indigenista Nacional, 1968. 318p.
5. Von Hagen VW. El Mundo de los Mayas. 4 ed. Bracamonte M. trad. México: Diana, 1960. 270p.
6. Salazar RA. Historia del Desarrollo Intelectual de Guatemala: Ministerio de Educación Pública. Vols. 11, 12. 1897.
7. Ximénez F. Historia Natural del Reino de Guatemala. Guatemala: Editorial José de Pineda Ibarra, 1967. 351p.
8. Hugo WB. Pharmaceutical Microbiology. London: Balckwell Scientific Publications, 1981.
9. Mitscher A et al. A. Modern book at folkloric use of antiinfective agents. J. Nat Prod. 1987; 50:1025-1040.
10. Macrae WD, Hudson Jb, Towers GHN, Studies on the pharmacological, activity of Amazonian Euphorbiaceae, J. Ethnopharmacol 1988; 22:143-172.
11. Rios JL, Recio MC, Villar A, Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A.Review of the literature. J. Ethnopharmacol. 1988; 23:126-149.
12. Goncalves De Lima O. et al. Substancias Antimicrobianas de plantas superiores. Comunicao XLVI. Primeras Observaciones sobre los efectos biológicos de extractos de corteza y raíz de Balché, Revista del Instituto de Antibióticos, Ministerio de Educación y Cultura, Brasil. 1971; 11:15-20.
13. Villacorta JLA. Historia de la Medicina, Cirugía y Obstetricia Prehispánicas. Guatemala, 1976.
14. Batres Jaúregui A. La América Central ante la Historia, Guatemala: Casa Colorada, Marroquín Hnos. Ed; 1916. 360p.

15. Cáceres A, Sapper D. Estudios sobre medicina tradicional en Guatemala, Guatemala: Centro de Estudios Mesoamericanos sobre Tecnología Apropriada CEMAT, 1977.
16. Cáceres A et al. Screening of antimicrobial activity of plants populary used in Guatemala for the tretment of dermatomucosal diseases. J. Ethnopharmacol. 1987; 20:223-237.
17. Cáceres A et al. Plantas used in Guatemala for the treatmente of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. J. Ethnopharmacol. 1990; 30:55-73.
18. Cáceres A et al. Actividad antimicótica de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de dermatofitos. Rev. Mex. Mic. 1991; 7:21-38.
19. Cáceres A et al. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. Screening of 68 plants against Gram positive bacteria. J. Ethnopharmacol. 1991; 31:193-208.
20. Cáceres A et al. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. IV Congresop Nacional de Microbiología. Guatemala: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 1991. 1-6p.
21. Ronquillo Fa. et al. Especies vegetales de uso actual y potencial en alimentación y medicina de las zona semiáridas del Nor-oriente de Guatemala. Dirección General de Investigación. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, 1988. 249p.
22. Standley P. Flora de Yucatán. Fieldiana: Botany. 1930; 3:492p.
23. Centro de Estudios Mesoamericanos sobre Tecnología Apropriada CEMAT, Laboratorio y Droguería de Productos Farmaceúticos FARMAYA. Fichas populares sobre plantas medicinales. 2 ed. Serie 2. N° 2. 1992. 180p.
24. Cáceres A, Samayoa B, Fletes L, Actividad antimicrobiana de plantas usadas en el tratamiento de infecciones comunes. 137p.
25. Ippisch F. Contribución a las investigaciones sobre plantas medicinales y económicas de Guatemala. Dirección General de Agricultura en Guatemala. 1943; 150p.
26. Alvarado SR. Confirmación de la actividad antimicrobiana de algunos extractos vegetales. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1986. 42p.

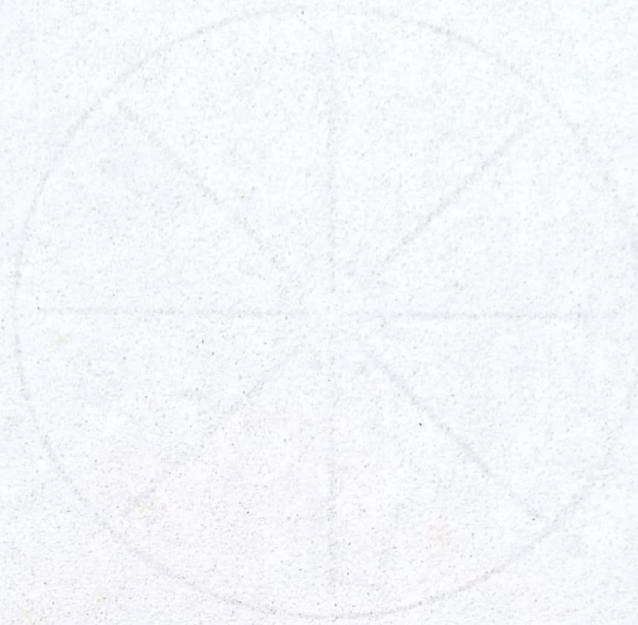
27. Fernández HR. Etnobotánica de los recursos fitogenéticos de uso medicinal presente en ocho municipios del área de influencia étnica Mam del departamento de Huehuetenango. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Agronomía) 1992. 275p.
28. Morton JF. Atlas of medicinal plants of middle America. Illinois: Charles Thomas Publishers, 1981. XXVIII 1420p.
29. Escobar DM. Recopilación botánica y análisis químico cualitativo de algunas plantas consideradas medicinales en Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1979. 79p.
30. Compadre CM, Robbins EF, Kinghorn AD. The intensely sweet herb, *Lippia dulcis* Trev: Historical uses, field inquiries, and constituents. J. Ethnopharmacol. 1986; 15:89-106.
31. Aguilar LR et al. Acción antibacteriana de extractos vegetales usados en el tratamiento popular de desórdenes gastrointestinales. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Trabajo de investigación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1987. 56p.
32. Alvarado A et al. Acción antibacteriana de extractos vegetales usados en el tratamiento popular de diarreas. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Trabajo de investigación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1986. 46p.
33. Pompa G. Medicamentos indígenas. 46 ed. Madrid: Editorial Americana, 1979. 340p.
34. Martíne M. Las plantas medicinales de México. 5a. ed. México: Ed. Botas, 1969. 656p.
35. OMS-UNICEF. Rehidratación oral. Informe. 1983. 11p.
36. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Manual de Microbiología Médica. 9 ed. México: El Manual Moderno, S. A; 1981. 595p.
37. Rytal MW, Mogabgab WJ. Manual de Enfermedades Infecciosas. México: Interamericana, S. A; 1986. 546p.
38. Carpenter PL. Microbiología. 4 ed. Blengio JR, Espinosa R, Folch A, Trad. México: Interamericana, 1982. XIII+518p.
39. Lennette WR et al. Manual of clinical microbiology. 4a. ed. USA: American Society for Microbiology, 1986. 1149p.
40. Finegold SM, Baron EJ, Bailey and Scotts Microbiology. 7 ed. Estados Unidos: The C. V. Mosby Company, 1986. XVII+914p.

41. Alvarez AV. Inhibición de *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* por extractos vegetales usados en el tratamiento de afecciones respiratorias. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1987. 47p.
42. Arroyo GL. Infección de orofaringe por estreptococo grupo A en la ciudad de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1978. 56p.
43. Joklik EK, Willet HP, Amos DB, eds. Zinsser Microbiología. 17a. ed. México: Editorial Panamericana, 1983. 831p.
44. Weistein L, Le Frock J. Does antimicrobial therapy of Streptococcal pharyngitis or pyoderma alter of glomerulonephritis J. Infect Dis. 1971; 124:299-231.
45. Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J. Infect Dis. 1987; 155 (3):377-387.
46. Prado V. Resistencia de bacterias enteropatógenas a antimicrobianos de uso habitual. Rev. Chil Pediatr; 55 (5): 308-302.
47. Cano JO. Suceptibilidad bacteriana in vitro a extractos vegetales utilizados popularmente en el tratamiento de infecciones gastrointestinales. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Médicas) 1985. 46p.
48. Dubelcco D, Ginsberg E. Tratado de Microbiología. 2 ed. México: Salvat S. A.; 1983. 1559p.
49. Rippon JW. Medicinal mycology; pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 2a. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co. 1982. 842p.
50. Logeman H, Herias M, Quevedo JC. Manual de laboratorio de Enfermedades Infecciosas IV. Guatemala: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Esc. de Química Biológica. Depto. de Microbiología, Universidad de San Carlos de Guatemala, 1991. 53p.
51. Dabroy LP. Confirmación de la actividad antibacteriana de algunas especies del género *Lippia* contra bacterias que causan infección respiratoria. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1994. 49p.



ANEXOS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

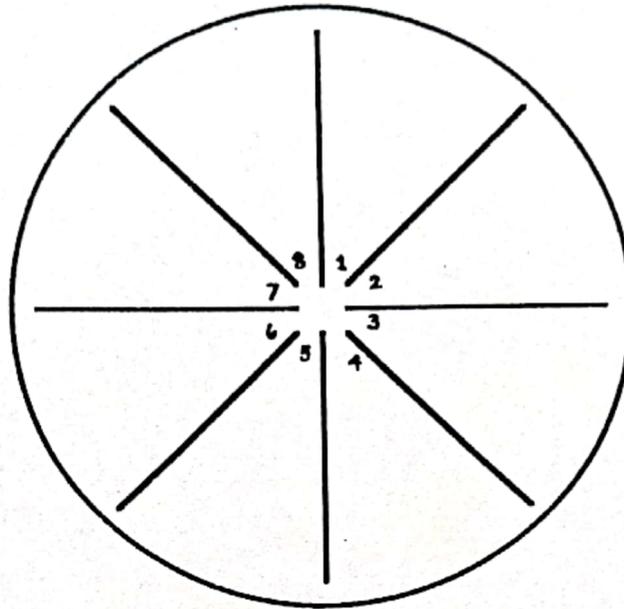


ANEXOS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

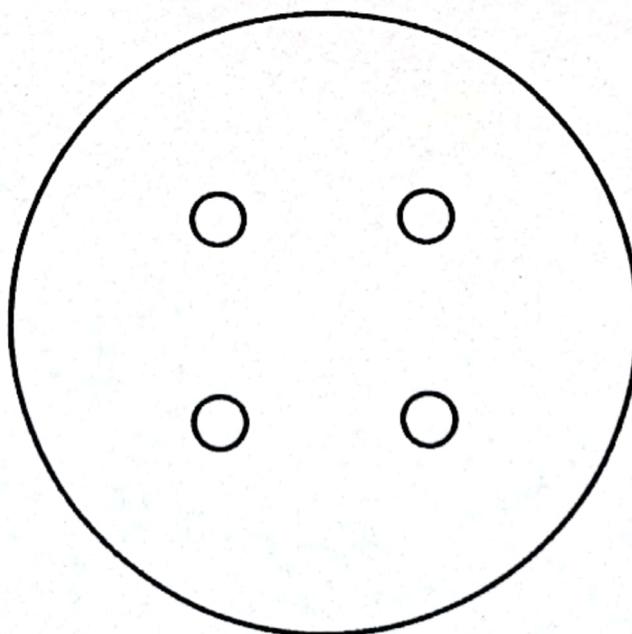


PLANTILLA PATRON PARA BACTERIAS



PATRON DE OCHO PARTES

PLANTILLA PATRON PARA HONGOS





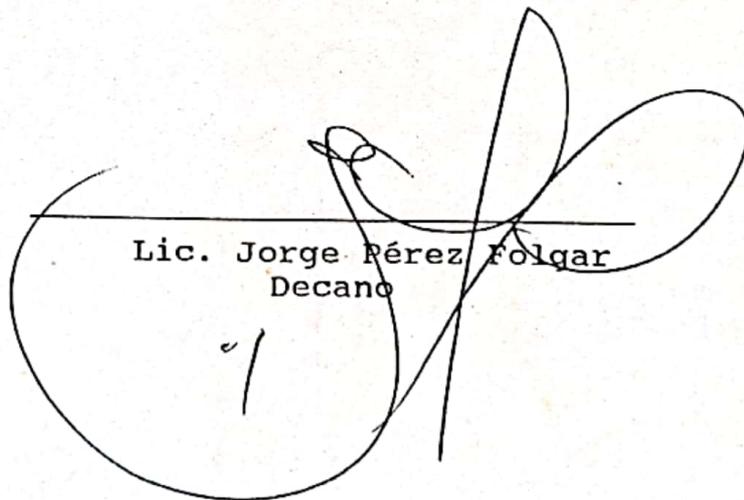
Julia Cristina Mendoza Cruz
Tesisista



Lic. Armando Cáceres E.
Asesor



Lic. Gerardo Arroyo Catalán
Director



Lic. Jorge Pérez Folgar
Decano

