

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



INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR

ANA SORAYA COJULUN CIFUENTES

PREVIO A OPTAR EL TITULO DE

QUIMICO BIOLOGO

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

GUATEMALA, MAYO DE 1995

DL  
06  
T(1655)

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

ACTO QUE DEDICO

A DIOS

A MIS PADRES

Gilberto Cojulún Díaz  
Rosaura Cifuentes Herrera

A MIS HERMANOS

Hugo, Xiomara, Omar, Jesús, Mayra,  
Jusef y Jil Kasím (Q.E.P.D.)

## AGRADECIMIENTO

Al Lic. Armando Cáceres Estrada, por su asesoría y estímulos continuos.

A la Licda. Elsa Jáuregui, por su colaboración y ayuda incondicionales.

Al Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos -FARMAYA- por el financiamiento y colaboración prestada para la realización del presente trabajo y a todo el personal que en él labora.

A la Señora Marivel Izaguirre de Cojulón, por su valiosa colaboración.

## INDICE

	<u>PAGINA</u>
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	3
3. ANTECEDENTES	5
3.1 Actividad antimicrobiana vegetal	5
3.2 Descripción general de las plantas en estudio	8
3.3 Descripción general de los microorganismos en estudio	12
3.4 Detección de la actividad microbiana <u>in vitro</u>	20
4. JUSTIFICACIONES	24
5. OBJETIVOS	25
6. HIPOTESIS	26
7. MATERIALES Y METODOS	27
7.1 Universo de trabajo	27
7.2 Recursos	28
7.3 Materiales	28
7.4 Procedimiento	29
7.5 Diseño estadístico	35
8. RESULTADOS	35
9. DISCUSION DE RESULTADOS	39
10. CONCLUSIONES	43
11. RECOMENDACIONES	44
12. REFERENCIAS	45
13. ANEXOS	50

## 1. RESUMEN

En el presente estudio se analizó la actividad antimicrobiana de tres plantas medicinales de uso popular en el tratamiento de infecciones respiratorias, gastrointestinales e infecciones causadas por hongos.

La investigación se dividió en tres fases; en la primera fase se realizó un tamizaje de la actividad antimicrobiana in vitro con extractos etanólicos de hojas y raíces de Satureja brownei y Tagetes filifolia y hojas, raíces y semillas de Plantago australis enfrentándolos a bacterias (Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhi, Shigella flexneri, Staphylococcus aureus y Streptococcus pyogenes) y hongos (Aspergillus flavus, Candida albicans, Epidermophyton floccosum, Microsporum gypseum y Trichophyton rubrum). Las bacterias y C. albicans se ensayaron utilizando el método de dilución en agar según Mitscher et al. y los dermatofitos por el método de Mac Rae et al. La segunda fase consistió en la evaluación del mejor disolvente y utilizando para esto tres disolventes de diferente polaridad (diclorometano, etanol al 80% y agua destilada). En la tercera fase se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos vegetales en estudio.

Como resultado se obtuvo que solamente los extractos de las hojas de P. australis y S. brownei inhibieron el crecimiento de las bacterias y C. albicans, excepto por S. pyogenes. En el caso de los dermatofitos se observó que sólo T. rubrum fue inhibido por los extractos de las tres plantas

T. rubrum fue inhibido por los extractos de las tres plantas investigadas.

En la fase de selección del mejor disolvente se obtuvo que el etanol al 80% mostró ser el que extrajo la mayor cantidad del principio activo.

En la determinación de la CIM se obtuvo que para el caso de las bacterias y C. albicans fue de 8mg/ml para T. rubrum y de 2.5mg/ml.

## 2. INTRODUCCION

El uso popular de las plantas medicinales está sumamente arraigado en Guatemala, tanto por la diversidad de la flora del país, como por el conocimiento tradicional legado por nuestros antiguos mayas quienes incursionaron exitosamente en las artes y en las ciencias. Actualmente la utilidad de estas plantas es motivo de diversas investigaciones que confirman científicamente algunas de las propiedades antimicrobianas que les han sido atribuidas (1).

Las plantas medicinales constituyen hoy en día una alternativa terapéutica contra los procesos infecciosos más comunes causantes de los altos índices de morbilidad de nuestro país, contribuyendo de esta manera al continuo desarrollo de la medicina tradicional y a ir disminuyendo la dependencia que se tiene a los fármacos de patente producidos industrialmente (1).

Debido a las características medicinales de Tagetes filifolia (Anís de chucho), Satureja brownei (Toronjil) y Plantago australis (Llantén), en las cuales se ha demostrado la existencia de cierta propiedad antimicrobiana, en el presente trabajo se pretendió confirmar dicha actividad mediante la obtención de extractos vegetales obtenidos con disolventes de diferente polaridad, determinando el espectro de inhibición de estos a 6 bacterias: Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Escherichia coli enteropatógena, Salmonella typhi, Shigella flexneri y Streptococcus pyogenes y 5 hongos: Candida albicans, Aspergillus flavus,

Epidermophyton floccosum, Microsporium gypseum y Trichophyton rubrum aislados de materiales clínicos. Por esta forma se determinó la concentración inhibitoria mínima para cada planta y grupo de microorganismos estudiados. Así mismo se demostró que la actividad antimicrobiana de las tres plantas en estudio se encuentran principalmente en las partes aéreas, ya que en las partes subterráneas fue mínima.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Actividad antimicrobiana vegetal

Profundizar en el estudio de la medicina tradicional de los diferentes pueblos del mundo, ha sido tema de especial interés para muchos investigadores en la actualidad. En particular para aquellos que están involucrados en las áreas de salud y que se preocupan por el conocimiento y conservación de los elementos culturales que conforman las diferentes sociedades, tales como sociólogos y antropólogos. Este ha sido uno de los orígenes de la etnociencia y el centro de ésta, la etnomedicina (1).

En la actualidad, las plantas medicinales se utilizan para la preparación de tinturas, extractos o como materia prima para obtener principios activos puros. En el pasado, las plantas se utilizaban en base a los conocimientos empíricos que se tenían acerca de sus propiedades medicinales y para ello se empleaba toda la planta. Posteriormente el estudio de las plantas se caracterizó por la identificación botánica de las especies consideradas como medicinales. A partir de entonces se ha puesto atención en la identificación, caracterización y análisis de los principios que expliquen las propiedades medicinales de las plantas (2).

En Guatemala se han realizado varios trabajos relacionados con la actividad antimicrobiana de plantas popularmente utilizadas contra afecciones gastrointestinales, respiratorias, urinarias, así como conjuntivitis, vaginitis, piodermias y micosis. Dentro de esta gama de trabajos los que poseen

mayor interés para este estudio son aquellos relacionados con afecciones gastrointestinales, respiratorias y de la piel. Entre éstos se encuentra un estudio realizado por Cano en 1985, sobre la actividad de 25 plantas utilizadas popularmente en el tratamiento de diarreas, contra cinco enterobacterias, presentando acción inhibitoria un 44% de éstas, correspondiendo la mayor actividad a Tagetes lucida y Ocimum basilicum (3).

En 1986 Alvarado y colaboradores analizaron 24 plantas en etapas de tamizaje, utilizando etanol como solvente de extracción y observaron actividad inhibitoria en 11 (44%) de ellas contra Salmonella typhi y Shigella flexneri (4).

Alvarez en 1987, obtuvo un listado de 116 plantas utilizadas en afecciones respiratorias, mediante encuestas realizadas en 11 departamentos de la república. De ellas seleccionó 16 para evaluar su actividad contra Streptococcus pyogenes y Staphylococcus aureus, obteniendo resultados positivos en 13 plantas (81.82%) y la mejor actividad con Eucalyptus globulus (5).

Un estudio realizado por Alcántara en este mismo año relacionado con cuatro especies del género Tagetes, demostró que la maceración de T. lucida tuvo la mejor actividad inhibitoria contra S. flexneri, S. typhi y Candida albicans (6).

A continuación se describen algunos de los estudios realizados por Cáceres y colaboradores sobre la actividad antimicrobiana de diferentes extractos vegetales.

En 1989, realizaron un estudio con más de 300 plantas de cerca de 100 familias las cuales demostraron que durante los años de 1981 a 1988 habían sido utilizadas para el tratamiento popular de infecciones en Guatemala. Se obtuvo como resultado que las plantas más importantes demostraron alguna actividad antimicrobiana in vitro contra bacterias Gram positivo y Gram negativo, levaduras, dermatofitos, protozoarios de las mucosas y parásitos intestinales (7).

En 1990, analizaron la actividad inhibitoria in vitro de 84 de las plantas más utilizadas en Guatemala contra cinco enterobacterias patógenas al hombre, Escherichia coli, Salmonella enteritidis, S. typhi, Shigella dysenteriae y S. flexneri; encontrando que 34 plantas (40.48%) inhibieron una o más de las enterobacterias estudiadas. La bacteria más inhibida fue S. typhi y la que presentó mayor resistencia fue E. coli (8).

Así mismo estudiaron la actividad in vitro de 44 plantas contra los dermatofitos más comunes (Epidermophyton floccosum, Microsporum canis, Microsporum gypseum, Trichophyton mentagrophytes y Trichophyton rubrum), obteniendo que los extractos acuosos de 22 (50%) de las plantas estudiadas inhibían uno o más de los dermatofitos. Los más inhibidos fueron E. floccosum, T. rubrum y T. mentagrophytes; los menos inhibidos fueron M. canis y M. gypseum (9).

En ese mismo año realizaron un estudio con 68 de las plantas más utilizadas para el tratamiento de enfermedades respiratorias, la mayoría de origen americano, con el fin de

evaluar su actividad antibacteriana contra tres bacterias Gram positivo (S. aureus, Streptococcus pyogenes y S. pneumoniae). Se obtuvo como resultado que 28 (41.17%) de dichas plantas inhibieron el crecimiento de uno o más de los microorganismos estudiados. S. aureus fue inhibido por 18 (26.77%) de los extractos vegetales, mientras que 7 (12.9%) de estos fueron efectivos contra S. pyogenes (10).

### 3.2 Descripción general de las plantas en estudio

#### 3.2.1 Tagetes filifolia Lag.

##### 3.2.1.1 Nombre Común: anís de chucho.

##### 3.2.1.2 Descripción de la planta.

Hierba anual erecta, con muchas ramas en la copa, 8 a 50 cm. de alto, hojas opuestas de 1 a 25 cm. de largo a veces divididas en segmentos filiformes, finos y pequeños, involucre de 1.5 a 2.5 mm de ancho, punteado glandular; vilano compuesto de 4 a 5 escamas con aristas de 2 a 5 mm de largo. Las flores son de color amarillo pálido o blanquecino, radio oval de 1.5 mm, aquenos de 4 a 5 mm de largo; toda la planta con fuerte olor a anís (11, 12).

##### 3.2.1.3 Origen y distribución.

Nativa de México hasta Sudamérica en bosques de pino y encino y en milpas a 900 - 2,500 metros sobre el nivel del mar (msnm) de elevación. En Guatemala se encuentra en Alta Verapaz, Chiquimula, Jalapa, Jutiapa, Santa Rosa, Guatemala, Sacatepéquez, Chimaltenango, Huehuetenango, Quetzaltenango y Zacapa (11, 12, 13).

#### 3.2.1.4 Usos.

Toda la planta se usa como emoliente, depurativo y antisifilítico. Se le atribuyen propiedades diuréticas, febrífugas y estimulantes. En las infecciones gastro-intestinales se utiliza en el tratamiento de indigestión, flatulencia, diarrea, disentería y dolor de estómago (13, 15, 16).

#### 3.2.1.5 Componentes Químicos

Las hojas y las flores contienen poliacetilenos (alfa-tertienil y 5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitienil), querecetage-tina-7-0, arabinosil-galactósido, querecetina, quercitina-3-0-arabinósido, quercitina-3-0-galactosidasa, isoramnetina y esdragol (6).

#### 3.2.2 Satureja brownei Briq.

##### 3.2.2.1 Nombre común: Toronjil

##### 3.2.2.2 Descripción de la planta.

Hierba fuertemente aromática, perenne, delicada con una larga y delgada raíz enredada y un tallo delgado y ramificado en la base, las ramas se extienden generalmente de 10 a 40 cm de largo, pero algunas veces los brotes rectos ascienden a 20 cm, las hojas son pequeñas, ovaladas, de color verde oscuro, lampiñas y se encuentran una frente a otra. Las flores son de color lila pálido o blanco con puntos morados en el cuello y tienen de 7 a 8 mm de largo, con un cáliz plano, tubular y dentado de 3.5 a 5 mm de largo, generalmente se encuentran solitarias en las axilas de las hojas. Los frutos están

constituidos por una sola semilla lisa y de color café (13, 17).

#### **3.2.2.3 Origen y distribución:**

Crece en forma silvestre en campos húmedos y sombríos, en malezas y pantanos de agua fresca o en las riberas de los ríos arriba de 1,200 msn. Se localiza en las Bahamas, Cuba, Jamaica, República Dominicana, Haití, Puerto Rico, Yucatán, Costa Rica, regiones templadas de Venezuela, Colombia, Ecuador y Argentina. En Guatemala se encuentra en tierras húmedas y clima templado en el altiplano central y occidental del país (13, 18).

#### **3.2.2.4 Usos.**

Toda la planta se usa para el tratamiento de asma, calambres, catarro, congestión nasal, diarrea, dolor de cabeza y estómago, flatulencia, histeria, epilepsia, náusea, hipertensión, pleuresía y trastornos menstruales. Se le atribuyen propiedades calmantes, digestivas, febrífugas, hipotensoras y expectorantes; en grandes dosis puede ser abortiva. El aceite es insecticida y es usado en el tratamiento de picaduras de mosquitos (13, 17).

El tamizaje antimicrobiano demuestra que el extracto alcohólico de las hojas inhibe el crecimiento de S. aureus y S. pyogenes (5,10).

#### **3.2.2.5 Componentes químicos.**

Las hojas son ricas en aceite esencial que contiene citronelal, linalol y geraniol (17).

### 3.2.3 Plantago australis Lam.

#### 3.2.3.1 Nombre común: Llantén.

#### 3.2.3.2 Descripción de la planta.

Hierba perenne que vive hasta dos años, alcanzando de 20 a 40 cm de alto. Las hojas son anchas o alargadas de color verde y lampiñas. El tallo es recto y en las puntas se encuentran las flores pequeñas de color amarillo verdoso, que están junto con los frutos formando espigas. Los frutos son capsulillas que contienen muchas semillas muy pequeñas de color café oscuro (17, 19).

#### 3.2.3.3 Origen y distribución.

Crece en prados húmedos, campos, riberas, matorrales, bosques de pinos y de cipreces, localizados a 360-3,500 msnm. Se da en Alta Verapaz, Chimaltenango, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Quezaltenango, El Quiché, Retalhuleu, Sacatepéquez, San Marcos, Sololá y Zacapa. También se encuentra en El Salvador, Honduras, Costa Rica, al sur de Brasil, Bolivia y Argentina (19).

#### 3.2.3.4 Usos.

Tiene propiedades antibióticas contra bacterias causantes de infecciones de la piel, por lo que ayuda a sanar y cicatrizar heridas, llagas y golpes sangrantes. En lavados elimina infecciones como leucorrea o flujo blanco. Alivia hemorroides desinflama las aftas de la boca, se utiliza como expectorante para aliviar la tos y los catarros bronquiales (17).

### 3.2.3.5 Componentes químicos.

La planta contiene taninos, sales de potasio, ácido cítrico, glucósidos de aucubina, cumarinas y enzimas. De la planta madura se han aislado 18 flavonoides y polifenoles. Las semillas contienen aucubina, colina, pectina, taninos, mucílago, ácidos orgánicos y algodón (17).

### 3.3. Descripción general de los microorganismos en estudio

#### 3.3.1 Microorganismos causantes de enfermedades de la piel

##### 3.3.1.1 Pseudomonas aeruginosa

La P. aeruginosa es un bacilo Gram negativo de 0.5 a 1 por 3 a 4 um. Habitualmente posee un flagelo polar único pero ocasionalmente pueden constatarse dos o tres flagelos. Produce una capa de polisacárido extracelular, similar a una cápsula. Las cepas aisladas de muestras clínicas con frecuencia poseen cilios que pueden promover la adherencia a la superficie celular.

Las infecciones con P. aeruginosa se producen en individuos con defensas alteradas. Estos incluyen pacientes con quemaduras, personas con enfermedades malignas o metabólicas, o aquellos que han sido sometidos a instrumentación o manipulaciones. La frecuencia de infecciones de las vías urinarias es mayor en individuos de edad avanzada. El tratamiento prolongado con drogas inmunosupresoras o antimicrobianos y la radioterapia también predisponen a las infecciones por P. aeruginosa.

La mayoría de cepas son susceptibles a amikacina,

gentamicina, tobramicina y colistina, pero desarrollan formas resistentes, especialmente en tratamientos prolongados. Aproximadamente el 50% de las cepas de P. aeruginosa son sensibles a la carbenicilina y ticarcilina. El derivado de sulfonamida, sulfamilón, cuando es aplicado tópicamente, limita la densidad bacteriana en quemaduras e impide la diseminación de los microorganismos hacia otros sitios del cuerpo (20).

### 3.3.1.2 Staphylococcus aureus

Staphylococcus es el principal género de importancia clínica en la familia Micrococaceae. El nombre se deriva del griego Staphyle que significa racimo de uvas y Kokkos que significa grano. Su diámetro varía entre 0.5 y 1.56  $\mu\text{m}$ . Son cocos Gram positivo, no móviles y no esporoformadores. Pocas cepas producen una cápsula (cepas mucoides) que incrementa la virulencia del organismo y la mayoría son anaerobios facultativos (21-24).

Debido a que muchas cepas producían un pigmento amarillo dorado, el organismo se denominó Staphylococcus aureus, para distinguirlo de aquellos considerados no patógenos que habitualmente producen colonias blancas; este criterio taxonómico ha caído en desuso (25).

El contacto directo a través de las manos es la vía de transmisión más importante. El problema de los portadores en hospitales es crítico especialmente en salas de pediatría o salas cuna (13, 15, 17).

Las infecciones más comunes incluyen celulitis,

pústulas, carbúnculos, impétigo, infecciones postoperatorias, neumonía, osteomielitis, síndrome exfoliativo, shock tóxico y gran variedad de infecciones nosocomiales (20, 22, 24).

A menos que el paciente sea alérgico se recomienda el uso de bactericidas análogos a la penicilina. La elección inicial debe limitarse a drogas resistentes a penicilinasas, ya que muchos aislamientos de infecciones comunitarias y hospitalarias son resistentes a penicilina G, penicilina V y ampicilina. Si el paciente es alérgico a penicilina pueden utilizarse cefalosporinas, eritromicina, clindamicina o vancomicina (20).

#### 3.3.1.3 Candida albicans

La candidosis es una infección causada por diversas especies de la levadura del género Candida, especialmente por C. albicans. Estos microorganismos son miembros de la flora normal de la piel, mucosas y tracto gastrointestinal. Durante el nacimiento o poco después, todos los humanos adquieren y son colonizados por especies de Candida (20).

La C. albicans es capaz de producir levaduras seudohifas e hifas verdaderas. Las células de levadura y los fragmentos de micelio son intensamente Gram positivo (20, 26).

C. albicans puede producir lesiones en la boca, esófago, tracto urinario, piel, uñas, bronquios, pulmones y otros órganos de pacientes en quienes los mecanismos de defensa normales están alterados por otra enfermedad, por el tratamiento con agentes antimicrobianos o con inmunosupresores. La candidosis cutánea puede tratarse con antimicóticos

como nistatina, ketoconazol y miconazol o con soluciones químicas de uso tópico como violeta de genciana. Para el tratamiento de la candidosis sistémica, se aconseja anfotericina B y/o 5-flucitosina. La candidosis mucocutánea crónica ha sido tratada con 4-flucitosina, anfotericina B, ~~soluciones químicas tópicas y~~ factor de transferencia (26):

### 3.3.2 Microorganismos causantes de infecciones respiratorias

#### 3.3.2.1 Streptococcus pyogenes

S. pyogenes o estreptococo beta hemolítico del grupo A de Lancefield, es una bacteria de forma cocoide, Gram positivo, agrupada predominantemente en cadenas largas.

Esta bacteria produce una gama de enfermedades muy amplia como escarlatina, amigdalitis, otitis media, sepsis puerperal e infecciones de heridas. También produce enfermedades en pacientes a consecuencia de reacciones ~~antígeno-anticuerpo~~ anormales, como fiebre reumática y glomerulonefritis difusa aguda.

S. pyogenes es universalmente susceptible a la penicilina G, por lo que se debe realizar una prueba de susceptibilidad antimicrobiana sólo en los casos en los que el paciente es alérgico a la penicilina. En estos casos el tratamiento es eritromicina o tetraciclina; sin embargo, de 3 a 5 por ciento de las cepas son resistentes a estos antibióticos (20).

### 3.3.3 Microorganismos causantes de infecciones gastrointestinales

#### 3.3.3.1 Escherichia coli enteropatógena

E. coli enteropatógena define a los serogrupos "O" específicamente incriminados como causantes de diarrea en recién nacidos y en niños menores de dos años, pero rara vez en adultos, excepto cuando su sistema inmunológico está deficiente. Los serogrupos que pertenecen a esta categoría son los siguientes: 018a18c, 020a20b, 026, 044, 055, 086, 0111a111b, 0114, 0119, 0125a125c, 0126, 0127, 0128a128b128c, 0142 y 0158. Recientemente el serogrupo 020 no es incluido dentro de las cepas enteropatógenas (27-29).

Las cepas de E. coli aisladas de infecciones adquiridas en la comunidad habitualmente son susceptibles a la mayoría de los antimicrobianos utilizados en el tratamiento de infecciones por microorganismos Gram negativo. Sin embargo, aparecen formas resistentes, especialmente en pacientes con antecedentes de tratamiento previo con antibiótico (20).

En la infección por E. coli en niños de corta edad se utiliza la administración oral de colistina, gentamicina y kanamicina, aunque se han detectado microorganismos resistentes a estos fármacos (30).

#### 3.3.3.2 Salmonella typhi

El género Salmonella está compuesto por un grupo serológica y bioquímicamente complejo de microorganismos agrupándose en tres especies: S. typhi, S. cholerasuis y S. enteritidis. Las dos primeras especies tienen un solo

serotipo, mientras que S. enteritidis posee varios serotipos (20).

S. typhi es un bacilo Gram negativo, aerobio facultativo y es el agente causal de un amplio rango de enfermedades entéricas humanas, desde una gastroenteritis autolimitada con síntomas leves de corta duración, hasta una gastroenteritis severa con o sin bacteremia, incluyendo la fiebre tifoidea, la cual es una enfermedad severa, debilitante y de alto riesgo (31).

En casos de fiebre entérica o septicemia, como la fiebre tifoidea, la ampicilina o el cloranfenicol son las drogas de elección (30).

#### 3.3.3.3 Shigella flexneri

Dentro del género Shigella se incluyen cuatro especies: S. dysenteriae, S. boydii, S. sonnei y S. flexneri, las cuales pueden causar disentería bacilar. La shigelosis es generalmente endémica y es una importante causa de morbimortalidad.

La ampicilina es la droga de elección para cepas sensibles. El trimetoprim-sulfametoxazol es la combinación de elección cuando se desconoce la sensibilidad del microorganismo o el paciente es alérgico a drogas de tipo penicilina (20).

#### 3.3.4 Hongos

##### 3.3.4.1 Aspergillus flavus

Aún cuando el Aspergillus es uno de los contaminantes

más comunes y molestos que se encuentran en el laboratorio, algunos de ellos son patógenos y pueden producir lesiones granulomatosas inflamatorias o crónicas, en los bronquios o en los pulmones, a menudo con diseminación hematógica a otros órganos (26).

A. flavus es causante de aspergilosis invasora en presencia de procesos malignos, leucemia, granulocitopenia, o de terapéutica con corticoesteroides. Aún cuando A. fumigatus es el agente más común de la aspergilosis pulmonar, ésta puede atribuirse a otras especies, incluyendo A. flavus (20, 26).

Las formas alérgicas de aspergilosis se han tratado con corticoides y tratamiento antimicótico. El gluconato disódico disminuye los síntomas, pero no previene las recidivas.

Para el tratamiento de aspergiloma se aconseja el uso de anfotericina B y 5-flucitosina y se ha sugerido el lavado pulmonar para facilitar la penetración de la droga en la cavidad. Se instituye anfotericina B en forma acelerada tan pronto como se diagnóstica aspergilosis invasiva. La aspergilosis superficial localizada se trata con nistatina (20).

#### 3.3.4.2. Epidermophyton floccosum

Se ha aislado de humanos como causante principal de las infecciones: tinea cruris y tinea pedis, la cual crece sólo en la epidermis y a menudo en las áreas interdigitales de la región inguinal y las de los pies respectivamente (33).

Por su hábitat es un hongo antropofílico, difundido por todo el mundo, especialmente en las regiones húmedas y cálidas. En Guatemala en relación con las micosis cutáneas este hongo ocupa el cuarto lugar de frecuencia, según su etiología como causante de tiña (33, 34).

Para su tratamiento puede emplearse griseofulvina, y desde luego está indicada en el tratamiento de enfermos resistentes (32).

#### 3.3.4.3 Microsporum gypseum

Este hongo se ha aislado de humanos, siendo el causante principal de la infección llamada tinea capitis, presenta invasión endotrix en el pelo, con pápulas eritematosas alrededor, alopecia severa e inflamada, con formación de erupciones ulcerosas conocidas como "kerion" (26, 33).

Por su hábitat es un hongo geofílico, abundante en todo el mundo. La infección humana es causada por el contacto con perros u otros animales. En Guatemala en relación con las micosis cutáneas, este hongo ocupa el quinto lugar de frecuencia, según su etiología como causante de tiña (33, 34).

Resulta difícil el tratamiento satisfactorio de la tinea capitis a menos que se use griseofulvina (32).

#### 3.3.4.4 Trychophyton rubrum

Este hongo se ha aislado de humano, y es el causante de las infecciones: tinea pedis, tinea corporis y onicomycosis; rara vez invade al pelo, pero cuando lo hace causa una invasión ectotrix, con pápulas escamosas, eritematosas y

vesículas granulomatosas (33).

Por su hábitat este hongo es antropofílico, difundido por todo el mundo; la infección humana puede ser directa o indirecta de persona a persona. En Guatemala en relación con las micosis cutáneas, este hongo ocupa el primer lugar de frecuencia, según su etiología como causante de tiña (33, 34).

Para su tratamiento se recomienda el uso de griseofulvina en preparados a base de partículas pequeñas a finas (32).

#### 3.4. Detección de la actividad antimicrobiana in vitro

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana in vitro pueden ser influenciados marcadamente por los reactivos y condiciones en que se realicen las pruebas. Los factores que deben tomarse en cuenta cuando se investiga el efecto antimicrobiano de plantas medicinales son la composición del medio de cultivo, los microorganismos a ensayar, el método de extracción, el pH, la solubilidad de la muestra en el medio de cultivo, etc. Además de esto, los métodos in vitro con agentes antifúngicos presentan ciertas dificultades ya que los hongos poseen algunas características especiales como dimorfismo, requerimiento de tiempos prolongados de crecimiento y requerimientos de temperatura de crecimiento específicos (35, 36).

Tomando en cuenta estos factores se han encontrado diferentes métodos para el estudio de la actividad

antimicrobiana in vitro de plantas medicinales; estos métodos se clasifican en tres grupos: difusión, dilución y bioautográfico (35, 37).

#### 3.4.1 Método de difusión

Los métodos de difusión pueden ser utilizados como procedimientos cualitativos, semicuantitativos o cuantitativos, aunque generalmente los microorganismos se describen como resistentes, intermedios o susceptibles a cada agente antimicrobiano. Además no requiere una dispersión homogénea de la muestra en agua ya que el extracto se coloca sobre el agar usando un disco, un cilindro o una cavidad como reservorio. La muestra entra en contacto con el medio inoculado y con el microorganismo, y después de la incubación se mide el diámetro de inhibición (zona clara alrededor del reservorio). Estos métodos originalmente fueron designados como monitores de la cantidad de antibiótico en extractos crudos. No es recomendable en muestras que no son altamente solubles en agua, como es el caso de los aceites esenciales, en extractos no polares o para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de las muestras. Se presentan ciertas dificultades cuando se emplean muestras que contienen aceites esenciales, ya que en estos casos no hay relación entre el poder de difusión y la actividad antimicrobiana (36).

Estos métodos presentan la ventaja de usar una pequeña muestra en el tamizaje y la posibilidad de investigar 5 ó 6 componentes contra un microorganismo; también son apropiados como tamizaje antimicrobiano preliminar de sustancias puras

(alcaloides, flavonoides, etc.); pero no se utiliza como un método definitivo.

#### 3.4.2 Método de dilución

Los métodos de dilución se basan en una dispersión homogénea de la muestra en un medio de cultivo selectivo, entre los cuales se incluyen: 1) dilución en caldo, en donde la turbidez es tomada como índice de densidad bacteriana, así el grado de inhibición se relaciona con la turbidez del medio, la cual se mide espectrofotométricamente; y 2) dilución en agar en donde se mezcla la muestra con el agar y sobre el mismo se siembran los microorganismos a ensayar.

La dilución en caldo es más precisa pero un poco más complicada. La actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas pueden determinarse por incorporación de una muestra emulsificada con un agente surfactante lo que hace que la estabilidad de la emulsión permanezca constante durante el análisis.

La dilución en agar es comparable con la dilución en caldo, pero este último es más rápido, simple y al mismo tiempo, puede determinarse la CIM de un producto contra 6 u 8 microorganismos. Este método es el más conveniente para un laboratorio pequeño ya que es muy difícil preparar extractos vegetales estériles sin el uso de autoclave o de otras condiciones. Las muestras no necesitan estar estériles ya que los microorganismos aeróbicos no se desarrollan bajo el agar solidificado y los microorganismos contaminantes que puedan desarrollarse en la superficie del agar son fácilmente

reconocidos, por lo que no representan ningún problema. Este método se aplica a muestras polares, no polares y lipofílicas. Es el método ideal cuando la muestra a trabajar es un extracto complejo.

Los métodos de dilución se utilizan principalmente para la determinación de la CIM de un extracto, aceite esencial o sustancia pura y puede ser usado en el tamizaje preliminar de la actividad antimicrobiana (35).

La sensibilidad de los métodos de difusión y dilución ha sido comparada obteniéndose resultados similares con ambos (35).

#### 3.4.3 Métodos bioautográficos

La bioautografía es otro de los métodos para el estudio de la actividad antimicrobiana y el más importante para determinar un compuesto antimicrobiano nuevo o uno sin previa identificación. Este método se basa en los efectos biológicos (antibacterianos, antiprotozoarios, antitumorales, etc.) de las sustancias estudiadas. Este procedimiento se basa en la técnica de difusión en agar, donde el compuesto antimicrobiano aislado en una cromatoplaaca es transferido de una capa con agar inoculado con el microorganismo en estudio. Se visualizan zonas de inhibición de crecimiento microbiano y puede demostrarse por actividad de la deshidrogenasa con el uso de reactivos químicos.

Este método hace posible la localización de la actividad antimicrobiana en un cromatograma, pero se requiere de un equipo microbiológico complejo (35).

#### 4. JUSTIFICACIONES

Guatemala posee una abundante y variada vegetación la cual ha motivado a la realización de diversos estudios que permitan establecer el uso popular de las plantas con el fin de crear nuevas alternativas terapéuticas, haciendo uso de los recursos naturales propios del país.

Estudios anteriores realizados in vitro, han demostrado que algunos extractos vegetales poseen cierta actividad antimicrobiana por lo que se hace necesario evaluar a fondo dicha propiedad.

El presente estudio pretende contribuir a confirmar la actividad antimicrobiana in vitro de 3 plantas del altiplano del país. Así como determinar el solvente ideal para la extracción de los principios activos, los cuales servirán de base para estudios fitoquímicos posteriores.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 General

Validar experimentalmente el uso de las plantas medicinales tradicionales en Guatemala.

### 5.2 Específicos

- 5.2.1. Confirmar la actividad antimicrobiana in vitro de los extractos de T. filifolia (Anís de chucho), S. brownei (Toronjil) y P. australis (Llantén), que han demostrado alguna actividad antimicrobiana en estudios anteriores.
- 5.2.2. Demostrar si la actividad antimicrobiana es común a las partes aéreas y a las subterráneas de las plantas en estudio.
- 5.2.3. Determinar el mejor solvente para extraer el principio activo de dichas plantas.
- 5.2.4. Determinar la concentración inhibitoria mínima de los extractos con mayor actividad.

## 6. HIPOTESIS

- 6.1 Los extractos vegetales de las tres plantas tienen actividad antimicrobiana.
- 6.2 Las partes aéreas de las plantas en estudio presentan mayor actividad antimicrobiana que sus partes subterráneas.

## 7. MATERIALES Y METODOS

### 7.1 Universo de trabajo

- Hojas y raíces de plantas que han mostrado actividad antimicrobiana in vitro.

Tagetes filifolia FMAYA 413

Satureja brownei FMAYA 472

Plantago australis FMAYA 471

- Bacterias y hongos causales de infecciones gastrointestinales, respiratorias y de la piel:

Pseudomona aeruginosa ATCC 15442

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Escherichia coli enteropatógena ATCC 9637

Salmonella typhi INCAP ST-007

Shigella flexneri INCAP CDC

Streptococcus pyogenes INCAP 90809

Candida albicans ATCC 10231

Aspergillus flavus A-75

Epidermophyton floccosum IGSS 761

Microsporium gypseum M-71

Trichophyton rubrum T-3.5

- Disolventes:

Etolol al 50% y 80% grado reactivo (Merck)

Diclorometano (Merck)

Agua destilada

## 7.2 Recursos

### 7.2.1 Recursos humanos:

Autora: Br. Soraya Cojulún

Asesor: Lic. Armando Cáceres

### 7.2.2 Recursos institucionales:

Laboratorio del Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Laboratorios de Productos Fitofarmacéuticos FARMAYA.

## 7.3 Materiales

### 7.3.1 Medios de cultivo:

Agar Mueller Hinton (BBL)

Agar Sabouraud (BBI)

Agar Sabouraud para producción de esporas de Takashio (BBL)

Agar sangre de carnero al 5% (BBL)

### 7.3.2 Equipo y cristalería:

Balanza analítica (Sartorius)

Autoclave (All American)

Refrigerador

Incubadora (Memmert)

Mechero de Bunsen

Campana microbiológica

Unidad de filtración con bomba de vacío

Mezclador tipo Vortex

Papel filtro Whatman No. 1

Filtros millipore 0.45 mm

Soporte con anillo gravesande

Tubos con tapón de rosca

Rotavapor

Pipetas automáticas de 100 ul, 500 ul y 1000 ul

Pipetas serológicas de 5 y 10 ml

Probeta graduada de 100 ml

Erlenmeyer de 250 y 500 ml

Embudo de vástago corto

Cajas de Petri de 15 ml

Algodón

Gasa

Asa de nicromo

Frascos de color ámbar de 3 onzas fluidas

Agitadores de vidrio

#### 7.4. Procedimiento

##### 7.4.1 Pruebas de tamizaje de la actividad antimicrobiana in vitro.

###### - Selección de Plantas

En base a estudios in vitro realizados anteriormente se eligieron 3 hierbas del altiplano del país que han presentado alguna acción antimicrobiana.

###### - Recolección y clasificación

Se recolectaron las plantas en los departamentos de Guatemala y Quetzaltenango, posteriormente se clasificaron.

###### - Preparación de las plantas

Se colocaron las partes de las plantas a utilizar en secadores especiales para el proceso, posteriormente se picaron y se molieron hasta alcanzar estructuras pequeñas de igual

tamaño. Se almacenaron en bolsas plásticas selladas.

- Obtención de las tinturas vegetales

Se utilizaron 10 gr de materia vegetal y se mezclaron con 100 ml de etanol al 50% durante tres días. Luego se filtraron con membrana de papel filtro Whatman No. 1.

7.4.1.1 Procedimiento para bacterias y levaduras

- Preparación del medio

Se prepararon 9 ml de Agar Mueller Hinton y se agregó 1 ml del extracto vegetal de cada planta a una temperatura aproximada de 50°C y se vertió en una caja de Petri para su confrontación microbiana. Se incubó a 35°C durante 24 h, se observó crecimiento bacteriano para probar su esterilidad y se almacenaron las cajas libres de contaminación en bolsas plásticas a 4°C. (38)

- Preparación del inóculo

Se purificaron los microorganismos a ensayar y se inocularon en un tubo con 8 ml de agar tripticasa soya inclinado y se incubaron a 35°C durante 24 h. Se inoculó una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5 ml de caldo tripticasa soya, se incubó a 35°C durante 24 h. Para el inóculo 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, 1 ml de la suspensión en 10 ml de SSE.

- Demostración de la actividad antimicrobiana

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.

incubar a 35° C durante 24 h.

-Interpretación de resultados

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

Crecimiento microbiano = actividad antimicrobiana negativa (-).

No crecimiento microbiano = actividad antimicrobiana positiva (+).

7.4.1.2 Procedimiento para hongos

- Preparación del medio y procedimiento para la obtención de esporas.

Se preparó agar Sabouraud modificado según la técnica de Takashio para la mayor producción de esporas. Se inocularon los hongos a estudiar y se incubaron a 27° C durante 15 días. Se agregó 3 ml 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 hizo un conteo de esporas en una cámara de Neubauer hasta alcanzar una concentración de 300 esporas por ml y de 100 esporas por ml para A. flavus. Se almacenó en viales de # 8 hasta su utilización ínter.

-Preparación del medio

Se preparó tubos de ensayo conteniendo 13.5 ml de medio Sabouraud estéril aproximadamente a 50 ° C, estando aún líquido se agregó 1.5 ml del extracto del órgano vegetal a ensayar (dilución 1:10). Se vertió el agar planta en cajas de petri

estériles, se esperó a que solidificaran y posteriormente se guardaron en refrigeración durante 24 h (40).

- Demostración de actividad antimicrobiana

Se perforaron 4 pocitos en el agar-extracto vegetal con la boca de una campana de Durham de 5 mm de diámetro, (ver Anexos fig. 1B) se inocularon 30ul de la suspensión de esporas de A. flavus, E. floccosum, M. gypseum, y T. rubrum; preparadas previamente. Se guardaron en la incubadora a 27°C durante 24 h, posteriormente se dieron vuelta a las cajas e incubar a 27°C durante 15 días.

- Interpretación de 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 de las cajas control con el de las colonias de las cajas del agar-extracto vegetal. Se tomaron como positivos aquellos órganos de la planta que redujeron el diámetro de la colonia control en un 75%.

7.4.2 Confirmación de la actividad antimicrobiana in vitro

- Selección del mejor disolvente

Una vez determinado el o los órganos con mejor actividad antimicrobiana, se procedió a obtener nuevos extractos utilizando en primer lugar el diclorometano, luego el etanol al 80% y por último el agua destilada estéril. Se concentró cada extracto en el rotavapor hasta alcanzar una consistencia de miel. Finalmente, se resuspendió cada extracto en su

respectivo disolvente para obtener una dilución 1:10 y se almacenó en frascos de color ámbar hasta el momento de la prueba.

Para probar el mejor disolvente, se utilizó el mismo procedimiento empleado en el tamizaje, utilizando el o los órganos que demostraron mayor actividad.

- Determinación de la concentración inhibitoria mínima

Para determinar la CIM de bacterias, *C. albicans* y hongos se ensayó el órgano con el disolvente que mostró mayor actividad y se ensayaron varias concentraciones hasta encontrar la menor concentración que produce inhibición. Para ello se empleó el mismo procedimiento indicado en la prueba de tamizaje de la actividad antimicrobiana, con concentraciones variables del extracto.

### 7.5 Diseño Estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente por medio de un análisis binomial.

Para la realización de la parte experimental se inició con un tamizaje tanto para bacterias como para hongos determinándose así el órgano vegetal que presentó mayor acción inhibitoria de las tres plantas en estudio, luego se determinó el mejor disolvente y por último se determinó la concentración inhibitoria mínima del mejor disolvente.

#### 7.5.1 Diseño estadístico para tamizaje de bacterias

Se empleó un diseño de bloques al azar.

Para este estudio se usó un alfa de 0.1 y la prueba de hipótesis binomial fue:

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

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

Ho: se rechazó si la probabilidad de error es menor a  
alfa = 0.1.

Variable binomial: éxito = inhibición (+)

fracaso = crecimiento (-)

#### 7.5.2 Diseño estadístico para tamizaje de hongos

Se empleó un diseño de bloques.

Criterio de clasificación:

- Si hubo inhibición: el diámetro fue menor o igual al  
25% del diámetro del control.

- Si no hubo inhibición: el diámetro fue mayor o igual  
al 26% del diámetro del control.

Variable binomial: éxito = inhibición (+)

fracaso = crecimiento (-)

#### 7.5.3 Diseño estadístico para el mejor disolvente

Se trabajaron tres disolventes, el diseño fue el mismo  
que para el tamizaje.

#### 7.5.4 Concentración inhibitoria mínima (CIM)

Se trabajó el órgano que presentó mayor actividad,  
usando varias concentraciones. El diseño fue el mismo que  
para el tamizaje de hongos y bacterias, según fuera el caso.

## 8. RESULTADOS

En el presente estudio se ensayaron las hojas y raíces de S. brownei y T. filifolia y las hojas, raíz y semillas de P. australis con el fin de determinar la actividad antimicrobiana de dichas plantas contra microorganismos causantes de infecciones respiratorias, gastrointestinales y causadas por hongos.

Los resultados de la fase de tamizaje de la actividad antimicrobiana para bacterias y C. albicans se describen en la Tabla 1.

**TABLA 1.** Fase de tamizaje de la actividad antimicrobiana de P. australis, T. filifolia y S. brownei. Etanol al 50%.

		MICROORGANISMOS						
		A	B	C	D	E	F	G
Planta (10 mg/ml)	Parte usada							
<u>P. australis</u>	Hoja	+	+	+	+	+	+	-
<u>P. australis</u>	Raíz	-	-	-	-	-	-	-
<u>P. australis</u>	Semilla	-	-	-	-	-	-	-
<u>S. brownei</u>	Hoja	+	+	+	+	+	+	-
<u>S. brownei</u>	Raíz	-	-	-	-	-	-	-
<u>T. filifolia</u>	Hoja	-	-	-	-	-	-	-
<u>T. filifolia</u>	Raíz	-	-	-	-	-	-	-

Microorganismos ensayados: A= C. albicans, B= E. coli, C= P. aeruginosa, D= S. typhi, E= S. flexneri, F= S. aureus, G= S. pyogenes. + = Inhibición : - = No inhibición.

En el caso de los dermatofitos, se observó que los extractos vegetales de las tres plantas en estudio tuvieron efecto inhibitorio contra T. rubrum únicamente (Tabla 2).

**TABLA 2.** Fase de tamizaje de la actividad antidermatofítica de P. australis, T. filifolia y S. brownei. Etanol al 50%.

Planta (10 mg/ml)	Parte usada	MICROORGANISMOS			
		A	B	C	D
<u>P. australis</u>	Hoja	-	-	-	+
<u>P. australis</u>	Raíz	-	-	-	+
<u>P. australis</u>	Semilla	-	-	-	+
<u>S. brownei</u>	Hoja	-	-	-	+
<u>S. brownei</u>	Raíz	-	-	-	+
<u>T. filifolia</u>	Hoja	-	-	-	+
<u>T. filifolia</u>	Raíz	-	-	-	+

Hongos ensayados: A= A. flavus, B= E. floccosum, C= M. gypseum  
 D= T. rubrum. + = positivo: Inhibición (porcentaje de crecimiento  $\leq$  de 25%) - = negativo: No Inhibición. (porcentaje de crecimiento  $\geq$  25%).

Para la fase de selección del mejor disolvente para extraer el principio activo de la planta para bacterias, C. albicans y T. rubrum los resultados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Confirmación de la actividad antimicrobiana de hojas de P. australis, T. filifolia y S. brownei utilizando tres disolventes.

Planta	Disolvente	MICROORGANISMOS						
		A	B	C	D	E	F	G
<u>P. australis</u>	Agua	-	-	-	-	-	-	-
	Diclorometano	-	-	-	-	-	-	-
	Etanol 80%	+	+	+	+	+	+	+
<u>S. brownei</u>	Agua	-	-	-	-	-	-	-
	Diclorometano	-	-	-	-	-	-	-
	Etanol 80%	+	+	+	+	+	+	+
<u>T. filifolia</u>	Agua	0	0	0	0	0	0	-
	Diclorometano	0	0	0	0	0	0	-
	Etanol 80%	0	0	0	0	0	0	+

Microorganismos ensayados: A= C. albicans, B= E. coli, C= P. aeruginosa, D= S. typhi, E= S. flexneri, F= S. aureus, G= T. rubrum. + = Positivo: Inhibición. - = Negativo: No Inhibición. 0 = No ensayado.

En la Tabla 4 se presentan los resultados de la fase de determinación de la CIM para bacterias, C. albicans y T. rubrum.

**Tabla 4.** Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de las hojas de P. australis, S. brownei y T. filifolia. (Disolvente = Etanol al 80%).

Planta	Microorganismos	Concentración mg/ml					
		15	10	8.0	7.5	5.0	2.5
<u>P. australis</u>	A	0	+	+	-	-	0
	B	0	+	+	-	-	0
	C	0	+	+	-	-	0
	D	0	+	+	-	-	0
	E	0	+	+	-	-	0
	F	0	+	+	-	-	0
	G	+	+	0	0	+	-
<u>S. brownei</u>	A	0	+	+	-	-	0
	B	0	+	+	-	-	0
	C	0	+	+	-	-	0
	D	0	+	+	-	-	0
	E	0	+	+	-	-	0
	F	0	+	+	-	-	0
	G	+	+	0	0	+	-
<u>T. filifolia</u>	G	+	+	0	0	+	-

Microorganismos ensayados: A= C. albicans, B= E. coli, C= P. aeruginosa, D= S. typhi, E= E. flexneri, F= S. aureus, G= T. rubrum. + = Positivo: Inhibición. - = Negativo: No inhibición. 0 = No ensayado.

## 9. DISCUSION DE RESULTADOS

En la presente investigación se confirmó la actividad antimicrobiana de tres plantas medicinales de uso popular en Guatemala contra microorganismos causantes de infecciones respiratorias, gastrointestinales e infecciones causadas por hongos.

Para realizar la confrontación microbiana se utilizó la técnica de dilución en agar, la cual además de permitir la dispersión homogénea de la muestra sobre el medio de cultivo selectivo resulta ser un procedimiento rápido, simple y permite determinar la CIM de un producto contra seis u ocho microorganismos a la vez. Así mismo, no se hace necesario que las muestras estén estériles, pues los microorganismos aeróbicos no se desarrollan bajo el agar solidificado y los microorganismos contaminantes que puedan desarrollarse en la superficie son fácilmente reconocidos por lo que no representa ningún problema (35). Para los fines de este estudio se utilizó la técnica de dilución en agar según Mitscher et al. para bacterias y levaduras y la técnica de dilución en agar según MacRae et al. para dermatofitos.

Las tres plantas utilizadas fueron seleccionadas principalmente por ser hierbas que demostraron tener actividad antimicrobiana en trabajos anteriores y por que se pueden encontrar fácilmente en lugares como jardines y arriates de las casas o bien a orillas de los ríos, en bosques de pino, y cipres, matorrales, pantanos, milpas, etc. Además pueden ser recolectados durante la mayoría de meses del año.

En esta etapa se obtuvo que los extractos etanólicos de las hojas de S. brownei inhibieron el crecimiento de C. albicans, E. coli, P. aeruginosa, S. typhi, S. flexneri y S. aureus. En estudios anteriores presentó tener efectos inhibitorios contra S. aureus y S. pyogenes; en el presente estudio se pudo confirmar los resultados obtenidos para S. aureus pero no para S. pyogenes.

En investigaciones realizadas anteriormente, T. filifolia presentó efecto inhibitorio sobre S. typhi, S. flexneri y dermatofitos. En la presente investigación solamente se pudo confirmar la actividad inhibitoria contra T. rubrum.

Para P. australis no se han reportado estudios realizados anteriormente sobre esta especie. En el presente estudio se pudo demostrar que su actividad antimicrobiana fue la misma que para S. brownei.

Para el caso de los hongos se obtuvo que solamente T. rubrum fue inhibido por los extractos de las tres plantas en estudio.

En la segunda fase se determinó el mejor disolvente para extraer la mayor cantidad del principio activo de los órganos que presentaron inhibición en la fase de tamizaje, tomándose para ello las hojas de cada planta, las cuales se maceraron con tres disolventes de diferente polaridad (agua, diclorometano y etanol al 80%). El etanol al 80% demostró ser el mejor disolvente.

En la tercera fase se determinó la CIM para lo cual se

utilizaron las mismas técnicas que en las fases de tamizaje y selección del mejor disolvente. Como resultados se obtuvo una CIM de 8mg/ml para bacterias y C. albicans y de 2.5mg/ml para T. rubrum.

Entre las principales causas de las diferencias entre los resultados obtenidos anteriormente y los del presente estudio se encuentran: el lugar donde se llevó a cabo la recolección, de las plantas, etapa de floración, disolventes utilizados para la extracción del principio activo, y el uso de microorganismos de diferente cepas. Además de esto, en los trabajos realizados anteriormente se utilizó la técnica de difusión en agar según Bauer-Kirby, donde la difusión de la muestra podría no ser lo suficientemente homogénea, ya que en esta técnica el extracto se coloca sobre el medio de cultivo usando un disco, un cilindro o una cavidad como reservorio. La muestra entra en contacto con el medio inoculado con el microorganismo, y después de la incubación se mide el diámetro de inhibición (zona clara alrededor del reservorio). Así mismo para dicha inoculación del microorganismo se requiere que ésta haya alcanzado una turbidez de 0.5 del patrón de MacFarland en donde puede existir cierto porcentaje de error que den como resultados falsos positivos o negativos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se tiene que los extractos de las tres plantas investigadas presentaron actividad inhibitoria contra al menos un microorganismo, quedando confirmada la primera hipótesis. Se demostró además

que las hojas presentaron mayor actividad inhibitoria que las raíces, ya que estas últimas solo inhibieron el crecimiento de T. rubrum confirmándose de esta forma la segunda hipótesis planteada en el presente estudio.

## 10. CONCLUSIONES

1. Las tres plantas en estudio presentaron actividad antimicrobiana contra al menos un microorganismo.
2. Las hojas presentaron mayor actividad antimicrobiana que las raíces.
3. Los extractos etanólicos de *P. australis* y *S. brownei* inhibieron el crecimiento de *C. albicans*, y *E. coli*, *P. aeruginosa*, y *S. typhi*, *S. flexneri*, y *S. aureus*.
4. *S. pyogenes*, *A. flavus*, *E. floccosum*, y *M. gypseum* no fueron inhibidos por ninguno de los extractos vegetales.
5. *T. rubrum* fue inhibido por los extractos etanólicos de tres plantas en estudio.
6. El mejor disolvente que extrae la mayor cantidad del principio activo vegetal antimicrobiano es el etanol al 80%.
7. La CIM de *P. australis* y *S. brownei* para las bacterias y *C. albicans* fue de 8 mg/ml.
8. La CIM de *P. australis*, *S. brownei* y *T. filifolia* para *T. rubrum* fue de 2.5 mg/ml.

## 11. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios in vitro similares al presente, utilizando plantas recolectadas en otras áreas geográficas y en diferentes épocas del año.
2. Efectuar un estudio de espectro antimicrobiano de los géneros Plantago, Tagetes y Satureja.
3. Estudiar la toxicidad de los extractos de los diferentes órganos vegetales.
4. Investigar otras propiedades farmacológicas que permitan conocer mejor la actividad biológica de estas plantas y su forma de interacción con otros órganos y sistemas, tales como actividad diurética, espasmolítica, sedante, antiinflamatoria, cicatrizante y expectorante.
5. Realizar estudios in vivo para comprobar la eficacia de estas plantas en el tratamiento de infecciones respiratorias, gastrointestinales e infecciones causadas por hongos.
6. Elucidar el principio activo causante de la actividad antimicrobiana.

## 12. REFERENCIAS

1. Villatoro EM. Etnomedicina en Guatemala. Guatemala: Centro de Estudios Folklóricos, Universidad de San Carlos, 1984. 316p.
2. Marroquín, AE. Contribución al estudio farmacológico de Tagetes lucida como antiespasmolítico. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1981. 39p.
3. Cano JO. Susceptibilidad 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.
4. 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) 1985. 46p.
5. 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. 39p.
6. Alcántara MR. Actividad antimicrobiana del género Tagetes. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1987. 39p.

7. Cáceres A. Actividad antimicrobiana de plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: Resumen del III Seminario mesoamericano de etnofarmacología y II congreso de medicina vegetal popular. Universidad de Costa Rica. San José de Costa Rica. 1989. 126p.
8. Cáceres A et al. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. J Ethnopharmacol 1990. 30: 55-73.
9. Cáceres A et al. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening for the antimycotic activity of 44 plant extracts. J Ethnopharmacol 1991. 31: 263-276.
10. Cáceres A et al. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against Gram-positive bacteria. J Ethnopharmacol 1991. 31: 193-208.
11. Freire AV. Resultados preliminares del estudio del género Tagetes en Guatemala. Guatemala: Memorias I Seminario Mesoamericano de Etnofarmacología y III Nacional de Medicina Tradicional. 1987. pp 143-144.
12. Nash DL, Williams LD. Flora of Guatemala. fieldiana: Botany 1976. 24(12).
13. Morton JF. Atlas of Medicinal Plants of Middle America. USA. Charles Thomas publishers. 1981. 1420p.
14. Guzmán DJ. Especies útiles de la flora salvadoreña. San Salvador. Ministerio de Educación. 1975. 703p.

15. Martínez M. Las Plantas Medicinales de México. 54a. ed. México. Editorial Botas 1969. 656p.
16. Clewel AF. Las compuestas de Honduras. Ceiba 1975. 19: 230-231.
17. Fichas populares sobre plantas medicinales. 1a. serie (No. 1-40) 2a. ed. Publicación conjunta CEMAT y FARMAYA. Guatemala. 1990. 206p.
18. Standley PC, Williams LD, Nash LO. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany 1970. 24(12).
19. Johnners L, Gentry JR, Standley PC. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany. 1974. 24(10).
20. Zinsser R. Microbiología. 17 ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana 1983. 1413p.
21. Donadieu Y. Honey in natural therapeutics. 2a. ed. Juntel AG. Trad. Paris. Librairie Maloine SA. 1983. 47p.
22. Sonewirt A. Jarret L. Métodos diagnósticos de laboratorio clínico. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana 1983. 2240p.
23. Koneman EW et al. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas a color. 1983. 533p.
24. Lennette E et al. Manual of Clinical Microbiology. 4a. ed. Washington. American Society for Microbiology. 1991. 1949p.
25. Bernard D et al. Tratado de Microbiología. 2a. ed. España 1980. 1559p.
26. Finegold SM, Martin WJ. Diagnóstico Microbiológico de Bailey-Scott. Buenos Aires: Editorial Médica

- Panamericana. 1982. 670p.
27. Pelczar J et al. Microbiología. Editorial Mac Graw-Hill. 1982. 505p.
  28. Edelman R, Levine M. Summary of Workshop on Enteropathogenic E. coli. J Infect Dis 1983; 147; 1108-1118.
  29. Karch R, Heesemann J, Lauf R. Phage Associated Cytotoxin Production by Enteroadhesiveness of Enteropathogenic E. coli Isolated from Infants with Diarrhea in West Germany. J Infect Dis 1987; 155: 707-715.
  30. Sonnenwirth AC. Bacilos entéricos y otras bacterias Gram negativo. 773-804. En Davis BD et al. Tratado de Microbiología. 2a. ed. Barcelona: Salvat. 1983. 1559p.
  31. Kelly MT, Brenner DJ, Farmer JJ. Enterobacteriaceae. 263-276. (In Lennet E et al. Manual of Clinical Microbiology). 4a. ed. Washington. American Society for Microbiology, 1991. 1949p.
  32. Connat NF et al. Micología. 3a. ed. Colchero F. Trad. México: Editorial Interamericana. 1972. 592p.
  33. Rippon JW. Medical Mycology. Patogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 2a. ed. Philadelphia. WB. Saunders Company. 1982. 842p.
  34. Logeman HE. Incidencia dermatofítica en Guatemala y actualización de Micología Médica. Guatemala: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. I y III Congreso Nacional de Micología. Memorias. 1983 y 1986. 220p y 218p.
  35. Ríos JL, Recio Mc, Villar A. Screening methods for

- natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J Ethnopharmacol* 1988. 23: 127-149.
36. Washington JA. Susceptibility tests: diffusion test producers. P. 978-987. (In Lennette E: et. al. Manual of Clinical Microbiology), 4 ed. Washington American Society for Microbiology 1991. 1149 pl.
37. Hoh RJ. Laboratory test of antifungal drugs. *J Clin Path* 1974. 28: 767-774.
38. Mitscher LA. et. al. A modern look at folkloric use of anti-infective agents. *J nat prod* 1987. 50: 1025-1040.
39. Vanbreuseghem R, De Vraey, Takashio M. Production of macroconidia by Microsporium ferrugineum Ota 1922. *Sabouraud*. 1970. 7: 252-256.
40. MacRae WD, Hudson JB, Towers GH. Studies on the pharmacological activity of Amazonian euphorbiaceae. *J Ethnopharmacol* 1988. 22: 143-172.

13. ANEXOS

Patrón que se utiliza para inocular bacterias y hongos en la confirmación de la actividad antimicrobiana.

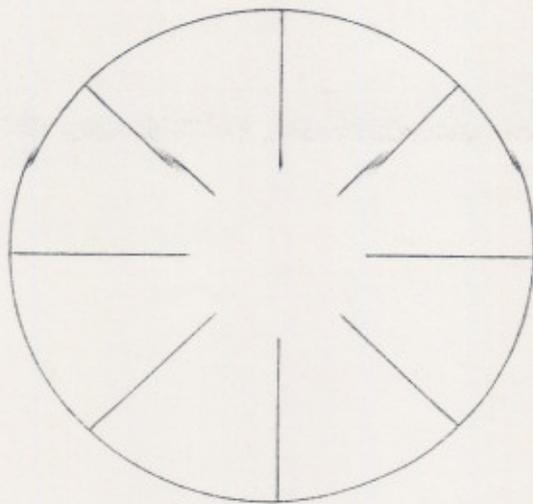


Fig. No. 1A Patrón de ocho partes iguales con una zona clara en el centro para bacterias.

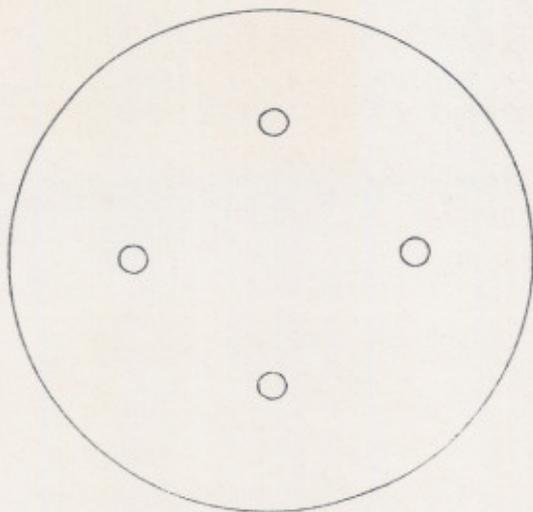
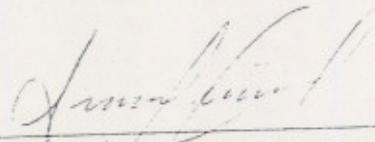
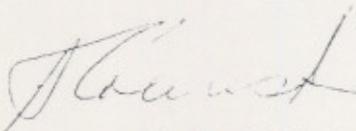


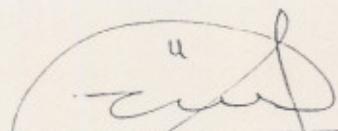
Fig. No. 1B Patrón para dermatofitos.



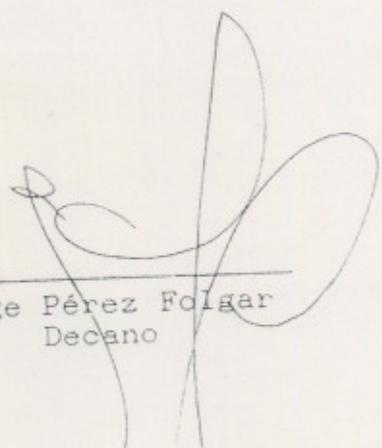
Ana Soraya Cojulún Cifuentes  
Tesisista



Lic. Armando Cáceres Estrada  
Asesor



Lic. Gerardo Arroyo Catalán  
Director



Lic. Jorge Pérez Folgar  
Decano

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central