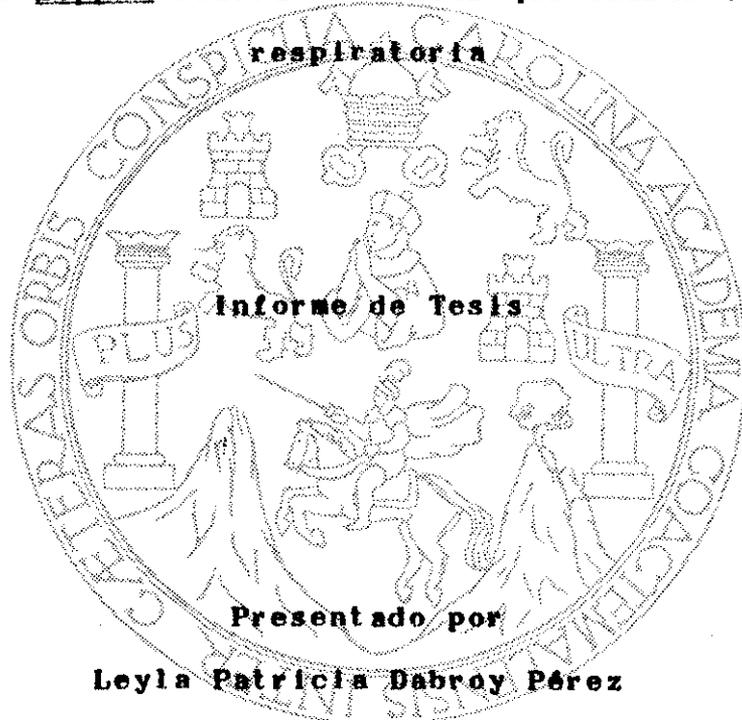


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Confirmación de la actividad antibacteriana de algunas especies
del Género Lippia contra bacterias que causan infección

respiratoria



Informe de Tesis

Presentado por

Leyla Patricia Dabroy Pérez

Para optar al título de

Químico Biólogo

Guatemala, marzo de 1994.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

DL
02
T(1473)

**JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

DECANA	LICDA. CLEMENCIA DEL PILAR GÁLVEZ DE ÁVILA
SECRETARIO	LIC. JOSÉ FRANCISCO MOTERROSO SALINAS
VOCAL I	LIC. JORGE RODOLFO PÉREZ FOLGAR
VOCAL II	LICDA. THELMA ESPERANZA ALVARADO DE GALLARDO
VOCAL III	LIC. MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME
VOCAL IV	BR. JORGE LUIS GALINDO ARÉVALO
VOCAL V	BR. EDGAR ANTONIO GARCÍA DEL POZO

ACTO QUE DEDICO

A DIOS

Por ser El guardián que cuida mi entrada y salida.
Salmo 121

A LA VIRGEN

Por acompañarme siempre.

A MI MADRE

Marta Florencia Pérez Monzón
Por su amor, comprensión y apoyo en todo.

A MI PADRE

Carlos Dabroy
Descanso eterno

A MI HERMANA

Carmen Aracely Godoy de Caal
Por su cariño y apoyo.

A MIS ABUELITAS

Emilia Monzón de Pérez
Eufemia Dabroy de Herrera
Gabina Dabroy de Woltke
Con cariño

A

Byron Arrivillaga Mendéz
Por su amor, comprensión y apoyo.

A MI FAMILIA

En general con cariño

A MIS AMIGOS

Por todos los momentos bellos que hemos pasado.
Especialmente a Varinia Barillas de Letona y
Familia Duarte Zelada

A MIS PADRINOS

Dr. Raúl Armas Borja
Licda. Maritza Alvarado Pérez

INDICE

	PAG.
1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Antecedentes	5
3.1 Generalidades de Infecciones respiratorias	5
3.2 Enfermedades respiratorias más comunes	7
3.3 Agentes causales de infecciones respiratorias	8
3.4 Uso popular de plantas medicinales en el tratamiento de infecciones respiratorias	11
4. Justificación	19
5. Objetivos	21
6. Hipótesis	22
7. Material y métodos	23
7.1 Universo de trabajo	23
7.2 Muestra	23
7.3 Recursos	23
7.4 Procedimiento	26
8. Resultados	29
9. Discusión de resultados	30
10. Conclusiones	32
11. Recomendaciones	33
12. Bibliografía	34
13. Anexos	41

1. RESUMEN

El presente estudio constituye una investigación sobre el uso de plantas medicinales del género Lippia específicamente contra gérmenes causantes de infección respiratoria.

Fueron utilizadas cinco plantas: L. alba, L. dulcis, L. citriodora, L. graveolens, L. substrigosa; contra las cepas de S. aureus ATCC 25923, S. pneumoniae ATCC 701402, S. pyogenes INCAP y H. influenzae INCAP 448.

Las plantas se recolectaron en los departamentos de Alta Verapaz, San Marcos, Santa Rosa, Guatemala y Zacapa.

La metodología fue la siguiente: se recolectaron las plantas, se herborizaron, clasificaron, se secaron para luego pulverizarlas y se procedió a realizar las diferentes tinturas de cada planta, esto se hizo con alcohol etílico al 50% según la técnica de Mitscher. Se procedió agregar al Agar Møller Hinton 1.2 ml de cada tintura en las cajas de petri, después se incubaron a 36°C por 24 horas, luego se refrigeraron para almacenarlas listas para inocularlas por partes (Anexo 1), después de inocularlas se incubaron a 36°C. por 24 horas y al final de las cuales se leyeron y se tabularon los resultados.

Las plantas que demostraron efectividad antimicrobiana fueron: L. alba, L. graveolens.

La L. alba presentó actividad contra S. aureus a 100 ug/ul. Pero para la concentración mínima inhibitoria (CIM), a 75 ug/ul no presentó actividad.

La L. graveolens tuvo actividad positiva contra S. pyogenes y S. pneumoniae en el tamizaje (100 ug/ul). Luego se probó la CIM con 75 ug/ul dando positivo L. graveolens para S. Pyogenes y S. pneumoniae y para 50 ug/ul solo dio positivo par S. pneumoniae.

En las demás plantas no se observó actividad.

2. INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias al igual que las gastrointestinales son la causa más importante de morbilidad y mortalidad en la infancia y la niñez. Además el ausentismo en las escuelas primarias por períodos agudos de infección respiratoria es de un alto porcentaje. Los factores predisponentes a las infecciones respiratorias son múltiples, tales como nutrición, educación de los padres y factores socioeconómicos. Las afecciones más comunes son: catarro, otitis media, adenitis cervical, laringitis, bronquitis, neumonía, sinusitis, amigdalitis, crup. Todas estas enfermedades son principalmente de origen viral pero en pacientes debilitados tienden a complicarse con infecciones bacterianas.

El género Lippia está constituido por trece especies distribuidas en todos los departamentos de Guatemala, y gracias al clima la adquisición de las plantas es fácil.

Todas las especies del género Lippia se caracterizan por poseer un olor dulce y fuerte.

Este estudio pretende demostrar la actividad antimicrobiana de algunas plantas del género Lippia para el tratamiento de afecciones respiratorias. Para esto se utilizarán cinco especies del género Lippia (L. alba, L. dulcis, L. citriodora,

L. graveolens, L. substrigosa) contra cuatro bacterias que causan infección respiratoria (Haemophilus influenzae, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae y Streptococcus pyogenes).

Para la evaluación antimicrobiana de las plantas se utilizará un método de dilución en agar propuesto por Mitscher. Se analizarán los resultados por un método no paramétrico al azar (1).

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades de infecciones respiratorias

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) son, junto a las diarreas, las causas más frecuentes de enfermedad, muerte y ausentismo escolar, siendo además motivo de pérdida de tiempo de trabajo en la edad adulta y defunción en edades avanzadas. Por su localización, se pueden clasificar en infecciones altas y bajas; las primeras son muy frecuentes y, por lo general, de origen viral; y las segundas, menos frecuentes, son de etiología viral, bacteriana o el resultado de complicación bacteriana de un proceso inicial causado por virus (2).

Los factores de riesgo para IRA, que al interactuar con el hospedero aumenta la probabilidad de que se desarrolle la enfermedad son: pertenecer al grupo menor de 5 años y especialmente menor de 1 año, carecer de lactancia materna, padecer desnutrición, analfabetismo de los padres, hacinamiento, pobreza, factores ambientales irritantes de las vías respiratorias e infecciones concomitantes (2).

Los signos y síntomas encontrados en el examen médico y los factores de riesgo asociados son los que orientan el manejo de los pacientes (2).

El laboratorio es más importante para el diagnóstico de las complicaciones y algunos síndromes clínicos específicos de mayor riesgo (2).

Como los cultivos requieren bastante tiempo, y por lo tanto demoran el diagnóstico, se han elaborado varios métodos que permiten realizar un diagnóstico en las seis horas que siguen a la obtención de la muestra (2).

En microbiología clínica el tiempo requerido para el diagnóstico es vital para administrarle al paciente la terapia adecuada, por tal razón se ha incrementado el interés en desarrollar nuevas técnicas para la identificación directa de algunos microorganismos y para esto han sido utilizados los avances tecnológicos como el uso de anticuerpos monoclonales y sondas de ADN, lo cual incrementa la capacidad de las pruebas directas (3).

En la actualidad existen diferentes pruebas comerciales que se valen de algunas reacciones utilizadas en hospitales y laboratorios clínicos entre las cuales tenemos: anticuerpos fluorescentes (AF), aglutinación en látex (AN), inmunoabsorción enzimática (EIA) y sondas de ADN (3).

El tratamiento de elección para las infecciones respiratorias lo constituyen los analgésicos, gotas nasales, antipiréticos, descongestionantes y principalmente los antibióticos que son administrados basándose en el conocimiento del médico, pero el uso de antibióticos es restringido por los efectos secundarios principalmente en niños menores de doce años (4-5).

3.2 Enfermedades respiratorias más comunes

3.2.1 Amigdalofaringitis aguda

La amigdalofaringitis se caracteriza por fiebre, dolor de garganta, enrojecimiento, edema de amígdalas, faringe y presencia de un exudado o una membrana. Puede haber un grado variable de hipertrofia de ganglios linfáticos cervicales, la causa más común es la infección por estreptococo Beta - hemolítico del grupo A de Lancefield. El tratamiento de elección en el caso mencionado es la penicilina (6).

3.2.2 Traqueítis bacteriana

Es una infección bacteriana aguda de las vías respiratorias, no afecta a la epiglotis pero puede dar lugar a una destrucción de las vías aéreas. El patógeno más frecuentemente aislado en estos casos es S. aureus. La mayoría de los pacientes son menores de trece años de edad, aunque ocasionalmente pueden enfermar niños mayores. La traqueítis bacteriana a menudo se produce después de una infección respiratoria viral (6).

3.2.3 Neumonía bacteriana

En los tres últimos decenios la frecuencia de neumonías por S. pneumoniae y S. pyogenes disminuyó notablemente, debido al amplio uso de antimicrobianos. H. influenzae no capsulado es el causante principal de neumonías en niños enfermos o convalecientes. En los demás pacientes el agente etiológico por excelencia de neumonía es S. aureus (6,7).

El antimicrobiano de elección en el caso de neumonía estafilocócica es ampicilina. La penicilina es usada en neumonías causadas por H. influenzae (8).

3.3 Agentes causales de infecciones respiratorias

3.3.1 Haemophilus influenzae

Son bacilos pleomórficos, Gram negativo, no esporulados, aerobios facultativos, inmóviles, fermentadores. Son difíciles de cultivar, pues necesitan factores particulares de crecimiento. Algunas especies requieren el factor X o hemina (una protoporfirina derivada de la hemoglobina), otras requieren el factor V o nicotinamida-adenin-dinucleótido (NAD) (denominada también coenzima I), otras requieren ambos factores (6).

Es probable que en los pacientes con bronquitis crónica las variedades no capsuladas de H. influenzae se relacionan con el esputo purulento que desaparece mediante terapia con antibióticos (7,8,10).

La epiglottitis aguda, producida casi siempre por H. influenzae tipo b, es una enfermedad respiratoria muy benigna, que raramente se transforma en obstrucción respiratoria con peligro de muerte; el único signo clínico indicador es la existencia de una gran epiglottis roja y distorsionada (11,12).

3.3.2 Staphylococcus aureus

Los estafilococos son cocos, Gram positivo, generalmente agrupadas en racimos irregulares, fermentan muchos carbohidratos y producen pigmentos que van desde el blanco al amarillo intenso. Generalmente son hemolíticos y coagulan el plasma. Algunos son parte de la microbiota de la piel y mucosas del humano, en tanto que otros provocan supuraciones, formación de abscesos, diversas infecciones piógenas y septicemias mortales (13).

S. aureus es un patógeno de gran importancia y es la especie que se encuentra con mayor frecuencia en las muestras clínicas. El hombre es portador de esta especie en cantidades relativamente grandes; en la nariz estos microorganismos representan un vehículo de difusión importante, si bien ésta se produce sobre todo a través de las manos, por cuanto los portadores nasales son también frecuentemente portadores cutáneos (14).

3.3.3 Streptococcus pyogenes

Son cocos Gram positivo, agrupados en cadenas, no esporulados, aerobios facultativos, casi siempre inmóviles. La clasificación de los estreptococos basada en sus características fisiológicas y bioquímicas no resultaba del todo satisfactoria; La bacterióloga R.C. Lancefield descubrió que los estreptococos patógenos pueden ser divididos en varios grupos serológicos en base a un antígeno específico contenido en su pared celular. Los grupos serológicos se designan con letras de la A a la U (excepto I y J). El grupo A fue considerado alguna vez como el único de importancia médica (15).

El S. pyogenes puede ocasionar faringitis estreptocócica aguda y todas las complicaciones supurativas incluyendo la adenitis cervical, la otitis media, la mastoiditis, los abscesos peritonsilares, la meningitis, la peritonitis y la neumonía. El tratamiento de elección es: la penicilina por un tiempo prolongado, eritromicina y algunas sulfas (15, 17, 18).

3.3.4 Streptococcus pneumoniae

No pertenece a ningún grupo de Lancefield, es alfa hemolítico y está clasificado como especie única en los grupos de los neumococos. Está caracterizado por agrupaciones de células bacterianas en pares. Estas se presentan en forma oval y con la

extremidad distal de cada par en puntas. Puede ser aislado de la faringe en el 30-70% de las personas en las condiciones aparentemente normales. Representa la especie aislada con mayor frecuencia (alrededor del 90%) de pacientes adultos con neumonía bacteriana. La sintomatología está representada por fiebre, dolor torácico, disnea, tos y expectoración hemática. La infección puede involucrar la pleura, provocando a veces pleuresía y también empiema. Además de la neumonía lobar, el S. pneumoniae puede producir también sinusitis, parotiditis, conjuntivitis, meningitis, otitis, pericarditis, endocarditis, peritonitis, artritis y septicemia (18 - 21).

3.4 Uso popular de plantas medicinales en el tratamiento de infecciones respiratorias

En nuestro país las plantas se han usado con fines medicinales desde tiempos inmemoriales; hasta la fecha existe un 90% de personas que en alguna ocasión han recurrido a las plantas antes que a otros medicamentos, debido a que de generación en generación se ha pasado la importancia que poseen las plantas para curar algunas enfermedades de: la piel, el riñón, el tracto gastrointestinal y el tracto respiratorio (22-29).

En la actualidad se han estudiado más de 68 plantas medicinales en el tratamiento de infecciones respiratorias, siendo las siguientes las que presentaron mayor actividad antimicrobiana: Physalis philadelphica demostró actividad contra S. aureus, S. pneumoniae y S. pyogenes. Gnaphalium stramineum demostró actividad contra S. aureus; Gnaphalium viscosum demostró actividad contra S. pneumoniae y S. pyogenes. L. alba demostró actividad contra S. aureus y S. pneumoniae. L. dulcis contra S. pneumoniae, etc. (29).

3.4.1 Características del género Lippia

El género Lippia, pertenece a la familia Verbenaceae y en Guatemala únicamente se conocen trece especies; (L. alba, L. betulaeifolia, L. cardiostegia, L. chiapasensis, L. controversa, L. dulcis, L. graveolens, L. myriocephala, L. nodiflora, L. reptans, L. salamensis, L. stoechadifolia, L. substrigosa) crecen en lugares secos, húmedos, en laderas y a lo largo de caminos. Este género se caracteriza por tener hojas peludas, pequeñas o grandes dependiendo de la especie, dentadas en las orillas, cáliz pequeño, membranoso y todas las especies poseen un aroma peculiar (30).

Las Lippias en América son usadas por un alto porcentaje de los habitantes para el tratamiento de infecciones respiratorias

tales como: bronquitis, influenza, sinusitis, neumonía, tuberculosis, asma, laringitis, pleuresía. También es usada en enfermedades de la piel y enfermedades venéreas y se le atribuyen propiedades sedativas y sudorativas. Se utilizan en casos de náusea, diarrea, y fiebre (30).

3.4.2 Lippia alba Mill

Esta planta es abundante en Guatemala, conocida popularmente como salvia sija, crece principalmente en los departamentos de Guatemala, Sacatepéquez, Chimaltenango, Quetzaltenango, Sololá, Chiquimula, Escuintla y Alta Verapaz (31, 32).

Es un arbusto aromático, de 1.5 - 2 m de altura, ramas largas, cayentes, hojas opuestas ovaladas, de 2 - 8 mm de largo, de 0.9 - 2 cm de ancho, arrugadas, finalmente festonadas, cubiertas con pelillos muy finos y cortos en ambas superficies; venas prominentes en la cara externa. Las flores son de color lila o blanco, tubulares, de 4 - 5 mm de largo, cabezas florales redondas u oblongadas, 8 - 12 mm de largo, generalmente en pares en pequeños tallos de 1.5 cm de largo en las hojas axilares (30, 31, 33).

La cocción de hojas y flores se usa para tratar afecciones hepáticas, de la piel, mucosas, inflamaciones de la boca,

insomnio, flujo vaginal e hipertensión. Es usado en el tratamiento de infecciones respiratorias como: resfríos, catarros, laringitis, neumonía, y asma (31 - 34).

También es utilizado en enfermedades de transmisión sexual y enfermedades hepáticas. Se le atribuyen propiedades febrífugas, sudoríficas y antiespasmódicas (31 - 34).

Estudios realizados en Guatemala demuestran que la maceración etanólica de las hojas no inhibe el crecimiento in vitro de microorganismos causales de infección de la piel y mucosas como Cándida albicans, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa; el extracto etanólico de las hojas inhibe el crecimiento de algunas bacterias causales de infección respiratoria como S. aureus y S. pyogenes (17, 35, 36).

Las hojas de L. alba contienen sustancias identificadas como: d-limoneno, lippiona, d-l-piperitona y una cetona saturada, d-alfa-pineno, dihidrocarvona, pequeñas cantidades de citral y alcanfor (37-41).

3.4.3 Lippia citriodora HBK

Esta planta es nativa de Argentina, Chile y Uruguay. Crece en jardines a temperaturas bajas o en regiones subtropicales como América Latina, Oeste de la India y es cultivada comercialmente

en el Mediterráneo, Europa y Africa. Es conocida con el nombre de Aloysia triphylla o L. citriodora, y sus sinónimos son cedrón, cidrón, citronela, hierba luisa, limón verbena y yerba luisa como es conocida en Guatemala (37).

Es un arbusto pequeño que mide de 1 - 3 m de largo, con hojas estrechas, lanceoladas de 10 cm de longitud, ordenadas con circunvalaciones opuestas, venas horizontales con puntos de glándulas de aceite en el envés, muy aromática. Flores tubulares y pequeñas, blancas o morado pálido. Las propiedades que se le atribuyen son: sedativas, antiespasmódicas, antiasmáticas y antidiarreicas (42).

La L. citriodora está constituida de ácidos fenólicos, flavonoides, taninos hidrolizables, flavonas, alcaloides, ésteres y un aldehído denominado citral (43).

3.4.4 Lippia dulcis Trev

Comúnmente conocida como orozuz, crece en los departamentos de Alta Verapaz, Chiquimula, Guatemala, El Péten, Retalhuleu, Sacatepéquez, Santa Rosa y Sololá (23, 44, 45).

Es una hierba perenne leñosa en la base, fuertemente aromática, erecta, hasta 60 cm de alto, hojas opuestas, en tallos de 0.5 - 1.5 cm de largo, ovaladas u oblongas-ovaladas, 1 - 6 cm

de largo, finamente dentadas, rugosas en la superficie superior, peludas en la parte inferior, dulce al masticarlas. Flores blancas pequeñas en cabezas densas, redondas ovoides alargadas, hasta 3 cm de largo y 6 mm de ancho (23, 44, 45).

Se le atribuyen propiedades diuréticas, estimulantes, sedativas y como expectorante. También es utilizada en infecciones gastrointestinales, renales y respiratorias como resfriados, catarro común, bronquitis y asma (31, 35, 36, 46).

La L. dulcis contiene alcaloides, ácidos orgánicos, hidrocarburos alifáticos, azúcares, ésteres y aceite esencial. Por destilación acuosa de las hojas se obtiene 0.8% de aceite neutro y dulzón, constituido por lippiol, monoterpenos, como alcanfor, camfeno, mirceno, limoneno alfa y alfa pineno, terpineno, linalool, borneol y alfa terpineol; y sesquiterpenos como 6-metil-5-hepten-2-ona, 1-copaeno, coriofileno, gamma cadineno y otros de estructura no conocida (31).

3.4.5 Lippia graveolens HBK

Esta planta crece en los departamentos de Zacapa y El Petén. No se debe confundir con el orégano europeo, que es una hierba pequeña (Origanum vulgare) que suele cultivarse en las huertas. Nuestros oréganos son arbustos silvestres de hojas aromáticas,

muy empleados como condimento. Sinónimos: Orégano de cerro, Xaal'-chê (en lengua maya), L. berlandieri, L. palmeri, L. geminata, L. graveolens (24, 44).

Es un arbusto de 2 m con una forma de crecimiento abierta, hojas pequeñas de 3 cm., las flores son blancas, en espigas de 4 cm., toda la planta tiene un olor agradable (45).

Popularmente es usada para asma, bronquitis, influenza, laringitis, pleuresía, tuberculosis, enfermedades de la piel. También se le atribuyen propiedades anestésicas, tranquilizantes, antipalúdicas y diuréticas (34, 44).

Dos compuestos fueron aislados de la raíz, siendo estos catalponol y tectol dimetil éster (46).

3.4.6 Lippia subatrigosa Turcz

En Guatemala crece en los departamentos de Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Quezaltenango, El Quiché, Sacatepéquez, San Marcos y Santa Rosa (34).

Sus nombres comunes son: Chichicaste de venado, Salvia Santa, Supup (34).

Es un arbusto de 2 - 3 m de altura, posee hojas grandes, dentadas, peludas y flores blancas - amarillas como pequeñas rosas, el tallo es leñoso (34).

Esta planta se ha utilizado para resfríos, catarros, laringitis, bronquitis, enfermedades gastrointestinales, cólicos, etc. (34).

Su composición química se desconoce.

4. Justificación

Las infecciones respiratorias son una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad infantil en Guatemala. Además es causa importante de ausentismo en las escuelas y trabajos, ya sea por catarro, laringitis, faringitis o casos más graves como bronquitis, neumonía, etc. Los factores predisponentes a las infecciones respiratorias son múltiples como: hacinamiento, educación, factores socioeconómicos, factores ambientales, etc..

Todas estas características sugieren que la población vulnerable está compuesta por un grupo de niños pequeños, de escasos recursos económicos, lo que hace difícil la adquisición de medicamentos por el alto costo de los mismos (47).

Por lo antes expuesto es necesario contribuir a que se reduzca la mortalidad infantil en Guatemala, y ayudar a disminuir el ausentismo escolar.

El Género Lippia en nuestro medio tiene una gran importancia, pues es de fácil adquisición y desde nuestros antepasados se conocen las maravillas de dicho género para combatir afecciones respiratorias como: catarros, bronquitis, tuberculosis, asma, espasmo bronquial y también son usadas en

afecciones gastrointestinales. Es por eso que debe probarse científicamente su acción contra las bacterias que provocan dichas enfermedades.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Investigar la actividad antibacteriana de las plantas usadas como tratamiento popular en las afecciones respiratorias.

5.2 Objetivos específicos.

5.2.1 Establecer en Guatemala una metodología para determinar la actividad antibacteriana por dilución en agar.

5.2.2 Determinar la actividad antibacteriana de cinco especies del género Lippia (L. alba, L. citriodora, L. dulcis, L. graveolens y L. substrigosa), contra bacterias que causan infección respiratoria como H. influenzae, S. aureus, S. pneumoniae y S. pyogenes.

5.2.3 Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de las tinturas de las especies del género Lippia, que tengan actividad contra las cepas que causan infección respiratoria.

6. HIPÓTESIS

Cinco especies del género Lippia (L. alba, L. citriodora, L. dulcis, L. graveolens, L. substrigosa) tienen actividad antibacteriana contra bacterias que causan infección respiratoria.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Universo de trabajo

Constituido por las trece especies del género Lippia que se han reportado en Guatemala.

7.2 Muestra.

La conformará cinco especies del género Lippia (L. alba, L. citriodora, L. dulcis, L. graveolens, L. substrigosa) y cuatro bacterias que causan infección respiratoria (H. influenzae, INCAP 448; S. aureus, ATCC 25923; S. pneumoniae, INCAP 701402; S. pyogenes, INCAP).

7.3 Recursos

7.3.1 Recursos humanos

Autor: Leyla Patricia Dabroy Pérez.

Asesor: Lic. Armando Cáceres.

7.3.2 Recursos institucionales

Además de los aportes específicos, se usarán los siguientes recursos institucionales.

- Bio-Bacte (Sangre de carnero).
- Farmaya (Material y bibliografía).
- Jardín Botánico de la Universidad de San Carlos de Guatemala, departamento de Botánica (Clasificación de las plantas).

- Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Departamentos de Citohistología y Microbiología y servicio de Micología (Equipo, Instalaciones y Material).

7.3.3 Material necesario para la investigación.

Reactivos.

Caldo Tripticosa soya
Sangre desfibrinada de carnero
Aceite mineral
Agar Müeller Hinton
Agar stock
Etanol al 50%

Equipo.

Autoclave
Balanza analítica
Campana de flujo laminar
Incubadora
Refrigeradora

Material.

Pipetas calibradas

Papel filtro Whatman No.1

Probetas

Removedores

Tubos de 13*100 mm con rosca

Mechero

Mangueras delgadas

Cajas de Petri descartables

Corchos

Erlenmeyers

Frascos color ámbar de 30 ml

Jeringas descartables de 60 cc

Asa calibrada 0.001 ml para urocultivos

7.4 Procedimiento

7.4.1 Material vegetal

Se recolectó el material vegetal, herborizó, se determinó su especie, se secó y pulverizó (1).

7.4.2 Tamizaje de la actividad antimicrobiana

Se pesó exactamente 5 g del material vegetal pulverizado, se agregó a una jeringa descartable de 60 cc y colocándole en el orificio de salida de la aguja una manguera delgada, que se selló con un mechero para evitar la pérdida de la tintura. Fueron agregados 20 ml de etanol al 50% procurando humedecer todo el material vegetal, removiéndolo para asegurar que todo se humedeciera, luego se le colocó un corcho y se dejó reposar por 24 horas (1).

Al día siguiente se retiró el corcho y la manguera y se colocó el émbolo de la jeringa y se exprimió el primer extracto en un frasco obscuro, se volvió a sellar con la manguera, se agregaron 15 ml de etanol al 50%, removiéndose el material para asegurar que se humedezca todo, se tapó con un corcho y se dejó reposar por 24 horas (1).

Se obtuvo el segundo extracto del material vegetal, agregándole 10 ml de etanol al 50%, removiendo el material y se dejó reposar por 24 horas. El tercer y último extracto del material vegetal, se obtuvo mezclando las tres alícuotas, se filtró con papel Whatman # 1 y fueron almacenadas en frascos oscuros color ámbar, en un lugar fresco a temperatura de 25°C (1).

7.4.3 Preparación del medio con extracto

Se agregaron 9 ml de agar Müeller Hinton en un tubo de ensayo a los cuales se les adicionó 1 ml de extracto, se homogenizó, se agregó a cajas de Petri y dejó solidificar el medio. Después se incubó a 35°C por 24 horas, se examinaron, para verificar que estuvieran libres de contaminación para poder usarlas, se almacenaron en refrigeración hasta el momento de su uso (1).

7.4.4 Preparación de las cepas e inóculo

Se mantuvieron las cepas en agar Stock y las que no se podían mantener en dicho medio como H. influenzae, S. pneumoniae y S. pyogenes se trabajaron directamente o se guardaron en sangre de carnero pura o sangre de carnero achocolatada. Se aislaron las bacterias, identificaron, transfirieron a otro tubo de agar Stock para tener un cultivo de trabajo (1).

Se tomaron de cinco a diez colonias de cada una de las cepas y disolvieron en cinco mililitros de Tripticasa Soya, se incubaron a 35°C hasta obtener una longitud de onda en el espectrofotómetro igual a la del patrón 0.5 de MacFarland, para estandarizar la prueba (1).

Luego se inocularon en las cajas siguiendo el patrón de ocho partes (Fig. 1).

7.4.6 Interpretación de resultados

Al día siguiente de la incubación se observó el apareamiento de un crecimiento homogéneo en las zonas de inoculación.

Se anotaron los hallazgos así: Crecimiento Negativo (-), actividad positiva (+), crecimiento positivo (+), actividad negativa (-) (1).

7.4.6 Demostración de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Se hicieron diluciones a partir del extracto inicial 10 g/ml ó 10 ug/ul utilizado para el tamizaje (1, 0.1, 0.01, ug/ul) de la tintura con etanol al 50% y luego se agregaron a 9 ml de agar Mueller Hinton 1 ml de cada dilución, se incubó a 35°C las cajas por 24 horas, si no aparecía contaminación se refrigeraban las cajas hasta el momento de su uso (1).

7.4.7 Preparación del Inóculo

Se tomaron de cinco a diez colonias de cada una de las cepas y se disolvieron en cinco mililitros de caldo Tripticasa Soya, se incubaron a 35°C hasta obtener una longitud de onda en el espectrofotómetro igual a la del patrón 0.5 de MacFarland para estandarizar la prueba (1).

7.4.8 Interpretación de resultados

Crecimiento negativo (-), actividad positiva (+), crecimiento positivo (+), actividad negativa (-) (1).

8. RESULTADOS

En la primera parte del trabajo se realizó una prueba de tamizaje usando las tinturas con concentración de 100 ug/ul contra las bacterias en estudio. Obteniéndose actividad positiva para L. alba contra S. aureus y L. graveolens para las cepas de S. pneumoniae y S. pyogenes (anexo 3). Y actividad negativa para L. citriodora, L. dulcis y L. substrigosa.

En la segunda parte del estudio se probó la CMI obteniéndose actividad positiva para L. graveolens contra S. pyogenes a 75 ug/ul y para S. pneumoniae a 200 y 300 ug/ul (anexo 4).

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Debido a la existencia de grandes barreras socioeconómicas, culturales y lingüísticas que condicionan el acceso y aceptación de la medicina cosmopolita por parte de la población mayoritaria (indígena) de Guatemala, los resultados del presente estudio tienen como propósito contribuir al conocimiento y comprensión de las creencias de la medicina maya.

La hipótesis en este estudio no pudo ser probada ya que la misma decía que el 50% de las especies del género Lippia eran efectivas contra las bacterias causantes de infección respiratoria aguda.

Las plantas de la familia Lippia son frecuentemente utilizadas como remedios caseros pero al realizar el estudio se comprobó que con la metodología de Mitscher solo se obtuvo efectividad o acción antibacteriana para L. alba contra S. aureus y L. graveolens contra S. pneumoniae y S. pyogenes. Pero la L. citriodora, L. dulcis y L. substrigosa no presentaron ninguna acción antibacteriana.

En estudios anteriores se obtuvo resultados positivos para L. alba y L. dulcis contra S. aureus probablemente por el tipo de método utilizado para obtener las tinturas de las plantas, ya que en los mismos las tinturas fueron obtenidas por Soxhlet y se

impregnaron discos por el método de Bauer y Kirby a diferentes concentraciones. En el método Soxhlet se usan temperaturas altas para la extracción. A diferencia del método de Mitscher se obtiene un extracto de menor concentración, pero es la técnica más recomendable por ser más sencilla.

Por existir resultados anteriores positivos para L. alba contra S. aureus, se decidió impregnar discos con concentraciones de 100 y 75 ug/ul, obteniéndose resultados negativos. Lo cual nos indico que nuestros resultados eran correctos y la variación se debía a la forma de extraer los extractos pues en estudios anteriores se usó la técnica de Soxhlet y en este estudio se usó la de Mitscher.

10. CONCLUSIONES

Las plantas del género Lippia tienen actividad antimicrobiana contra bacterias gram positivo causantes de infección respiratoria.

La Lippia alba y la Lippia graveolens son útiles para aliviar las afecciones respiratorias.

L. alba y L. graveolens son plantas efectivas contra Staphylococcus aureus y Streptococcus pyogenes.

Es necesario utilizar pruebas in vivo para determinar la validez y reproducibilidad del método.

11. RECOMENDACIONES

Realizar pruebas de toxicidad para L. alba y L. graveolens.

Investigar efectos secundarios mediante pruebas farmacológicas.

Se recomienda el uso de L. alba y L. graveolens para aliviar las afecciones respiratorias.

Probar las especies del género Lippia contra otros gérmenes productores de infecciones en otros tractos u órganos.

Elucidar la molécula responsable en L. alba y L. graveolens de la actividad biológica y determinar la fracción ideal para el desarrollo de productos fitofarmacéuticos.

Continuar estudios como el presente para que en el futuro se puedan corroborar o desvirtuar las propiedades de las plantas a través de estudios experimentales in vivo.

12. Bibliografía

12.1 Mitscher LA, et al. A modern look at folkloric use of antiinfective agents. J Nat Prod 1987;50: 1025 - 1040.

12.2 Washington II J. p. 52 - 68. (In Pennington J. Respiratory Infections: Diagnosis and Management. 2ed. New York: Raven Press, 1988. 672p).

12.3 Buck GE. Nonculture methods for detection and identification of microorganisms in clinical specimens. Pediatr Clin Feb. 1989;36(1): 95 - 110.

12.4 Hall BC, McBride JT. p. 97 - 113. (In Pennington J. Respiratory Infections: Diagnosis and Management. 2ed. New York: Raven Press, 1988. 672p).

12.5 Steele RW. Kearns GL. Antimicrobial therapy for pediatric patients. Pediatr Clin Oct. 1989;36(5): 1321 - 1340.

12.6 Farr BM, Mandell GL, p. 298 - 310. (In Pennington J. Respiratory Infections: Diagnosis and Management. 2ed. New York: Raven Press, 1988. 672p).

12.7 Claesson A, Lagergard T, Trollfors B. Antibody response to outer membrana of noncapsulated Haemophilus influenzae isolated from the nasopharynx of children with pneumonia. J Pediatr Infect Dis 1991;10: 104 - 107.

12.8 Krugman S, et al. Enfermedades infecciosas. 8 ed. México: Interamericana, 1988. 641p. (p. 270 - 299).

- 12.9 Young V. *Haemophilus* p. 387 - 392. (In Lennette E, et al. Manual of Microbiology. Baltimore: American society for microbiology. 1985 XVI + 1,149p).
- 12.10 Smith AL, Pappas P, Florde J. *Haemophilus influenzae pneumonia*. p. 269 - 281. (In Pennington J. Respiratory Infections: Diagnosis and Management. 2ed. New York: Raven Press, 1988. 672p).
- 12.11 Finegold SM, et al. Microbiology. 7 ed. United States: the C.V. Mosby Company, 1986. XVII + 914p.
- 12.12 Carpenter PL. Microbiología. 4 ed. Blengio JR, Espinosa R, Folch A, Trad. México: Interamericana, 1982. XIII + 618p.
- 12.13 Jawetz E, Melnick JI, Adelberg EA. Microbiología Médica. 11 ed. México: El manual moderno, 1985.
- 12.14 Ivler D, Staphylococcus. p. 143 - 151. (In Lennette E, et al. Manual of Microbiology. Baltimore: American society for microbiology. 1985 XVI + 1,149p).
- 12.15 Pichichero ME, Margolis PA. A comparison of cephalosporins and penicillins in the treatment of Group A betha - hemolytic streptococcal pharyngitis: a meta - analysis supporting the concept of microbial copathogenicity. J Pediatr Infec Dis 1991;10: 275 - 281.

- 12.16 Belani K, et al. Association of exotoxin - producing Group A streptococci and severe disease in children. *J Pediatr Infect Dis* 1991;10: 351 - 354.
- 12.17 Bluestone CD. Modern Management of Otitis Media. *J Pediatr Clin Dec.* 1989;36(6): 1371 - 1419.
- 12.18 Moody M, Streptococcus. p. 154 - 172. (In Lennette E, et al. *Manual of Microbiology.* Baltimore: American society for microbiology. 1985 XVI + 1,149p).
- 12.19 Forgie IM, et al. Etiology of acute lower respiratory tract infections in Gambian children: I. Acute lower respiratory tract infections in infants presenting at the hospital. *J Pediatr Infect Dis* 1991;10: 33 - 41.
- 12.20 Forgie IM, et al. Etiology of acute lower respiratory tract infections in Gambian children: II. Acute lower respiratory tract infections in children ages one to nine years presenting at the hospital. *J Pediatr Infect Dis* 1991;10: 42 - 47.
- 12.21 Sunakorn P, et al. Epidemiology of respiratory infections in young children from Thailand. *J Pediatr Infect Dis* 1990;9: 873 - 877.
- 12.22 Cáceres A, Girón LM, Alvarado SR. Acción antimicrobiana de plantas de uso medicinal en Guatemala. *Memorias del III Congreso Nacional de Microbiología, 1986.* (p.89 - 96).

- 12.23 Cáceres A, Samayoa B, Fletes L. Actividad antimicrobiana de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de infecciones. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación Cuadernos de investigación. 100p.
- 12.24 Zolla C. Traditional medicine in Latin America, with particular reference to Mexico. J Ethnophar 1980;2: 37 - 41.
- 12.25 Marini - Bettolo GB. Present aspects of the use of plants in traditional medicine. J Ethnophar 1980;2: 5 - 7.
- 12.26 Cáceres A. et al. Screening of antimicrobial activity of plants popular and used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. J Ethnophar 1987;20: 223 - 237.
- 12.27 Cáceres A, Girón LM, Martínez AM. Diuretic activity of plants used for the treatment of urinary ailments in Guatemala. J Ethnophar 1987;19: 233 - 245.
- 12.28 Cáceres A, et al. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. I. Screening of 84 plants against enterobacteria. J Ethnophar 1990;30: 55 - 73.
- 12.29 Cáceres A, et al. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. I. Screening of 68 plants against Gram positive bacteria. J Ethnophar 1991;31: 193-208.
- 12.30 Standley PC, Williams LO. Flora of Guatemala. Fieldiana : Field Museum of natural history, 1970;24, part IX: No. 1 and 2.

12.31 Cáceres A, Samayoa B. Tamizaje de la actividad antimicrobiana de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de afecciones gastrointestinales. Universidad de San Carlos de Guatemala : Dirección General de Investigación. Doc. Tec. 1989; (6): 59 - 61.

12.32 Morton JF, Atlas of Medicinal Plants of Middle America. Bahamas: Thomas publisher. 1981;24, Part IX: 620 - 817.

12.33 Ocampo RA, Naffioli A. El uso de algunas plantas medicinales en Costa Rica, Costa Rica : Centroamérica. Doc. Tec. 1985;1: 50 - 51.

12.34 Stanley PC. Steyermark JA. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany, 1949 (p.1 - 439).

12.35 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). 1989. 47p.

12.36 Recinos MM. Confirmación de la actividad antimicrobiana de *Physalis philadelphia* contra bacterias causales de infección respiratoria. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1989. 59p.

- 12.37 Fester GA, et al. Essential oils from Argentine plants. Bol acad nacl cienc 1958;40: 189 - 208. (In Chem Abs 1960;54: 12496d).
- 12.38 Fester GA. Phytochemical varieties of aromatic Argentine plants. Rev Fac Ing Quim Univ Nacl Litoral, Santa Fe, Arg. 1962;31: 39 - 42. (In Chem Abs 1964;60: 11046g).
- 12.39 Fester GA, et al. Volatile oils of the Coastal and Andean regions of Argentine. Bol acad nacl cienc (Córdoba, Rep. Arg.). 1958;40: 189 - 208. (In Chem Abs 1958;53: 144231).
- 12.40 Fester GA, et al. Some volatile oils. VI. Rev Fac Ing Quim Univ Nacl Litoral, Santa Fe, Arg. 1954;23: 15 - 34. (In Chem Abs 1957;51: 6083h).
- 12.41 Fester GA, et al. Some volatile essential oils. VII. Rev Fac Ing Quim Univ Nacl Litoral, Santa Fe, Arg. 1955;24: 37 - 55. (In Chem Abs 1957;51: 7659g).
- 12.42 Martínez M. Plantas útiles de la flora mexicana. México: Andreas-Botas, 1959. (p. 440-441).
- 12.43 Torrent MT. Some pharmacognostic and pharmacodynamic aspects of Lippia citriodora H.B.K. Rev R Acad Farm Barcelona 1976;14: 39 - 55. (In Chem Abs 1977;86: 65437t).
- 12.44 House P, Logos - Witte S. Manual popular de 50 plantas medicinales de Honduras. Honduras: Centro América. 1989 (p. 86 - 87, 100 - 103).

12.45 Compadre C, Robbins EF, Kinghorn AD. The intensely sweet herb, Lippia Dulcis Trev: Historical uses, field inquiries, and constituents. J Ethnophar 1986;15: 89 - 106.

12.46 Martínez M. Las plantas medicinales de México. 5 ed. México: Andreas-Botas. 1969. (p. 166 - 167, 464 - 465, 504).

12.47 Kaplan JM, et al. Cost of antibiotic therapy for infants and children. J Pediatr Infect Dis 1990;9: 722 - 728.

13. ANEXOS

Anexo I

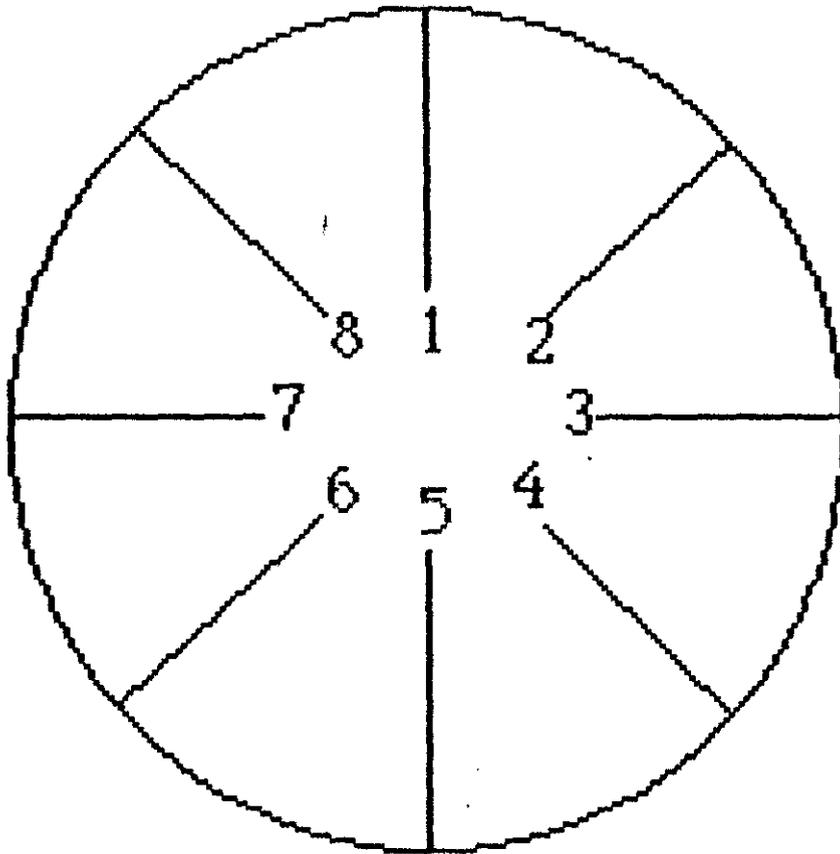


Fig. 1
Patrón de ocho partes

Anexo II

Planta	Departamento	Parte
<u>L. alba</u>	San Marcos	Hoja
<u>L. citriodora</u>	Guatemala	Hoja
<u>L. dulcis</u>	Santa Rosa	Hoja
<u>L. graveolens</u>	Zacapa	Hoja
<u>L. substrigosa</u>	Guatemala	Hoja

Anexo III .

Planta	Bacterias			
	<u>S. aureus</u>	<u>S. pneumoniae</u>	<u>S. pyogenes</u>	<u>H. influenzae</u>
<u>L. alba</u>	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.
<u>L. citriodora</u>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
<u>L. dulcis</u>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
<u>L. graveolens</u>	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.
<u>L. substrigosa</u>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

Prueba de tamizaje
Tinturas a concentración de 100 ug/ul
en las que se observo sensibilidad positiva

Anexo IV

Planta	Bacteria	75 ug/ul	50 ug/ul
<u>L. alba</u>	<u>S. aureus</u>	Negativo	Negativo
<u>L. graveolens</u>	<u>S. pneumoniae</u>	Positivo	Positivo
	<u>S. pyogenes</u>	Positivo	Negativo

Tinturas a concentración de 75 y 50 ug/ul
de las plantas que presentaron sensibilidad
en la prueba de tamizaje.

Leyla PP

Br. Leyla Patricia Dabroy Pérez

Armando

**Lic. Armando Cáceres Estrada
Asesor**

Gustavo

**Lic. Gustavo Gini
Director de Escuela**

Clemencia

**Lda. Clemencia Galvéz de Ávila
Decano**

**PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central**