

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

CONFIRMACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE
TRES ESPECIES DEL GENERO *Gnaphalium* (*G. viscosum*,
G. stolonatum, *G. stramineum*).

Informe de tesis

presentado por

María Raquel Martínez Quevedo

Para optar al título de

QUIMICO BIOLOGO

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Guatemala, Agosto de 1996.

Dh

06

T (1756)

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

Decano:	Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
Secretaria:	Licda. Ana Fortuny de Armas
Vocal I:	Lic. Miguel Angel Herrera Gálvez
Vocal II:	Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
Vocal III:	Lic. Rodrigo Herrera San José
Vocal IV:	Br. Ana María Rodas Cardona
Vocal V:	Br. Hayro Oswaldo García García

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

AGRADECIMIENTOS

- A: Lic. Armando Cáceres Estrada, por su asesoría y constante apoyo brindado durante la elaboración de este trabajo.
- A: Licda. Elsa Jauregui, por su comprensión, ayuda y especial atención a los problemas en el desarrollo de la parte experimental de la tesis.
- A: Laboratorio y droguería de productos fitofarmacéuticos **FARMAYA**, por haberme permitido hacer uso del equipo e instalaciones para la realización de la parte experimental de tesis y al programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo **CYTED**, por la metodología y cepas proporcionadas.
- A: Todas las personas que, en una u otra forma colaboraron en la realización de esta tesis.

INDICE

	Pag.
1 RESUMEN	1
2 INTRODUCCION	3
3 ANTECEDENTES	4
3.1 Historia del uso de las plantas medicinales en Guatemala.	4
3.2 Generalidades sobre los microorganismos en estudio.	5
3.3 Información etnobotánica	17
3.4 Estudios previos realizados en Guatemala sobre la actividad antimicrobiana de las especies del género <i>Gnaphalium</i> en estudio	20
3.5 Sensibilidad antimicrobiana <i>in vitro</i>	21
4 JUSTIFICACIONES	23
5 OBJETIVOS	24
6 HIPOTESIS	25
7 MATERIALES Y METODOS	26
7.1 Universo de trabajo	26
7.2 Muestra	26
7.3 Medios	26
7.4 Procedimiento	27
7.5 Diseño Estadístico	32
8 RESULTADOS	34
9 DISCUSION DE RESULTADOS	41
10 CONCLUSIONES	44
11 RECOMENDACIONES	45
12 REFERENCIAS	46

1. RESUMEN

Se llevó a cabo la confirmación de la actividad antibacteriana de tres especies de *Gnaphalium* conocidas popularmente como Sanalotodo, utilizadas ampliamente para curar diversos males. Se ensayaron dos órganos de cada especie contra seis cepas bacterianas y cuatro fúngicas.

El estudio se llevó a cabo en tres fases, en la primera se realizó el tamizaje antimicrobiano y antimicótico de los extractos etanólicos (etanol al 50 %) a una concentración de 10 mg/ml, seleccionándose la hoja y la flor de *Gnaphalium stolonatum* como la única planta con actividad antibacteriana y la hoja y flor de las tres especies de *Gnaphalium* por su actividad antimicótica.

De la siguiente fase se dedujo cuál era el mejor disolvente que extraía el principio activo responsable de la actividad antibacteriana y antimicótica, siguiendo un procedimiento similar que en el tamizaje con la variante que los disolventes utilizados fueron, etanol, agua y diclorometano. Se trabajó con los microorganismos más susceptibles observados en la fase anterior. Con agua se obtuvo mejores resultados para bacterias, mientras que para hongos el mejor disolvente fue el diclorometano.

Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos con los microorganismos que fueron inhibidos obteniéndose que el extracto etanólico y acuoso de la flor y hoja de *G. stolonatum* inhiben a *S. aureus* a una concentración de 10 mg/ml y determinándose una CIM de 2.5 mg/ml para el caso de el extracto con diclorometano de la hoja de *Gnaphalium viscosum* para *E. floccosum*.

2. INTRODUCCION

Actualmente en Guatemala se han realizado estudios respecto a la actividad antibacteriana de las flores del género *Gnaphalium*, comprobándose la efectividad de varias especies contra *S.aureus* y otros microorganismos.

Por tal motivo en este estudio se demostró el efecto antibacteriano y antimicótico, *in vitro*, que poseen todos los órganos de las plantas del género *Gnaphalium* en estudio (*G. viscosum*, *G. stramineum* y *G. stolonatum*), contra cinco cepas bacterianas y cuatro fúngicas, (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* enteropatógena, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Epidermophyton floccosum*, *Mycrosporium gypseum* y *Trichophyton rubrum*), las cuales constituyen los principales agentes etiológicos de infecciones respiratorias, intestinales y dérmicas en seres humanos.

Se pretende confirmar la actividad antimicrobiana y antifúngica de los extractos de tres especies de *Gnaphalium* con el método de Mitscher para bacterias y por la técnica de MacRae para hongos, previo a un estudio de tamizaje el cual evaluó la actividad antimicrobiana de las tinturas etanólicas obtenidas de cada órgano de las plantas, determinándose luego el mejor disolvente y la concentración inhibitoria mínima.

3. ANTECEDENTES

3.1 Historia del uso de las plantas medicinales en Guatemala:

El uso de plantas medicinales en Guatemala es tan extenso como ancestral, pues se considera resabio de la cultura maya.

Durante el florecimiento de la cultura maya en los siglos X - XII de nuestra era, la magia y la medicina siempre estaban asociadas, se creía que las enfermedades procedían de una causa mística. Lentamente fue surgiendo una medicina naturista y empírica, descubriéndose propiedades curativas de varias plantas (1).

Los Mayas ampliaron conocimientos sobre la flora de las tierras que habitaron, logrando seleccionar y aprovechar todo aquello que le descubrían propiedades terapéuticas. El tabaco era una de las plantas utilizadas por los mayas para curar enfermedades de la piel, mordeduras de serpiente e infecciones urinarias (2).

Indistintamente, muchas plantas eran usadas para una sola enfermedad, pero en general se puede decir que el uso del pericón como diurético, el higuerrillo como purgante, el apazote y marrubio como hemagogos, eran las plantas que predominaban (3). Para curar heridas usaban el yapoquepe (*Nicotiana tabacum*) y el ceportal-suchil (*Tagetes erecta*) (4).

Actualmente el uso de plantas medicinales para el tratamiento de las diversas afecciones es común en

Guatemala, alcanzando condiciones de distribución nacional, ya que son utilizadas tanto por la población indígena como por la ladina.

A pesar de la tradición tan arraigada y el vasto empleo de las plantas medicinales por los diferentes grupos étnicos del país, la información al respecto no se tiene disponible en su totalidad, ya que dicho conocimiento es transmitido verbalmente de generación en generación. Existen algunos trabajos que aportan información sobre el tema, tal es el caso del estudio realizado por el Instituto Indigenista Nacional de tipo popular (5).

El empleo de plantas medicinales, es muy extenso en el pueblo guatemalteco, siendo esto la principal fuente de información con la que se cuenta para conocer la forma en que la población hace uso de éstas para resolver sus problemas de salud, sobre todo en el área rural (6).

3.2 Generalidades sobre los microorganismos en estudio:

3.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Comunmente, *P. aeruginosa* es una de las especies de *pseudomonas* asociadas con enfermedades humanas, puede infectar quemaduras, heridas, vías urinarias y el tracto respiratorio inferior. Sobrevive y se multiplica en medios húmedos con el mínimo de materia orgánica. Se le atribuyen del 5 al 15 por ciento de las infecciones hospitalarias.

P. aeruginosa es un bacilo en forma de bastón gramnegativo polar, monotríco, movilidad positiva que se presenta aislado, en pares o en cadenas cortas. Es oxidasa positiva, lisina y ornitina descarboxilasa negativa, arginina dihidrolasa positiva y utiliza oxidativamente la glucosa en medio OF. Frecuentemente se aíslan cepas mucoides, las colonias tienden a extenderse y despiden un olor característico. La mayor parte de las cepas liveran piocianina y fluoresceína (pioverdina) lo cual confiere a la colonia su característico color azul verdoso. La mayoría de las cepas crecen a 42°C en agar tripticasa y en medios selectivos que contengan bromuro de cetiltrimetilamina (cetrimide).

Los aminoglucósidos gentamicina, tobramicina y amikacina son las drogas de elección para el tratamiento de infecciones causadas por *Pseudomonas*, encontrándose resistentes a la kanamicina. Algunas de las cefalosporinas de tercera generación tienen actividad contra *P. aeruginosa* (7).

3.2.2 *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus* pertenece a la familia *Micrococcaceae*, se divide en varias especies siendo las más importantes *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*. Esta división está basada en la producción de coagulasa, termonucleasa, toxina y la utilización del manitol, requerimientos nutricionales y sensibilidad a la novobiocina.

Microscópicamente el *S. aureus* se observa como cocos grampositivo, en pares, cadenas cortas o en racimos irregulares, es inmóvil y en su aislamiento en forma típica el microorganismo produce un pigmento amarillo dorado. Por lo general las colonias son opacas, circulares, lisas y enteras, de consistencia mantecosa. Crece en agar sangre, tripticasa soya o agar nutritivo, pero desarrolla colonias más grandes en agar sangre en el cual se puede observar su actividad beta hemolítica, la mayor parte de cepas de *S. aureus* fermentan el manitol y pueden tolerar concentraciones elevadas de sal, son resistentes a la polimixina. La prueba de la coagulasa es una de los mejores criterios empleados para diferenciar *S. aureus* (8).

Los estafilococos son habitantes naturales del cuerpo. Como patógenos causan muchos procesos supurativos que van desde forúnculos, abscesos y septicemias mortales. Muchas ocasiones son invasores secundarios en peritonitis, cistitis y meningitis. Como saprófitos, son obicuos, pues lo mismo viven en la piel, nariz, boca e intestinos normales. Las infecciones ocurren cuando penetran en el cuerpo por algún traumatismo (9).

3.2.3 *Escherichia coli* enteropatógena

Actualmente las cepas de *E. coli* que causan diarrea en el hombre se dividen en cinco grupos: Enterotoxigénicas, Enteroinvasiva, Enterohemorrágica, Enteropatógena y Enteroadherente.

E. coli enteropatógena ocasiona fiebre, malestar general, vómitos y diarrea con cantidad abundante de moco, pero sin sangre, los cuadros de diarrea persisten hasta catorce días. Los mecanismos a través de los cuales provoca diarrea incluye adherencia directa a la mucosa intestinal y la elaboración de citotoxina similar a la producida por el bacilo de Shiga (10-17).

Las cepas de *E. coli* enteropatógena son susceptibles a la mayoría de los antimicrobianos utilizados en el tratamiento de infecciones por microorganismos gramnegativo. Sin embargo, parece ser que el mejor tratamiento para la diarrea es la normalización del equilibrio electrolítico (8).

3.2.4 *Salmonella typhi*

Es el agente causal de fiebre tifoidea, enfermedad severa debilitante y de alto riesgo que se caracteriza clínicamente por malestar general, anorexia cefalea y fiebre. Puede o no haber diarrea (11).

El hombre es el único huésped conocido de *S. typhi* y la transmisión ocurre por alimentos o agua contaminada por individuos enfermos o portadores sanos. El mecanismo de patogenicidad está dado por invasividad, enterotoxigenidad, endotoxigenidad y antígenos de superficie (8).

S. typhi es una bacteria gramnegativa que presenta una actividad bioquímica característica en los hidratos de carbono, produce pequeñas cantidades de sulfuro de hidrógeno, y no produce gas en agar KIA o HTA (Agar hierro de Kligler y

Agar triple azucarado). Es anaerogénico y citrato negativo. El procedimiento que se emplea para su identificación por el examen serológico, es la reacción de aglutinación en portaobjetos, para la cual se utiliza una suspensión concentrada de la células en solución fisiológica (7).

El cloranfenicol y la ampicilina son las drogas de elección para la fiebre tifoidea. Sin embargo no debe administrarse cloranfenicol en el tratamiento de portadores crónicos de *S. typhi* (8,12).

3.2.5 *Shigella flexneri*

El género *Shigella* se divide en cuatro grupos que incluyen *S. dysenteriae*, *S. boydii*, *S. sonnei* y *S. flexneri*.

S. flexneri, es un microorganismo que provoca muerte celular ya que tiene la capacidad de invadir las células epiteliales de la mucosa del intestino delgado, donde a su vez prolifera (8).

En su forma clínica más leve, las infecciones causadas por organismos del género *Shigella* se manifiestan por deposiciones líquidas, malestar general y cólicos. En los casos graves es común fiebre alta, cólicos abdominales intensos, tenesmo y disentería (13).

Las *Shigella* son bacilos gramnegativo, inmóviles, que mide de 0.4 a 0.6 por 1.0 a 3.0 μm . Su desarrollo óptimo es a 37°C en condiciones de aerobiosis. Estas no producen sulfuro de hidrógeno, fermentan a los carbohidratos, a excepción de la lactosa, produciendo ácido sin gas (8).

Generalmente las shigelas son susceptibles a la ampicilina, tetraciclina, estreptomocina, sulfamidas, kanamicina, cloranfenicol y colistina, sin embargo, se han reportado cepas resistentes (14, 15).

3.2.6 *Streptococcus pyogenes*

Los estreptococos son organismos grampositivo, de forma esférica a ovoide de 2 μ m de diámetro. La división celular ocurre en un plano, dando como resultado pares o cadenas. Son organismos no fermentativos y catalasa negativo. Son anaerobios facultativos.

S. pyogenes forma colonias en agar sangre de color grisáceo y de aproximadamente 0.5 mm de diámetro. Están rodeadas de beta hemólisis, la cual sirve de marcador primario de aislamiento. La prueba de bacitracina, también es útil para distinguirlo de los *Streptococcus* beta-hemolíticos.

Muchas cepas de *S. pyogenes* producen varias hemolisinas, entre las cuales las más importantes son la estreptolisina O y la estreptolisina S, que son responsables de la reacción beta-hemolítica en agar sangre.

La estreptolisina O, es tóxica para eritrocitos y leucocitos. Luego de una infección faríngea o sistémica, esta toxina es un antígeno potente.

La estreptolisina S es una toxina no antigénica, ejerce acción lítica sobre globulos rojos, blancos y protoplasmas bacterianos.

S. pyogenes es causa común de faringitis aguda en el tracto respiratorio superior. Las infecciones por este microorganismo pueden causar secuelas graves como fiebre reumática y glomerulonefritis aguda (16).

El tratamiento de elección es la penicilina benzatina intramuscular en una dosis única o penicilina V oral durante diez días. Las tetraciclinas y sulfonamida están contraindicadas debido a la alta resistencia de los estreptococos y la falta de prevención de fiebre reumática (8).

3.2.7 *Candida albicans*

Desde el apareamiento de antibióticos de amplio espectro, corticosteroides y agentes antitumorales, las infecciones por levaduras son las más comunes que afectan a los humanos (17).

Los microorganismos del género *Candida* son miembros de la microbiota de la piel, mucosas y tracto gastrointestinal. Durante el nacimiento y poco después, todos los humanos adquieren y son colonizados por especies de *Candida*, por ejemplo: *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis* y *C. guilliermondi* (8).

Las levaduras o blastosporas de *C. albicans*, son redondas, ovales u oblongadas, de pared delgada y miden 2.5 por 3 a 4 μm , aparecen solas, en grupos o en cadenas. En medios nutricionales pobres desarrollan abundantes pseudohifas. La producción de tubos germinales y

clamidosporas esféricas son características útiles para su identificación. Su crecimiento es aeróbico y en 24 a 36 horas aparecen colonias pequeñas que llegan a medir 1.5 a 2mm en agar Sabouraud. Las colonias son blancas pero pueden cambiar a crema o beige con el tiempo.

La candidosis es una infección primaria o secundaria producida por miembros del género *Candida*, especialmente *C.albicans* que afecta piel, uñas, mucosas y órganos internos (17). La producción de enzimas (hidrolíticas, proteolíticas y queratolíticas), toxinas y su capacidad de adherencia constituyen mecanismos por los cuales *C.albicans* produce patogenicidad, considerándosele por tal razón microorganismo oportunista y patógeno (9). La fluorocitocina es un agente antimicótico que se usa sólo o en combinación con anfotericina B. Se utiliza en candidosis sistémicas y otras micosis profundas, aunque tiene mejor actividad en levaduras con las cuales ejerce la función de fungistático y fungicida. Su acción se basa en la síntesis alterada del ADN fúngico (18, 19).

El problema más serio de las candidosis es el tratamiento, ya que existen drogas altamente específicas tales como los derivados triazólicos (fluconazol, terconazol) y la anfotericina B, pero son comunes las recaídas si no se reducen o eliminan los factores de oportunismo que dieron origen a estas infecciones (20).

3.2.8 *Epidermophyton floccosum*

El género *Epidermophyton* se caracteriza por no infectar el pelo, solamente piel y uñas. En cultivo sus colonias son aterciopeladas o polvorientas, con surcos radiales centrales y color amarillo verdoso (21).

Microscópicamente este género se caracteriza por tener macroconidias largas, fusiformes u ovales, multiseptadas, que van en grupos de 2 ó 3, su tamaño es de 20 a 40 por 6 a 8 μm . No produce microconidias y se conoce solamente una especie patógena (21, 22).

E. floccosum es un hongo de crecimiento lento, su colonia es regular, abultada en el centro, algodonosa, de aspecto pulverulento de color amarillo verdoso, micelio aéreo. En el reverso se observa pigmento beige con mancha café en el centro. Un extremo puede producir primero un ramillete de micelio blanco y después una colonia de mucho diámetro, produce clamidosporas y macroconidias en forma de mazo unidas a su micelio.

Es un agente común de tiña pedis y tiña manum. Produce prurito en áreas perianales y perineales, es antropofílico, puede ser transmitido de persona a persona por toallas o ropa contaminada (17, 23).

Existen antimicóticos como los ácidos, sales de ácidos grasos y la griseofulvina, que presentan actividad fungistática y fungicida frente al género *Epidermophyton* (24).

3.2.9 *Microsporum gypseum*

El género *Microsporum* ataca la piel, pelo y uñas. Los pelos infectados emiten fluorescencia verde con luz de Wood, identificándose el hongo como una vaina en mosaico de pequeñas esporas en torno al tallo piloso (23). Al examen microscópico este género revela macroconidias equinuladas multiseptadas, variables fusiformes a ovaladas, con paredes gruesas o delgadas. Se advierten también hifas en raqueta o en forma de peine, cuerpos nodulares y clamidosporas (22).

Microsporum gypseum es un hongo de crecimiento rápido con aspecto pulverulento, tiene color pardo claro a ante, algunas cepas desarrollan un micelio aéreo blanco y lanudo. El reverso de la colonia tiene color pardo rojizo a anaranjado.

Al microscopio se observan grandes macroconidias de pared delgada, elipsoides con 4 a 6 tabiques, agrupadas en cadena. En los cultivos primarios se encuentran microconidios unicelulares y pequeñas.

M. gypseum es una especie geofílica que produce tiña esporádica en niños y adultos (23). Antimicóticos naturales y sintéticos como el ácido propiónico, el ácido benzoico, ácido salicílico, los compuestos de azufre y griseofulvina son capaces de inhibir este género (24).

2.2.10 *Trichophyton rubrum*

El género *Trichophyton* ataca pelo, piel y uñas, rara vez invaden tejido subcutáneo y no producen infecciones

sistémicas. Se implantan en tejidos ricos en queratina (23).

En cultivo desarrollan un micelio aéreo algodonoso, granular, polvoriento, veloso, liso o céreo, cuyo color puede ser blanco, rosado o rojo, purpúreo, violeta o anaranjado. Presentan macroconidias delgadas en forma de clava, las microconidias son esféricas, piriformes(25).

T. rubrum presenta un crecimiento lento con colonias planas abultadas en el centro con superficie blanca algodonosa que se torna rosada, puede tener mucho o poco micelio. El 95 por ciento de las cepas poseen pigmento rojo tinto al reverso. Sus microconidias son delgadas en forma de clava, las macroconidias son raras. Es un hongo antropofílico (17).

Es agente común de tiña pedis, tiña cruris, tiña unguium y tiña barbae. Las lesiones clásicas en piel sin pelos son anulares y con escamas, puede observarse también eritema, vesículas o reacciones alérgicas.

Las muestras de pelo, piel o uñas deben cultivarse a temperatura ambiente en medio de Sabouraud con antibiótico. Los microorganismos aislados se identifican sobre la base del aspecto de la colonia (velocidad de crecimiento, textura de la superficie, pigmentación de anverso y reverso) y morfología de las estructuras de reproducción.

Las dermatofitosis pueden tratarse con antibióticos tópicos, como soluciones de tolnaftato, nitrato de miconazol o clotrimazol y griseofulvina que se administra por vía oral durante largos períodos lo que produce anomalías morfológicas, como tumefacción y ramificación en el extremo

en crecimiento de las células jóvenes. Existen además los derivados azólicos como el ketoconazol, terbinafine y el bifonazol-urea los cuales no presentan efectos colaterales por su consumo (8, 20, 24).

2.2.11 *Aspergillus flavus*

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 los pulmones, a menudo con diseminación hematológica a otros órganos. Las áreas infectadas principales son: El oído externo, córnea, senos nasales, bronquios, pulmones y ocasionalmente en la nasofaringe, vagina, útero cavidad pleural, mediastino, huesos y meninges (7).

A. flavus es un microorganismo de virulencia baja que se limita prácticamente a infecciones oportunistas en huéspedes con inmunosupresión o debilitados (26, 27).

Con el colorante de PAS, los hongos se observan en forma de hifas tabicadas de menos de 5 μ m que se ramifican en ángulos agudos.

La infección por *Aspergillus* en un gran porcentaje de los casos afecta a individuos con menos resistencia por padecer tuberculosis, linfomas, leucemia, o por estar sometidos a tratamientos con antibióticos de amplio espectro, esteroides o inmunosupresores. En estas circunstancias la complicación micótica adquiere mayor gravedad (26).

El tratamiento en aspergilosis está enfocado principalmente a la prevención del desarrollo de fibrosis irreversible o bronquiectasia y a reducir la frecuencia y la gravedad del broncoespasmo. Un régimen máximo de broncodilatadores estándar deberá de emplearse(28).

3.3 INFORMACION ETNOBOTANICA

3.3.1 Género *Gnaphalium*.

Dentro del género *Gnaphalium* se conocen más de 100 especies individuales. En Guatemala se conocen 16 especies. Su habitat preferido son pedregales, praderas, orillas de caminos, bosques de pino - encino, bancos de arena, etc. (29).

Se presentan como hierbas anuales o perennes, aromáticas, lanosas, de 20 a 80 cm de altura, hoja simple, alterna, verde a blanquecina, lanceolada, de 2 a 10 cm de largo, pubescente en ambas caras, ápice acuminado, base decurrente, inflorescencia compuesta. Algunas flores internas son hermafroditas, las corolas son amarillas, blancas o lilas.

Los usos medicinales del género *Gnaphalium* están enfocados principalmente en sus flores, las cuales son utilizadas para la inflamación de los riñones, cicatrizar granos y postemias (5). Además son utilizadas para reumatismo, carbunclos, callos, cáncer, tumores, verrugas, fístulas, úlceras. Ampliamente son utilizadas también en las

afecciones del aparato digestivo para la eliminación de gases, dispepsia y facilitar la digestión (30).

3.3.1.1 *Gnaphalium viscosum* HBK

3.3.1.2 Nombre común: Sanalotodo, flor de seda, Sac-moquan, sanatodo.

3.3.1.3 Descripción

Hierba erecta, simple o ramificada, 1 m de alto, tallo tomentoso, pubescente, más o menos viscoso de parte en parte. Hojas abundantes, lanceoladas, agudas, dilatadas en la base, a menudo largas, decurrentes en los tallos, verde encima y fuertemente glandular. Flores compuestas de glomárulos de cabezuelas; involucro campanulado, filarias amarillo pálido, ovaladas o lanceoladas; flores 100 o más por cabezuela. Nativa de Centro América, en matorrales y bosques de pino-encino de 1,100-2,800 metros sobre el nivel del mar.

En Guatemala se han encontrado en los departamentos de Chimaltenango, Chiquimula, Guatemala, Jalapa, Huehuetenango, Quezaltenango, Quiché, Sacatepéquez, San Marcos, Sololá y Zacapa (29).

3.3.1.4 Usos medicinales

La infusión de flores es usada para tratar diarrea, dolores, granos, inflamación renal, afecciones respiratorias, abscesos y paludismo (30). Se le atribuyen propiedades antisépticas, desinflamantes y expectorante (31).

3.3.1.5 *Gnaphalium stolonatum* Blake.

3.3.1.6 Nombre común: Sanalotodo.

3.3.1.7 Descripción:

Planta de 10 - 30 cm de altura, tallos delgados, lanudos, simples, hojas basales oblanceoladas alineares, de 10-40 mm de longitud y de 2 - 4 mm de ancho, inflorescencia amontonada, en un glomérulo subgloboso u ovoide de 1 - 2 cm de diámetro, involucros de 4 - 6 mm de alto, filarias seriadas, corolas pistiladas de 2.5 mm de longitud.

En Guatemala se le ha encontrado en Huehuetenango, San Marcos, Jalapa y Santa Rosa (29).

3.3.1.8 Usos medicinales:

Las flores de ambas especies se usan indistintamente con el nombre de Sanalotodo, como su nombre lo indica se recomienda para diarrea, dolor de estómago, granos, inflamación de los riñones, afecciones respiratorias, abscesos, paludismo, rasquiña, reumatismo, cáncer del estómago (12, 30).

3.3.1.9 *Gnaphalium stramineum* HBK

3.3.1.10 Nombre común: Sanalotodo, flor de seda.

3.3.1.11 Descripción:

Hierba erecta, aromática, tallo solitario rara vez inclinado, cubierto por una pelusilla muy fina. Sus hojas son delgadas, obtusa de 2 a 5 cm de largo y de 0.2 a 0.4 de

ancho, verde oscuro en la parte superior y blanquecina en la parte inferior. Raíces fuertes. Inflorescencia compuesta agrupadas en pequeños glomérulos, involúcos de 4 a 6 mm de alto, filarias brillantes.

Nativa del Norte de América aclimatada en bosques de pino-encino de 1,800-2,400 metros S.N.M. En Guatemala crece en Escuintla, Huehuetenango, Guatemala y Zacapa (29).

3.4 Estudios previos realizados en Guatemala sobre la actividad antimicrobiana de especies del género *Gnaphalium*.

Actualmente el estudio de la acción antimicrobiana de extractos vegetales es un tema de interés en muchos países. En Guatemala se han realizado varios trabajos relacionados al tema.

Juaréz en 1992 demostró que los extractos alcohólicos de flores de *G. stolonatum*, *G. stramineum*, *viscosum* y *brachipterum*, son activos contra *S. aureus*, *S. pyogenes* y *S. pneumoniae* (32).

Estudios de tamizaje de la actividad antibacteriana realizados por Cáceres et al. en 1990 revelan que el extracto alcohólico de flores de *G. stramineum* y *G. viscosum* muestran una marcada actividad antibacteriana. *G. stramineum* contra *S. typhi*, *S. dysenteriae* y *S. aureus*, mientras que *G. viscosum* contra *S. typhi*, *S. flexneri*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* (33). Similares resultados fueron obtenidos por Cáceres A, Samayoa B y Logeman H. en 1990 con extractos etanólicos de la flor de *G. viscosum* y *G. stramineum* (34).

Cáceres *et al.* ensayaron la actividad del género *Gnaphalium* contra *Vibrio cholerae* O1, encontrando una actividad vibriocida positiva a una concentración mínima inhibitoria de 100 ug/ml de las tinturas obtenidas y con los extractos etanólicos a una concentración mínima inhibitoria de 100 ug/ml (35).

3.5 Sensibilidad antimicrobiana *in vitro*

Las propiedades lipofílicas y de solubilidad de algunas muestras hace bastante difícil el estudio de la actividad antimicrobiana de las plantas.

Hasta el momento algunos autores utilizan el diámetro de los halos de inhibición o el peso mínimo del extracto que inhibe el crecimiento del microorganismo para expresar los resultados del tamizaje antimicrobiano.

Algunos factores tales como el volumen del inóculo, composición del medio de cultivo, pH, temperatura de incubación y el método de extracción pueden influir en los resultados (36).

Los principales métodos que se utilizan para determinar la susceptibilidad de un microorganismo a un extracto vegetal comprenden el test de dilución en placa de agar, dilución en tubo y difusión de disco en agar.

Los métodos de dilución requieren una dispersión homogénea de la muestra en agua. Estos son utilizados generalmente para determinar valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) de extractos. Permite conocer con

exactitud la sensibilidad del microorganismo a una concentración conocida del antibiótico. El grado de inhibición está relacionado con la turbidez del medio, la cual se mide espectrofotométricamente. Al utilizar la dilución en agar, una cantidad dada de la sustancia se mezcla con el agar, al endurecer se le siembra el microorganismo. La sustancia tiene actividad antimicrobiana si no hay crecimiento bacteriano (37).

El método de difusión de disco en agar se realiza colocando círculos de papel filtro Wathman No.1 impregnados con los extractos de las plantas en cajas de agar nutritivo previamente inoculados, incubadas las cajas por 24 horas a 37°C, se mide entonces el diámetro de la zona de inhibición de las bacterias. Para hongos dermatofitos se preparan suspensiones de esporas de cultivos maduros y alícuotas de éstas se transfieren a agar Sabouraud mezclado con el extracto de la planta en ensayo, las cajas se incuban a 20°C por 14 días, seguidamente se les mide el diámetro a las colonias (38, 39).

4. JUSTIFICACIONES

Actualmente en la medicina verde han surgido una gama de biopreparados bacterianos utilizados para el tratamiento y profilaxis de enfermedades infectocontagiosas en la salud humana.

El género *Gnaphalium* comprende varias especies, las cuales por estudios realizados en México y actualmente en Guatemala, han demostrado que las flores de dichas plantas poseen ciertas propiedades antibióticas.

Por lo anterior, cada día se hace más necesario el uso de plantas como medicina para diversas enfermedades y el propósito en esta oportunidad es el de realizar estudios con otros órganos de estas plantas y comprobar su acción utilizando una metodología que permita confirmar y validar de esta manera en forma científica el uso popular de estas plantas en el tratamiento de infecciones.

5. OBJETIVOS

5.1 General:

Validar científicamente el efecto antimicrobiano de plantas curativas que se utilizan popularmente en Guatemala.

5.2 Específicos:

5.2.1 Determinar el espectro de inhibición microbiana de tres especies del género *Gnaphalium* (*G. viscosum*, *G. stolonatum* y *G. stramineum*)

5.2.2 Determinar el órgano de la planta del género *Gnaphalium* en estudio, que posee el mayor efecto inhibitorio.

5.2.3 Determinar la concentración inhibitoria mínima de los extractos que tengan actividad antimicrobiana.

5.2.4 Determinar cuál es el solvente más adecuado para la extracción del principio activo de las plantas del género *Gnaphalium* en estudio.

6. HIPOTESIS

La mayor actividad antimicrobiana se encuentra en el extracto acuoso obtenido de las flores de las tres especies del género *Gnaphalium* (*G. viscosum*, *G. stolonatum*, *G. stramineum*)

7. MATERIALES Y METODOS.

7.1 Universo de trabajo:

Está constituido por todas las especies del género *Gnaphalium* que demostraron tener actividad antibacteriana sobre las cepas estudiadas (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi*, *S. flexneri*, *S. pyogenes*, *C. albicans*, *A. flavus*, *E. floccosum*, *M. gypseum* y *T. rubrum*).

7.2 Muestra

Extractos de cada uno de los órganos de las plantas que pertenecen a las tres especies del género *Gnaphalium* (*G. viscosum*, *G. stolonatum*, *G. stramineum*) en estudio. Estos serán ensayados contra *P. aeruginosa* ATCC 15442, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* enteropatógena ATCC 9637, *S. typhi* INCAP ST-001, *S. flexneri* INCAP 706608, *S. pyogenes* INCAP 90809, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus flavus* A-75 CCQQ, *Epidermophyton floccosum* 761 IGSS, *Microsporium gypseum* M-71 CCQQ, *Trichophyton rubrum* T-3.5 CCQQ.

7.3 Medios

7.3.1 Recursos humanos:

Autor: Br. María Raquel Martínez Quevedo.

Asesor: Lic. Armando Cáceres Estrada.

Colaborador: Ing. Leonel Cruz de la Facultad de Agronomía. Universidad de San Carlos de Guatemala.

7.3.2 Materiales:

7.3.2.1 Equipo y Cristalería:

Balanza analítica

Incubadora

Campana de flujo laminar

Mechero bunsen

Cajas de Petri

Pipetas graduadas de 2,5 y 10 ml.

Varillas de vidrio

Frascos estériles color ámbar de 50 cc.

7.3.2.2 Disolventes, medios de cultivo y suministros

Etanol al 50%

Diclorometano

Sangre de carnero desfibrinizada al 5%

Agar Muller Hinton

Agar Saboraud

Caldo Tripticasa Soya

Papel filtro

Algodón

Gasa

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
BIBLIOTECA CENTRAL

7.4 Procedimiento

7.4.1 Recolección del material botánico

Recolectar las plantas en los departamentos de Sta. Rosa, Chimaltenango, Sacatepéquez, Guatemala y Jalapa. Posteriormente herborizar una muestra, clasificarla con la colaboración del personal técnico-científico de la Facultad

de Agronomía, de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Seguidamente secar a temperatura ambiente por 15 días el resto del material, pulverizarlo para su almacenamiento.

7.4.2 Obtención de las tinturas vegetales

Utilizar 10 g. de materia vegetal y mezclar con 100 ml. de etanol al 50 por ciento, durante tres días. Filtrar con membranas de papel filtro Whatman No.1.

7.4.3 Preparación del medio (método de Mitscher et al. 1972) para bacterias y levaduras. (40)

Preparar 9 ml de agar Muller Hinton y agregar 1 ml del extracto vegetal de cada órgano de las plantas, para *S. pyogenes* utilizar agar sangre de carnero. Agitar suavemente, verterlo en una caja de petri, dejar solidificar e incubar a 35°C durante 24 horas, observar si están libres de contaminación, almacenar a 4°C hasta el momento de su uso.

7.4.4 Preparación del inóculo

Purificar el microorganismo a ensayar e inocular en un tubo con 8 ml de agar tripticasa soya inclinado (ATS), incubar a 35°C durante 24 horas para bacterias y 48 horas para levaduras. Inocular una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5 ml de caldo tripticasa soya (CTS), incubar a 35°C durante 24 horas, en el caso de las bacterias diluir 0.1 ml de la suspensión en 10 ml de solución salina estéril (SSE), en el caso de levaduras 1 ml de la suspensión en 10 ml de SSE.

7.4.5 Demostración de la actividad

Verificar que las cajas con extracto crudo estén libres de contaminación. Inocular 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. Dejar reposar 5 a 10 minutos e incubar a 35°C durante 24 horas.

7.4.6 Interpretación de resultados

Al día siguiente observar el aparecimiento de un crecimiento homogéneo en las zonas de inoculación, interpretar de la siguiente forma:

Si no hay crecimiento (positivo +), alteraciones morfológicas (parcial p), aparecimiento de colonias a lo largo del inóculo (resistencia R), presencia de microorganismos fuera de las inoculaciones (contaminado c).

7.4.7 Preparación del medio para hongos (método Takashio)

Preparar agar Saboraud modificado según la técnica de Takashio para la mayor producción de esporas, inocular los hongos en estudio e incubar a 27°C por 15 días. Agregarles 3 ml de agua estéril a cada tubo, raspar con una varilla de vidrio para hacer una suspensión homogénea del hongo. Con un Vortex mezclar la suspensión durante 1 minuto. Realizar luego un conteo de esporas en una cámara de Neubauer para llevar a una concentración de 300 esporas por ml. Almacenar en viales a 4°C hasta su uso (41).

7.4.8 Preparación del agar-planta para hongos. (técnica de MacRae).

Agregar 13.5 ml del medio Saboraud estéril en tubos de ensayo, aproximadamente a 50°C, estando aún líquido, agregar 1.5 ml del extracto del órgano a ensayar (dilución 1:10). Agregar el agar-planta en cajas de petri estériles, esperar a que solidifique, luego guardar en incubadora a 27°C durante 24 horas (38).

7.4.9 Demostración de la actividad

Perforar cuatro pocitos de aproximadamente 5 mm de diámetro en el agar planta, inocular 30 ul de la suspensión de esporas preparada previamente, guardar en incubadora a 27°C durante 24 horas, posteriormente dar vuelta a las cajas de petri e incubar a 27°C durante 15 días.

7.4.10 Interpretación de resultados

Después del período de incubación (15 días), medir los milímetros de crecimiento de las colonias alrededor de cada inóculo. Calcular el porcentaje de inhibición de crecimiento de las colonias control con el de las colonias en cajas con agar y planta. Tomar como positivos aquellos órganos de la planta que reduzcan el diámetro de la colonia control en un 75 por ciento.

7.4.11 Selección del mejor disolvente

Una vez determinado el órgano con mayor actividad

antimicrobiana, se determinó cuál es el disolvente que mejor lo extrae, realizando para ello extracciones con solventes de diferente polaridad.

Para conocer cuál es el mejor disolvente para la extracción del principio activo responsable de la acción antimicrobiana de las plantas a ensayar, se realizaron extracciones con tres disolventes: Agua, etanol y diclorometano, para lo cual se utilizó 50 g de materia vegetal seca y 100 ml de cada disolvente (dil. 1:10), colocar el material vegetal en una botella con capacidad de 500 ml, sin fondo y pasar los disolventes ya mencionados en el orden siguiente: primero el diclorometano, luego el etanol al 80 por ciento y por último el agua estéril.

Concentrar cada extracto en un rotavapor hasta alcanzar consistencia de miel, finalmente resuspender cada extracto en su respectivo disolvente para obtener una dilución 1:10, almacenar en frascos color ámbar hasta el momento de prueba.

El mejor disolvente se probó realizando el mismo procedimiento empleado para el tamizaje, utilizando el o los órganos que demostraron mayor actividad.

7.4.12 Determinación de la concentración inhibitoria mínima

Se evaluó el órgano con el disolvente que demostró mayor actividad contra tres concentraciones (10, 50, 100 µl) para bacterias y levaduras. Ensayar los extractos con una bacteria Gram-positivo, una Gram-negativo (la que resulte más inhibida) y *Candida sp.* En caso de los hongos ensayar los extractos con el hongo que presente mayor inhibición.

7.5. Diseño Estadístico

7.5.1. Diseño para bacterias

El análisis estadístico de los resultados se realizó por medio de un diseño de bloques al azar. Se inició la parte experimental con un tamizaje de la tintura de cada órgano de la planta para lo cual se realizó una distribución de las posiciones de cada microorganismo en forma aleatoria para las cuatro repeticiones a realizar.

7.5.2. Diseño para dermatofitos

Para el ensayo antimicótico se realizaron cuatro repeticiones aleatorias por extracto. En las cajas de petri conteniendo el medio de cultivo y el extracto a ensayar; se perforaron cuatro pozos en los que se depositó la suspensión de esporas del microorganismo, trabajándose de igual forma un ensayo control de crecimiento en el cual sólo se inocula el microorganismo, en cuatro repeticiones.

Con cuatro repeticiones por ensayo, se tiene un nivel de error alfa de 0.10, para concluir que el resultado de los ensayos es positivo.

El diseño experimental que se utilizó es un diseño de bloques en el que cada uno de los extractos y control forman los bloques, distribuyéndose aleatoriamente las cuatro inoculaciones del microorganismo.

Unidad de medida: en este ensayo se determinará como unidad

de medición el crecimiento del microorganismo, en el cual hay una probabilidad de éxito cuando el porcentaje de inhibición sea mayor del 75 por ciento, y una probabilidad de fracaso cuando el porcentaje de inhibición sea menor del 75 por ciento, donde $H_0: p = q = 0.5$ (la planta no tiene efecto inhibitorio) y $H_a: p > 0.5$ (la planta sí tiene efecto inhibitorio).

El análisis de resultados se trabajará con una prueba de hipótesis binomial, en el que si $P < 0.1$, se puede rechazar la hipótesis que el resultado de los ensayos es negativo, por lo que se podrá concluir que el extracto tiene efecto inhibitorio sobre el crecimiento del microorganismo.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

8. RESULTADOS

8.1 Tamizaje antimicrobiano :

En la primera parte del estudio se realizó un tamizaje con extractos etanólicos (etanol al 50%) contra los microorganismos a estudiar para determinar los órganos que muestran mayor actividad antimicrobiana. Se escogieron las hojas y flores de tres especies del género *Gnaphalium*, las cuales mostraron la siguiente inhibición a una concentración de 10 mg/ml (Tabla 1).

TABLA 1

Tamizaje de la actividad antimicrobiana vegetal de
Gnaphalium stolonatum, *G. stramineum*, *G. viscosum*

ORGANO	BACTERIA						
<i>G. stolonatum</i>	A	B	C	D	E	F	G
Hoja	+	+	+	+	+	+	+
Tallo	-	-	+	+	+	-	-
Flor	-	-	-	+	-	-	-
Raíz	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. stramineum</i>							
Hoja	-	-	-	-	-	-	-
Tallo	-	-	-	-	-	-	-
Flor	-	-	-	-	-	-	-
Raíz	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. viscosum</i>							
Hoja	-	-	-	-	-	-	-
Tallo	-	-	-	-	-	-	-
Flor	-	-	-	-	-	-	-
Raíz	-	-	-	-	-	-	-

A = *E. coli*

B = *S. flexneri*

C = *S. typhi*

D = *P. aeruginosa*

E = *S. aureus*

F = *S. pyogenes*

G = *C. albicans*

(+) = Inhibición

(-) = Resistencia

Los resultados obtenidos en la fase de tamizaje a una concentración de las tinturas de 10 mg/ml fueron positivos para las hojas y flores de *G. stolonatum*. En el caso de *G. stramineum* y *G. viscosum* ninguno de los extractos mostró actividad antimicrobiana.

8.2 Tamizaje antimicótico.

Para la determinación de la actividad antifúngica se usó un procedimiento similar con una concentración de 10 mg/ml, donde se observa inhibición a tres dermatofitos por las hojas y las flores de las tres especies del género *Gnaphalium*, siendo *A. flavus* el único hongo que no es inhibido por ninguna de las tres especies de *Gnaphalium* en estudio (Tabla 2).

TABLA 2

Tamizaje de la actividad antimicótica vegetal de *Gnaphalium stolonatum*, *stramineum* y *viscosum*.

PLANTA	ORGANO	HONGO			
		A	B	C	D
<i>G. stolonatum</i>	Flor	-	+	+	+
<i>G. stolonatum</i>	Hoja	-	+	+	+
<i>G. stramineum</i>	Flor	-	+	+	+
<i>G. stramineum</i>	Hoja	-	+	+	+
<i>G. viscosum</i>	Flor	-	+	+	+
<i>G. viscosum</i>	Hoja	-	+	+	+

A = *A. flavus*

B = *E. floccosum*

C = *H. gypseum*

D = *T. rubrum*

(+) Actividad : diámetro de crecimiento menor o igual al 25 % del control.

8.3 Selección del mejor disolvente.

Se realizaron extracciones de los órganos que presentaron actividad inhibitoria con tres disolventes: diclorometano, etanol al 80 por ciento y agua para determinar cuál de estos extrae con más eficacia el principio activo responsable de la acción antimicrobiana de las plantas. Los resultados obtenidos muestran que el extracto acuoso y el etanólico poseen actividad, mientras que el extracto diclorometánico es inactivo para todas las bacterias (Tabla 3).

TABLA 3

Confirmación de la actividad antimicrobiana vegetal
de *G. stolonatum*

ORGANO	BACTERIAS						
	A	B	C	D	E	F	G
HOJA							
Diclorometano	-	-	-	-	-	-	-
Etanol al 80 %	-	-	-	+	+	-	+
Agua	+	-	+	+	+	+	-
FLOR							
Diclorometano	-	-	-	-	-	-	-
Etanol al 80 %	-	-	-	+	+	-	+
Agua	-	-	-	-	+	-	-

A = *E. coli*

B = *S. flexneri*

C = *S. typhi*

D = *P. aeruginosa*

E = *S. aureus*

F = *S. pyogenes*

G = *C. albicans*

(+) inhibición

(-) resistencia

En el caso de los hongos, esta fase se aplicó a las tres especies de *Gnaphalium*, ya que estas inhibieron a los tres

dermatofitos en estudio. Los resultados obtenidos muestran que el extracto acuoso no ejerce ninguna actividad (Tabla 4).

TABLA No 4

Confirmación de la actividad antimicótica de
Gnaphalium stolonatum, *G. stramineum* y *G. viscosum*

ORGANO	HONGO		
	A	B	C
<i>G. stolonatum</i>			
HOJA			
Diclorometano	--	--	--
Etanol al 80 %	--	+	--
Agua	--	--	--
FLOR			
Diclorometano	+	+	--
Etanol al 80 %	--	+	+
Agua	--	--	--
<i>G. stramineum</i>			
HOJA			
Diclorometano	--	--	--
Etanol al 80 %	+	+	--
Agua	--	--	--
FLOR			
Diclorometano	+	+	--
Etanol al 80 %	+	--	--
Agua	--	--	--
<i>G. viscosum</i>			
HOJA			
Diclorometano	+	--	--
Etanol al 80 %	--	+	+
Agua	--	--	--
FLOR			
Diclorometano	+	+	--
Etanol al 80 %	--	+	+
Agua	--	--	--

A = *E. floccosum*

B = *N. gypseum*

C = *T. rubrum*

Actividad positiva (+): menor o igual a 25 % del diámetro de crecimiento.

8.4 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM).

Se sometieron a prueba de diferentes concentraciones los extractos que presentaron actividad antimicrobiana y antimicótica, siendo estas concentraciones de 5, 2.5 y 1.25 mg/ml para las bacterias y de 10 y 5 mg/ml para los hongos.

El extracto acuoso de la flor de *G. stolonatum* inhibió a *S. aureus* hasta una concentración de 10 mg/ml, presenta resultados similares el extracto acuoso de la hoja de *G. stolonatum* para *E. coli*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. pyogenes* a una concentración de 10 mg/ml.

El extracto con etanol al 80 por ciento de la flor de *G. stolonatum* presenta inhibición de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* a una concentración de 10 mg/ml.

El extracto etanólico (etanol al 80 %) de la hoja de *G. stolonatum* inhibe a *C. albicans*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* a una concentración de 10 mg/ml (Tabla 5).

Se realizó la CIM de los extractos que presentaron actividad para hongos, así tenemos una CIM para *G. stolonatum* de 10 mg/ml en los dos extractos. El extracto de la hoja de *G. stramineum* con diclorometano inhibe a *E. floccosum* y a *M. gypseum* a una CIM de 5 mg/ml (Tabla 6).

TABLA 5

Concentración Inhibitoria Mínima de los extractos de las
hojas y flores de *G. stolonatum*

ORGANO	BACTERIAS							
	A	B	C	D	E	F	G	
HOJA								
Agua	10	ne	10	10	10	10	ne	mg/ml
Etanol 80 %	ne	ne	ne	10	10	ne	10	mg/ml
FLOR								
Agua	ne	ne	ne	ne	10	ne	ne	mg/ml
Etanol 80 %	ne	ne	ne	10	10	ne	10	mg/ml

A = *E. coli*

B = *S. flexneri*

C = *S. typhi*

D = *P. aeruginosa*

E = *S. aureus*

F = *S. pyogenes*

G = *C. albicans*

(+) inhibición

(-) Resistencia

(ne) No ensayado

TABLA 6

Concentración Inhibitoria Mínima de las hojas y flores de *Gnaphalium stolonatum*, *G. stramineum*, *G. viscosum* en el ensayo antimicótico

ORGANO	HONGO			
	A	B	C	
<i>G. stolonatum</i>				
HOJA				
Etanol al 80 %	ne	10	ne	mg/ml
FLOR				
Diclorometano	10	10	ne	mg/ml
Etanol al 80 %	ne	10	10	mg/ml
<i>G. stramineum</i>				
HOJA				
Etanol al 80 %	5	5	ne	mg/ml
FLOR				
Diclorometano	2.5	5	ne	mg/ml
Etanol al 80 %	10	ne	ne	mg/ml
<i>G. viscosum</i>				
HOJA				
Diclorometano	5	ne	ne	mg/ml
Etanol al 80 %	ne	5	5	mg/ml
FLOR				
Diclorometano	2.5	>2.5	ne	mg/ml
Etanol al 80 %	ne	10	5	mg/ml

A = *E. floccosum*

B = *N. gypseum*

C = *T. rubrum*

Actividad (+): diámetro menor o igual a 25 % del crecimiento del control.

ne: no ensayado

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

9. DISCUSION DE RESULTADOS

La metodología utilizada para verificar la actividad antimicrobiana fue la técnica de Mitscher et al.(40). Este procedimiento de tamizaje hizo fácil la determinación de los órganos a trabajar siendo estos las flores y las hojas de las tres especies de *Gnaphalium*.

De acuerdo con los estudios anteriores referentes a la actividad antimicrobiana de estas plantas queda confirmada la capacidad de *G. stolonatum* de inhibir a *S. aureus*, mientras que no se confirmó su efectividad en ninguna de las tres especies contra *S. pyogenes*. En la elección del mejor órgano, los extractos de las hojas y flores de las tres especies de *Gnaphalium* fueron enfrentados a bacterias y hongos a una concentración de 10 mg/ml. Es importante considerar que estudios previos de tamizaje (32,33) sólo incluyen extractos etanólicos obtenidos de flores de *Gnaphalium* contra bacterias Gram positivo y Gram negativo por lo que la actividad antifúngica y de otros órganos queda en evidencia por primera vez.

Generalmente se ha dicho que la flor de *Gnaphalium* posee la mayor actividad antimicrobiana pero se puede observar que las hojas tienen mejor efectividad que la flor, no obstante se observa que en la actividad antimicótica las dos partes poseen la misma efectividad. Según la literatura esta planta alivia malestares diversos de donde proviene su nombre Sana Todo o "sanalotodo", por tanto si su actividad antibacteriana no es muy potente ya que solamente *G. stolonatum* presentó

poca actividad en sus hojas, podría deberse a que su mecanismo de acción sea más complejo, interactuando otras propiedades farmacológicas posibles tales como espectorante, cicatrizante, antiinflamatorias etc. para curar ampliamente, por lo cual su enorme uso popular. Es importante observar también que los extractos acuosos son los que poseen mayor actividad antimicrobiana con las hojas de *G. stolonatum*, lo que confirma la utilización de infusiones de esta planta como medicamento. Debe tomarse en cuenta además la forma en que esta planta es utilizada por nuestra gente ya que siempre es preparada acompañada de otras plantas en sus infusiones.

De los diferentes resultados observados con las bacterias, *P. aeruginosa* es la bacterias más inhibida seguida de *S. aureus*; *S. pyogenes* es inhibido únicamente por el extracto acuoso de la hoja de *G. stolonatum*.

Respecto al ensayo antimicótico realizado en este estudio se observó que las tres especies de *Gnaphalium* tienen actividad antimicótica para los tres dermatofitos, exceptuando a *A. flavus* que no mostró inhibición en ninguno de los dos órganos analizados. Por los resultados se puede intuir que la sustancia con actividad antifúngica se encuentra principalmente en las flores de las tres especies de *Gnaphalium* y que es extraible con diclorometano, por lo que se puede decir que se trata de un aceite esencial o compuesto apolar.

Respecto a la determinación del mejor disolvente se obtuvieron resultados interesantes, de los cuales se puede apreciar su actividad contra las bacterias y hongos, se observa que el extracto acuoso no presenta actividad antimicótica con ninguno de los dos órganos utilizados aunque en la actividad antimicrobiana sea el mejor. Aparentemente la actividad antibacteriana esta concentrada en las hojas de *G. stolonatum* la sustancia responsable de dicha actividad es soluble en agua deduciéndose entonces que se trata de un compuesto polar.

En la determinación de la CIM de los extractos cuya actividad fue detectada anteriormente se emplearon diferentes concentraciones de estos extractos, de los que el extracto acuoso y etanólico de *G. stolonatum* presentaron inhibición a *E. coli*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. albicans*, a una concentración de 10 mg/ml.

No existen estudios previos de la actividad antimicótica por lo que los resultados obtenidos se consideran originales.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 De las tres especies de *Gnaphalium* estudiadas por su actividad antimicrobiana, la hoja es la que posee mayor inhibición, mientras que la flor presentó menor actividad.
- 10.2 Para la extracción del principio activo responsable de la actividad antimicrobiana de *Gnaphalium stolonatum*, el extracto acuoso es el más adecuado.
- 10.3 De los tres solventes utilizados para demostrar la actividad antimicótica el menos adecuado para extraer el principio activo es el acuoso.
- 10.4 La flor y hojas de las tres especies de *Gnaphalium* estudiadas demostraron actividad antimicótica para los tres dermatofitos en estudio.
- 10.5 Con la confirmación de la actividad antibacteriana para *S. aureus* se proporciona validez científica al uso de popular de estas plantas.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Efectuar estudios de fitoquímica para demostrar la estructura química del compuesto responsable de la actividad antimicrobiana y antimicótica de las plantas del género *Gnaphalium*.
- 11.2 Promover estudios que demuestren otras acciones farmacológicas que puedan poseer las plantas del género *Gnaphalium* estudiadas, para complementar su validación.
- 11.3 En vista de la gran cantidad de especies del género *Gnaphalium*, continuar investigando otras especies para tener un rango mayor de comparabilidad en lo que refiere a su actividad antimicrobiana y antimicótica.
- 11.4 Realizar estudios para determinar la toxicidad de las plantas del género *Gnaphalium* en estudio.

12. REFERENCIAS

1. Villatoro EM. Etnomedicina en Guatemala. Guatemala: Centro de Estudios Folklóricos, USAC. Colección Monografía vol 1, 1984. 361 p
2. Naranjo P. Medicina indígena y popular de América Latina y medicina contemporánea. Guatemala Indígena. Guatemala: Instituto indigenista Nacional, vol XIII número 1-4, 1978. 617 p. (p 186-219)
3. Figueroa H. Enfermedades de los conquistadores. Guatemala: Editorial Universitaria, USAC. vol. 25, 1983. 174 p
4. Asturias F. Historia de la medicina en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria, USAC. vol 28, 1958. 477 p
5. Instituto Indigenista. Aspectos de la medicina popular en el área rural de Guatemala. Guatemala indígena. 1971.
6. Días AN, Titus T. Etnobotánica de uso medicinal en el altiplano occidental de Guatemala. Departamento de San Marcos
17. En memorias. V seminario Nacional de plantas medicinales y II exposición nacional de plantas medicinales y productos derivados. Cobán Alta Verapaz: CONAPLAMED. 1990. 120 P.

7. Bailey WR, Scott EC. Diagnóstico Microbiológico. 6 ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana, 1982. 670 p. (p. 241-242, 270).

8. Zinsser R, et al. Microbiología. 17 ed. Traductora Dra. Nora Graciela Meeroff. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1983. 1413 p. (p 25, 237, 519-600).

9. Pelczar M, et al. Microbiología. 4 ed. México: MacGraw-Hill, 1982. 826 p. (p. 526).

10. Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea. Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic and Enteroadherent. J Infect Dis 1987. 115: 377-388 p.

11. Kelly MT, Brenner DJ, Farmer JJ. Enterobacteriaceae. p 263-276. (En Lennette EM et al. Manual of clinical microbiology. 4 ed. USA: American Society for Microbiology, 1985. (1197 p).

12. Cano JO. Suceptibilidad bacteriana *in vitro* a extractos vegetales utilizados popularmente en el tratamiento de infecciones gastrointestinales. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Médicas.) 1985. 46 p.

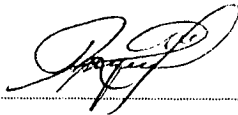
13. Organización Panamericana de la Salud. Manual de tratamiento de la diarrea. Washigton: OPS, serie Paltex B. 13, 1987. 177 p.
14. Prado V. Resistencia de bacterias enteropatógenas a antimicrobianos de uso habitual. Rev Chil Pediatric 55;308-312 P.
15. Solorzáno F, Leaños E, Guiscatie H. Resistencia antimicrobiana actual de *S. typhi*, *S. enteritidis* y *Shigella* sp. Rev Med Infant 44; 438-445 p.
16. Organización Panamericana de la Salud. Infecciones respiratorias agudas en los niños. Washigton: publicaciones Científicas, 1985. 25-30 P.
17. Lennet WR, et al. Manual of clinical microbiology. 4 ed. USA: American Society for Microbiology, 1986. 1149p.
18. Bevan JA, et al. Farmacología. México: CEPESA, 1978, 651 p.
19. Speller DCG. Antifungal chemotherapy. USA: John Wiley & Sons, 1980. 446 p.
20. Martínez R. Micosis asociadas al paciente inmunocomprometido. Guatemala: Memorias del 1 congreso

- Centroamericano de Micología, 1992. 169 p. (p 27-53).
21. Finegold SM, Martin WJ. Diagnóstico microbiológico. 3 ed. Argentina: Médica Panamericana, 1983. p 983 (p 405-416).
22. Rippon JW. Medicinal mycology; pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 2 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co, 1982. 842 p.
23. Logeman H, Quevedo J. Manual de laboratorio, Enfermedades Infecciosas IV. Guatemala: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Esc. de Química Biológica. Depto de Micología, USAC, 1991.
24. Kinskys S. Antibiotic interaction with model membranes fungus. Ann Rev Pharmacol 1970;10:119.
25. Cáceres A, et al. Actividad antifúngica de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de dermatofitos. III Semana Científica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Univesidad de San Carlos de Guatemala: memorias, 1989; 4-7 p.
26. Robbins S, Angelh M. Patología Humana. 3 ed. México: Interamericana, 1987. 703 p.
27. Rebecca A. Immunology of the fungal diseases. Florida: Pres, CRC. 1989. 256 p.

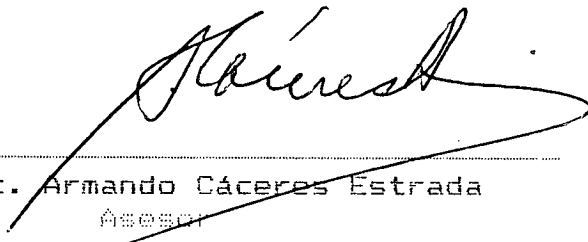
28. Stites D, et al. Inmunología Básica y Clínica. 5 ed. México: El manual moderno, 1,985. 842 p.
29. Nash DL, Williams LO. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany, 1976; 24 : 167 - 178.
30. Morton JF. Atlas of Medicinal Plants of Middle America Illinois: Charles Thomas Publishers, 1981. XXVIII + 1420 p. (p. 937-940).
31. CEMAT-IMEPLAM. Informe del primer taller sobre botánica medicinal guatemalteca. CEMAT e Instituto mexicano para el estudio de las plantas medicinales, Guatemala. 1,980. 51 p.
32. Juárez I. Actividad de cinco especies de *Onophalium* contra bacterias causales de infección respiratoria. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1990. 54 p.
33. Cáceres A, et al, Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorder. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria, J Ethnopharmacol. 1,990; 30: 55-77 P.
34. Cáceres A, Samayoa B, Logeman H. plantas de usos medicinales en Guatemala: 2. Tamizaje de la actividad antimicrobiana. Rev. USAC 1990; 1: 1-138 P.

35. Cáceres A. *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorder. 5. Vibriocidal activity of five american plants used to treat diarrhea. *J Ethnopharmacol.* 1992; 4: 1-83 P.
36. Mejía JV. Geografía de la República de Guatemala. 2 ed. Guatemala: Tip. Nac, 1927. 163 p.
37. Rios JL, Recio MC, Villar A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity. A review of the literature. *J Ethnopharmacol* 1988;23:127-149.
38. MacRae WD, Hudson JB, Towers GHN. Studies on the pharmacological activity of Amazonian euphorbiaceae. *J Ethnopharmacol* 1988;22:143-172.
39. Dominguez XA, Alcorn JB. Screening of medicinal plants used by huastec Mayans of Northeastern México. *J Ethnopharmacol* 1985;13:139-159.
40. Mitscher LA, *et al.* A modern look at folkloric use of anti-infective agents. *J Nat Prod* 1987;50:1025-1040.
41. Takashio M, Vanbreuseghem R, De Vroey C. Production of macroconidia by *Microsporium Ferrugineum*. *Saboraud* 1970;7:252-256.


PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central



Br. María Raquel Martínez Quevedo
Tesisista



Lic. Armando Cáceres Estrada
Asesor



Lic. Gerardo Arroyo
Director Escuela



Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
Decano