

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

Confirmación de la actividad antimicrobiana de los árboles
Spondias purpurea y *Simarouba glauca* nativos de Guatemala.

Informe de Tesis

presentado por

ANA ROSA ZAMORA MARTINEZ

Para optar el título de

QUIMICO BIOLGO

Guatemala, octubre de 1996.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

D6
06
T(1764)

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

DECANO Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar

Secretario Lic. Oscar Federico Nave Herrera

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

TESIS QUE DEDICO

A: Guatemala

A: La Universidad de San Carlos de Guatemala

A: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

A: Lic. Armando Cáceres Estrada

ACTO QUE DEDICO

- A: Dios: Mi refugio y mi fortaleza
- A: Mis padres: Alfonzo Zamora Cardoza
Herlinda Martínez de Zamora
quienes comparten conmigo éste triunfo.
- A: Mis hermanos: José Daniel Zamora Martínez
Luis Alfonso Zamora Martínez
Ana Beatriz de Zamora
con especial cariño.
- A: Herbert Noel De León Urizar
con todo mi amor.
- A: Todos mis compañeros y amigos.

AGRADECIMIENTOS

A: Lic. Armando Cáceres Estrada, por su acertada asesoría.

A: Licda. Elsa Jaúregui, por su ayuda desinteresada.

A: José Pérez, por su ayuda y colaboración.

A: Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos -FARMAYA- por el financiamiento y la colaboración en el desarrollo de la tesis.

INDICE

Página

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCION	2
3.	ANTECEDENTES	3
3.1.	Estudios sobre la actividad antimicrobiana vegetal.	3
3.2.	Demostración de la actividad antimicrobiana vegetal.	5
3.3.	Descripción general de los microorganismos en estudio.	7
3.4.	Especies fúngicas estudiadas.	12
3.5.	Plantas a estudiar.	13
4.	JUSTIFICACIONES	16
5.	OBJETIVOS	17
6.	HIPOTESIS	18
7.	MATERIALES Y METODOS	19
7.1.	Universo de trabajo.	19
7.2.	Muestra.	19
7.3.	Recursos.	19
7.4.	Procedimientos.	21
7.5.	Diseño estadístico.	24
8.	RESULTADOS	26
9.	DISCUSION DE RESULTADOS.	30
10.	CONCLUSIONES	33
11.	RECOMENDACIONES	34
12.	REFERENCIAS	35

1. RESUMEN

En el presente estudio se llevó a cabo la Confirmación antimicrobiana de *Spondias purpurea* y *Simarouba glauca*, árboles nativos de Guatemala.

El propósito de este estudio fue confirmar la acción inhibitoria de los extractos de estos dos árboles contra las bacterias y hongos ensayados. El método que se utilizó fue la técnica de dilución en agar, permitiendo la dispersión homogénea de la muestra en el medio de cultivo, con el propósito de enfatizar acerca de la actividad antimicrobiana de los dos árboles frutales.

Para ello se llevó a cabo tres fases, la fase de tamizaje, utilizando etanol al 50 por ciento, la fase del mejor disolvente utilizando diclorometano, etanol al 80 por ciento y agua, y por último la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de los extractos.

En los resultados se observó que la hoja de *S. glauca* inhibió el crecimiento de *E. coli*, *S. typhi*, *S. aureus* y *S. flexneri* cada uno con un disolvente diferente. La corteza de *S. purpurea* inhibió el crecimiento de *S. flexneri* y *C. albicans*. La raíz de *S. glauca* inhibió el crecimiento de *E. floccosum* y la hoja y corteza de *S. purpurea* inhibieron el crecimiento de *E. floccosum* y *T. rubrum* respectivamente.

En la fase del mejor disolvente, fue el extracto etanólico al 80 por ciento el que produjo la mayor inhibición en el crecimiento bacteriano. La CIM de *S. glauca* para bacterias y *C. albicans* fue de 4.7 mg/ml y la CIM de *S. purpurea* para bacterias y *C. albicans* fue de 0.3 mg/ml.

Se concluyó que *S. typhi* y *C. albicans* fueron los que presentaron mayor inhibición en las diferentes fases.

2. INTRODUCCION

En Guatemala, las enfermedades infecciosas constituyen un grave problema de salud, dichas enfermedades son favorecidas por muchos factores ambientales como el clima, hacinamiento y desnutrición, los cuales dependen de las condiciones socioeconómicas y culturales de la población.

El tratamiento para dichas enfermedades es de alto costo, el cual no está al alcance de la mayoría de la población. En esta situación se plantea llevar a cabo la utilización de plantas medicinales que nos han sido heredadas por nuestros antepasados y que actualmente son una alternativa de tratamiento con buenas posibilidades de éxito.

En nuestro país se han realizado estudios acerca de las propiedades antibacterianas de diversas plantas, pero se hace necesario realizar más investigaciones con el fin de determinar cual de ellos posee efectivamente dicha acción antibacteriana y establecer tratamientos naturales disponibles y de bajo costo para la población.

El presente estudio pretende confirmar la actividad antimicrobiana de tres órganos de dos árboles frutales, *Simarouba glauca* y *Spondias purpurea*, como tratamiento de infecciones de la piel, del tracto respiratorio y digestivo.

3. ANTECEDENTES

3.1. Estudios sobre la actividad antimicrobiana vegetal

Durante mucho tiempo las medicinas naturales y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso de que disponía el médico. A principios de siglo, el desarrollo de la química y el descubrimiento de complejos procesos de síntesis orgánica desembocaron en la puesta en marcha, por parte de la industria farmacéutica, de una nueva producción de medicamentos. Sin embargo, las plantas medicinales y los remedios que extraían de ellas no quedaron totalmente en el olvido. Sus reservas de materias primas fueron y siguen siendo explotadas, para extraer de ellas sustancias irremplazables. Del mismo modo, la medicina popular y los herbolarios no dejaron nunca de recurrir a las plantas medicinales, y se esforzaron en conservar viva una tradición terapéutica conocida desde la prehistoria; a lo largo de ésta evolución, se ha podido ir asistiendo a un notable aumento, tanto en el campo de aplicación como en el número de plantas medicinales conocidas. Las plantas medicinales vuelven a constituir hoy día un importante cultivo, para uso directo por la población o producción de materias primas que son necesarias para la fabricación de medicamentos (1). Entre los principales estudios relacionados con la actividad antimicrobiana de las plantas se encuentra el de Nickel realizado en 1959, que investigó las plantas vasculares en la India y encontró que 157 familias contenían sustancias activas que ejercían acción inhibitoria en el crecimiento bacteriano (2).

MacRae y colaboradores en 1987 colectaron y prepararon extractos de 34 especies de plantas del Amazonas, de la familia Euphorbiaceae, de éstos 16 se usan como agentes medicinales. Los extractos fueron evaluados por su habilidad para inhibir el crecimiento de bacterias (*E. coli* y *S. aureus*), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *C. albicans*) y dermatofitos (*Microsporum canis*, *M. fulvum*, *M. gypseum* y *Trichophyton gallinae*). El crecimiento de *E. coli* fue inhibido con extractos de solo dos de las 34 especies (6%), mientras que *S. aureus* fue inhibido por 26 (76%). *C. albicans* fue resistente para todos los extractos y *S. cerevisiae* fue inhibida por los extractos de solo dos especies. Los 4 hongos dermatofitos evaluados fueron sensibles a la presencia de los extractos. *M. canis* fue el más sensible; *M. gypseum* fue inhibido por extractos del 97% de las especies aunque solo 6 extractos fueron efectivos en altas concentraciones (mayor de 2 mg/ml). *M. fulvum* fue inhibido por el 91% de las especies evaluadas, *T. gallinae* fue sensible a 94% de los extractos (3).

Mistcher y colaboradores realizaron un estudio utilizando extractos etanólicos de 1248 especies de plantas superiores en 7 microorganismos, representantes de bacterias Gram positivo, Gram negativo y ácido resistentes, así como levaduras, encontrando que 26% de las plantas tuvieron efecto contra alguno de los microorganismos (4).

Basados en éstos estudios y con el propósito de enfatizar más acerca de la actividad antimicrobiana de plantas medicinales, se han hecho estudios en Guatemala por Cáceres y colaboradores en los años siguientes:

En 1987 realizaron encuestas etnobotánicas acerca de 200 plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de enfermedades dermatomucosas; 89 plantas fueron seleccionadas para medir su actividad antimicrobiana *in vitro* contra los microorganismos usualmente causantes de infecciones en la piel y mucosas (5).

Encuestas etnobotánicas y revisiones de literatura muestran que en Guatemala se detectaron 234 plantas de 75 familias de origen americano, de éstas, 149 (63.7%) son nativas del continente americano, 67 (28.6%) son introducidas y 18 (7.7%) cosmopolitas. De esta lista se seleccionaron 68 para estudios *in vitro* de su actividad contra bacterias gram positivo las cuales producen infecciones en el tracto respiratorio. De 68 plantas estudiadas, 28 (41.2%) inhiben el crecimiento *in vitro* de al menos una de las bacterias evaluadas (6).

Las plantas que mostraron mayor actividad contra la bacteria fueron *Physallis philadephica* la cual inhibió las tres especies de bacterias evaluadas (*S. aureus*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*). *Eucaliptus globulus*, *Naphalium viscosum*, *Lippia alba*, *Lippia dulcis*, *Salvia officinalis*, *Satureja brownei*, *Solanum nigrescenses* y *Tagetes lucida*, que inhibieron *S. pneumoniae* y *S. aureus*.

Las bacterias evaluadas fueron inhibidas con diferentes frecuencias, las más inhibidas de las especies fue *S. aureus* (27.1%), seguida por *S. pneumoniae* (25%) y *S. pyogenes* (14%) (6).

En 1991, se preparó una lista de 100 plantas usadas para el tratamiento de dermatofitos, de la cual se escogió una muestra de 50 plantas para evaluación de su actividad contra dermatofitos. Los resultados indican que los extractos de 25 plantas inhiben uno o más dermatofitos (*E. floccosum*, *M canis*, *M gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *T. rubrum*) Los más inhibidos fueron *E. floccosum*

(36%), *T. rubrum* (32%), y *T. mentagrophytes* (29%); los menos inhibidos fueron *M. canis* (24%) y *M. gypseum* (23%). Las plantas americanas que mostraron mejor actividad son: *Byrsonima crassifolia*, *Cassia grandis*, *Cassia occidentalis*, *Diphysa carthagenensis*, *D. rubinioides*, *Gliricidia sepium*, *Piscidia piscipula*, *Smilax regelli*, *Solanum americanum* y *S. nigrescens*. Se demostró actividad fungicida y fungistática y se determinó la concentración inhibitoria mínima (7).

En 1993, se hizo un estudio de la actividad antigonorrea de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de enfermedades transmitidas sexualmente. Las plantas utilizadas con mayor actividad y de origen americano fueron: *Bixa orellana*, *Casimiroa edulis*, *Clematis dioica*, *D. robinoides*, *Eupatorium odoratum*, *G. spium*, *Parmentiera edulis*, *Physalis angulata*, *Piper aduncum* y *Prosopis juliflora*. Después de la incubación las zonas de inhibición fueron medidas, demostrando que 28 de las plantas exhibieron alguna inhibición *in vitro* de los microorganismos evaluados (8).

Se hicieron otros estudios sobre *S. glauca* para demostrar su poder antiprotozoario el cual consistió en evaluar la acción antimalárica de cinco plantas más comúnmente empleadas en Guatemala contra la malaria entre ellas *S. glauca*. Se empleó ratones albinos infectados con *Plasmodium berghei* y como antimalárico de referencia Artemisinina (descubierto en otras investigaciones) (9). Se inocularon con eritrocitos parasitados a los ratones albinos y al séptimo día post-infección se obtuvo un 25 por ciento de parasitemia. En el grupo tratado con artemisinina, no se detectó ningún efecto tóxico visible bajo ninguna dosis, luego de su administración diaria durante 8 días, lo cual confirma la efectividad de la artemisinina como antimalárico. De las cinco plantas estudiadas, la corteza de *S. glauca* mostró acción esquizontocida similar a la de la artemisinina a 50 mg/kg (a dosis de 50 mg. indujo una supresión a 64 por ciento). Con éstos resultados se afirma que *S. glauca* tiene un valor potencial como agente antimalárico (9). También se conoce que *S. glauca* tiene unos compuestos llamados glaucarrubina y glaucarrubol que tienen propiedades antiamebianas comparables con el metronidazol (10). Extracciones en metanol, butanol, cloroformo, eter y agua de la rama han mostrado actividad antiamebiana a diferentes concentraciones, específicamente al extracto acuoso sobre *Entamoeba histolytica* (10).

3.2. Demostración de la actividad antimicrobiana vegetal

Los métodos de difusión y dilución se han utilizado para estudiar la actividad antimicrobiana

de plantas medicinales. Un número de modificaciones se han hecho en la técnica y en el orden para obtener mejores resultados. Hay algunos factores (composición de medios de cultivo, microorganismos evaluados, métodos de extracción, pH, solubilidad de algunas muestras en los medios de cultivo, etc.) pueden cambiar los resultados por lo que es dificultoso usar éstos métodos para estandarizar un procedimiento para el estudio de plantas antimicrobianas. La bioautografía es otro método para el estudio de la actividad antimicrobiana el cual utiliza principios de cromatografía y difusión en agar (11). Estos métodos se describen a continuación.

3.2.1. Método de difusión

Una técnica que no requiere dispersión homogénea en agua es el método de disco incrustado en el agar, un agujero o cilindro como depósito. El depósito contiene la muestra a estudiar y se pone en contacto con un medio de inoculación, después de la incubación, el diámetro de la zona clara alrededor del depósito es medido. Este método fue originalmente diseñado para controlar la cantidad de sustancias antibióticas en extractos crudos (11).

El inóculo se puede mantener a una baja temperatura antes de la incubación, el cual favorece la difusión a través del medio de cultivo y su incremento en el diámetro de inhibición. Esta técnica puede ser usada para obtener biogramas (11).

3.2.2. Método de dilución

Las técnicas de dilución requieren la dispersión homogénea de la muestra en agua. Estas técnicas son usadas para determinar, principalmente, la (CIM) valuada de un extracto, aceite esencial o sustancia pura. Estas pueden ser usadas en el tamizaje preliminar de la actividad antimicrobiana (11).

En el método de dilución líquida, la turbidez se toma como una indicación de densidad bacteriana. Cuando no hay crecimiento, el medio permanece limpio; cuando la muestra es inactiva contra el microorganismo evaluado y hay crecimiento, aparece turbidez. El grado de inhibición está relacionado con la turbidez del medio y se mide por espectrofotometría.

Las ventajas de éste método son simplicidad, rapidez y la posibilidad de usarlo en estudios antimicrobianos de agua-soluble o muestras insolubles, tales como aceites esenciales (11).

3.2.3. Método de Bioautografía

La bioautografía es el método de detección más importante para nuevos o para compuestos antimicrobianos no identificados. Esto es basado en efectos biológicos de sustancias bajo estudio (antibacterianos, antiprotozoos, antitumorales, etc.). El procedimiento de la típica bioautografía se basa en la llamada técnica de difusión de agar, por lo cual los compuestos antibacterianos son transferidos de cromatografía de capa a una caja de petri con agar inoculado. Las zonas de inhibición son visualizadas por los reactivos que detectan la actividad de la deshidrogenasa (11).

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*:

Es un bacilo gram negativo polar, monotrico, que se presenta aislado, en pares o en cadenas, móvil, catalasa positivo. En agar sangre crece formando una colonia grande y aplanada con aspecto de vidrio esmerilado y que produce una zona de hemólisis.

Es dentro del género la especie que con mayor frecuencia causa infecciones en el hombre. Puede infectar el sitio de quemaduras, heridas, vías urinarias y el tracto respiratorio, sobre todo en pacientes con defensas disminuídas. En algunos hospitales este microorganismo causa del 10 al 20% de las infecciones hospitalarias (10). Las colonias tienden a extenderse y despiden un olor a tortilla o perraje características. La mayor parte de las cepas excretan piocranina y fluoresceína (pioverdina) lo cual confiere a la colonia su característica fluorescencia. Algunas cepas de *P. aeruginosa* son resistentes a los antibióticos, por lo que son peligrosas en infecciones nosocomiales en general las *Pseudomonas* son sensibles a los aminoglucósidos por ejemplo la amikacina, gentamicina, penicilina y kanamicina (12).

3.3.1.2. *Staphylococcus aureus*:

S. aureus suele agruparse en racimos, son bacterias gram positivo, inmóviles, no formadores de esporas y no poseen cápsula. Todas las cepas de *S. aureus* son coagulasa positivo, fermentan el manitol y algunas veces son hemolíticas. La toxina alfa de *S. aureus* tiene diversas propiedades que aumentan la virulencia. Esta proteína mata las células fagocíticas, contrae los músculos lisos, paraliza las paredes de los vasos sanguíneos, es dermonecrótica y en dosis suficiente mata a los animales de experimentación (12-14).

Probablemente el factor más importante para producir enfermedad por *S. aureus* sea la disminución de las defensas del huésped. El recién nacido es rápidamente colonizado por este microorganismo, y las infecciones estafilocócicas son frecuentes durante la infancia y la pubertad. *S. aureus* puede causar infecciones respiratorias muy graves. Su principal patología es la neumonía que puede ser primaria o secundaria; la primera se manifiesta por fiebre alta, escalofríos múltiples, cianosis, disnea, dolor de tórax y producción de esputo viscoso, amarillento rojizo. En la secundaria o hematógena suele observarse múltiples infiltrados periféricos que se asemejan a lesiones embólicas que evolucionan hasta necrosis con formación de abscesos y una elevada frecuencia de epiema y neumotórax (12-14).

3.3.1.3. *Candida albicans*:

Las levaduras son redondas, ovaladas u oblongas, aparecen solas, con gemaciones y al unirse en cadenas forman pseudomicelio. En el principal miembro del género *Candida* que se considera patógeno, puesto que al igual que los dermatofitos produce enfermedad de la piel y las uñas. Es un habitante de la microbiota del tracto gastrointestinal, piel y vagina. Los niños, los diabéticos, los obesos y la gente que transpira profusamente son más sensibles a la infección que el resto de la gente (15, 16).

La producción de tubos germinales y clamidosporas esféricas son características útiles para su identificación. Se cultiva frecuentemente sobre diversos medios: en el medio de Sabouraud se desarrolla rápidamente a 36°C o a 27°C formándose colonias lisas brillantes, de un blanco cremoso, con un olor "vinoso" característico (16).

3.3.2. Microorganismos causantes de Infecciones Respiratorias.

3.3.2.1. *Streptococcus pyogenes*:

Pertenece al género *Streptococcus* y es clasificado dentro del grupo A de Lancefield. Es un coco gram positivo, esférico u ovoide, de un diámetro menor a 1 μm , se agrupan en cadenas formadas por pares de cocos íntimamente unidos, se dividen en un plano perpendicular al eje mayor de la cadena (16-18).

Es un microaerófilo es catalasa y oxidasa negativo, no contiene ningún compuesto hemo. Su crecimiento es óptimo con un pH de 7.4 a 7.6 y a una temperatura de 36°C. La gran mayoría de los estreptococos del grupo A, poseen cápsula, la cual está compuesta de ácido hialurónico. Esta no es inmunogénica, probablemente debido a la similitud estructural que mantiene con el sarcolema de los mamíferos, se ha postulado que juega un papel importante en la virulencia de la cepa (16, 17). Entre las sustancias de mayor importancia liberadas por los estreptococos del grupo A, se encuentran las estreptolisinas O y S, la toxina eritrogénica, la hialuronidasa, y varios tipos de nucleasas.

Se encuentra en el tracto respiratorio superior como causa común de faringitis aguda. Las infecciones causadas por esta bacteria presentan frecuentemente complicaciones, como: adenitis cervical, otitis media, mastoiditis y neumonía. Puede dejar graves secuelas como: fiebre reumática y glomerulonefritis aguda. Es universalmente susceptible a la penicilina G, por lo que puede excluirse la prueba de sensibilidad antibiótica en las cepas aisladas, a menos que el paciente sea alérgico a ésta. En casos como éstos, puede recurrirse al uso de tetraciclina o eritromicina, como tratamiento alternativo, pero se han reportado cepas resistentes (16-18).

3.3.3. Microorganismos causantes de Infecciones Gastrointestinales

3.3.3.3. *Salmonella typhi*

Los organismos del género *Salmonella* son bacilos móviles gram negativos, aerobios que en forma característica no fermentan la lactosa y que son patógenos para el hombre, y los animales, no son esporulados, de longitud variable. La mayoría de las especies son móviles por flagelos peritricos

(excepto *S. pullorum* y *S. gallinarum*). Las salmonelas crecen fácilmente en los medios de cultivo ordinarios pero no fermentan lactosa, sacarosa, ni salicilina; forman ácido y generalmente gas a partir de glucosa, maltosa, manitol y dextrina (16, 17, 19).

Las salmonelas presentan tres antígenos principales: los antígenos "H" o flagelares, los antígenos "O" somáticos (forman parte de la red de la célula bacteriana), y los antígenos "vi" antígenos K capsulares especializados se encuentran presentes en la extrema periferia de la bacteria, contienen en su membrana lipopolisacáridos. *S. typhi* es el agente causal de fiebre tifoidea, infección que se caracteriza clínicamente por malestar general, anorexia, cefalea y fiebre. Puede o no haber diarrea, si se presenta, es de consistencia líquida contiene gran número de leucocitos polimorfonucleares. El cloranfenicol es la droga de elección para el tratamiento de fiebre tifoidea, se ha reportado el uso de trimetoprim-sulfametoxazole, ampicilina y furazolidona como antibióticos para tratamiento alternativo; sin embargo, se han encontrado cepas resistentes al tratamiento de elección (17, 19, 20).

3.3.3.2. *Shigella flexneri*:

Las shigelas, son bacilos gram negativos, delgados, no capsulados, inmóviles, no esporulados. En cultivos jóvenes pueden presentar formas cocobacilares. Son microorganismos anaerobios facultativos, pero crecen mejor en aerobiosis. Forman colonias redondas, convexas, transparentes, de bordes enteros, que alcanzan un diámetro de cerca 2 mm en 24 horas. Pueden reconocerse generalmente en los medios diferenciales por su incapacidad para fermentar la lactosa, permaneciendo por lo tanto incoloras, mientras que las colonias de los fermentadores de la lactosa forman colonias cromógenas. Todas las shigelas fermentan la glucosa; ninguna fermenta la salicina, con la excepción de *S. sonnei*. La variación de la forma colonial lisa (S) a rugosa (R) está asociada con la pérdida de la invasividad (19, 20). El género incluye cuatro especies: *S. dysenteriae*, *S. boydii*, *S. sonnei* y *S. flexneri*, las cuales pueden causar disentería bacilar. La shigelosis es usualmente endémica y es una causa importante de morbilidad y mortalidad (19, 20).

Es un microorganismo que tiene la capacidad de invadir las células epiteliales de la mucosa del intestino delgado, donde prolifera provocando muerte celular. Es suficiente una pequeña dosis de la bacteria para provocar una infección clínicamente manifiesta. La infección en su forma clínica

más leve se manifiesta por deposiciones líquidas, malestar general y cólicos. Los casos graves se manifiestan por fiebre alta, cólicos abdominales intensos, tenesmo y disentería.

Generalmente las shigelas son sensibles a la ampicilina, tetraciclina, estreptomina, sulfamidas, kanamicina, ácido nalidíxico, cloranfenicol y colistina; sin embargo se ha reportado cepas resistentes (19, 20).

3.3.3.3. *Escherichia coli*:

Son bacilos gram negativos, móvil, fermentan lactosa, y producen gas por fermentación de glucosa.

Algunas cepas producen beta hemólisis en agar sangre. Es la causa más común infección de las vías urinarias en el hombre, más del 85% de todas las infecciones de las vías urinarias adquiridas en la comunidad son causadas por este microorganismo. También es la causa más frecuente de sepsis por gram negativos y ha sido aislada en neumonías, heridas y líquido cefalorraquídeo (16).

E. coli también ha sido asociada con enfermedad gastrointestinal en el hombre y animales. La enteropatogenicidad de la *E. coli* parece estar moderada, por uno de dos mecanismos: primero la producción de una enterotoxina y segundo, penetración del tipo *Shigella* de la mucosa intestinal (16).

La mayor parte de los casos de diarrea infantil se asocian con los serotipos O-III y 55, pero también se han involucrado a los tipos O-28, 112, 119 y del 124 al 128. Se han encontrado que casi todos los brotes de diarrea producidos por *E. coli* enteropatógena en humanos son causados por 12-15 serotipos diferentes (16, 17).

Los serotipos enteropatógenos son distintos completamente de los serotipos oportunistas y virulentos en forma natural para los humanos. Su única facultad de infección se basa en su capacidad para penetrar las células epiteliales de la mucosa intestinal y reproducirse dentro de éstas. Este mecanismo de infección causa el síndrome denominado disentería que se caracteriza por; dolor abdominal, tenesmo y presencia de moco y sangre en las materias fecales. Estos síntomas son

resultado de la necrosis epitelial así como de la ulceración y respuesta inflamatoria aguda que se manifiesta por la presencia de glóbulos rojos y gran número de neutrófilos en las materias fecales (21).

3.4. Especies fúngicas a estudiar:

3.4.1. *Aspergillus flavus*:

Son colonias de borde definido cubiertas con un micelio aéreo plumoso, bien desarrollado, que al madurar tienen un color amarillo o amarillo castaño. Sus esporas son esféricas de 2 a 3 micras que parten en cadenas cortas de toda la circunferencia de la vesícula. Vesículas esféricas que dan origen a una doble hilera de esterigmas en los que se originan las esporas. Presenta hifas hialinas y claramente septadas y está asociado comúnmente con enfermedad broncopulmonar alérgica (15).

3.4.2. *Epidermophyton floccosum*:

Es un hongo de crecimiento lento, su colonia es blanca y algodonosa al principio, luego de forma seca y aterciopelada, de color verdusco a canela, la superficie es plana y en el reverso presenta un pigmento de color café canela. Tiene macroconidias numerosas, son septadas en forma de mazo en grupos de 2 o 3. Las microconidias están ausentes. Las clamidiosporas solo aparecen en cultivos viejos. Para su cultivo no requiere de condiciones nutricionales especiales. Es un agente común de tinea cruris y de tinea unguium. No invade el pelo. Es un hongo antropofílico (15).

3.4.3. *Microsporum gypseum*:

En agar Sabouraud, el *M. gypseum* crece rápidamente formando una colonia aplanada de bordes irregulares, con una superficie áspera y pulverulenta de color de piel de ante a castaño canela. En la observación microscópica presenta macroconidias numerosas y fusiformes con septos, además presenta microconidias en forma de clava o sesiles (18).

Se encuentra generalmente en el suelo (geofilo). Provoca invasión endothrix en el pelo, además se observan pápulas eritematosas alrededor de la lesión y con alopecia severa. Generalmente, los

pelos infectados no tienen fluorescencia bajo la lámpara de Wood puede infectar también la piel lampiña (18).

3.4.4. *Trichophyton rubrum*:

Las colonias son de crecimiento lento, planas y abultadas en el centro, con una superficie blanca algodonosa que se torna rosada, puede tener mucho o poco micelio. En el reverso tienen pigmento rojo tinto en el 95% de las cepas, el 5% restante de las cepas el pigmento puede ser más café o carecer de él. Las microconidias son delgadas en forma de clava, adheridas alternamente a hifas indiferenciadas o en cortos tallos. No tienen macroconidias, salvo la cepa africana que las tienen abundantes y alargadas. Es un agente común de tineas de la piel, uñas y menos frecuente del pelo. Es un hongo antropofílico (15).

3.5. Plantas a estudiar:

3.5.1. Jocote

Spondias purpurea L. (Anacardiaceae)

3.5.1.1. Descripción y Distribución:

Árbol de 12-15 m. con ramas gruesas y esparciadas. Hojas alternas, deciduas, 10-20 cm. de largo, compuestas, 9-25 hojuelas elípticas o lanceoladas, 2-9 cm. de largo, 1-2 cm. de ancho; finamente dentadas cerca del ápice, ligeramente púrpuras cuando jóvenes. Sus flores son rojas o púrpura en pequeños grupos de 1.25 cm. de largo. Frutos de tronco pequeño, oblongos u ovoides, ápice dentado 2-5 cm. de largo, rojo profundo, marrón e amarillos; cáscara suave, carnaza amarilla, jugosa, fibrosa, subácida. Semilla corchosa, con una hendidura grande para el tamaño del fruto (22-24).

Nativa del Sur de México hasta Panamá, aclimatado en Sur América y el Caribe hasta 1,700 m de altura. En Guatemala se cultiva en Petén, Izabal, Alta Verapaz, El Progreso, Jalapa, Zacapa, Chiquimula, Jutiapa, Santa Rosa, Escuintla, Suchitepéquez, Retalhuleu, San Marcos, Quiché, Guatemala y Huehuetenango (23, 24).

3.5.1.2. Usos y propiedades

La cocción de la corteza se usa para tratar diversos estados febriles, diarrea, disentería, amebiasis, dolor de estómago, gastritis, litiasis renal, úlceras, resfrío, conjuntivitis, ictericia y dolor de riñones.

A la corteza y fruta se les atribuyen propiedades antiespasmódicas, antiinflamatorias y diuréticas. El fruto es ampliamente producido y consumido como fruta de estación, en conserva, dulce o chicha (25, 16).

Estudios de tamizaje de la actividad antibacteriana realizados en Guatemala, demuestran que la maceración alcohólica de las hojas inhiben el crecimiento de algunas bacterias patógenas, como *S. aureus*, *S. flexneri* y *S. pneumoniae*; el extracto de las hojas y corteza no tienen actividad contra *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enterotoxigénica, *P. aeruginosa* y *S. typhi*. Estudios realizados con tres solventes demuestran que hay inhibición de las seis bacterias ensayadas únicamente por el extracto metanólico, con una concentración inhibitoria mínima de 10 mg. para cinco bacterias. Una pomada a base de la maceración alcohólica de las hojas redujo el número de días que tarda en sanar la keratoconjuntivitis experimental producida en el cobayo por *S. dysenteriae* (25, 26)

3.5.1.3. Composición Química

Las hojas son sumamente astringentes por que deben contener cantidades considerables de taninos. En la revisión de literatura realizada no se encontró ningún estudio sobre la composición fitoquímica de esta especie. El análisis proximal de 100 g de hojas frescas contienen; 59 calorías, agua (81 g.), proteína (3.5 g.), grasa (0.3 g.), carbohidratos totales (13.4 g), ceniza (1.8 g.), calcio (540 mg.), fósforo (82 mg.), hierro (6.2 mg.), caroteno (1,740 mg.), tiamina (0.06 mg.), ácido ascórbico (29 mg.); 100 g. del fruto fresco contienen: 36 calorías, agua (75.8 g.), proteína (1.0 g.), grasa (0.3g), carbohidratos totales (22.3 g.), fibra 0.5 g.), ceniza (0.6 g.), calcio (14 mg.), fósforo (35 mg.), hierro (0.9 mg.), sodio (2 mg.), potasio (270 mg.), caroteno (225 mg.), tiamina (0.09 mg.), riboflavina (0.05 mg.), niacina (0.4 mg.), y ácido ascórbico (49 mg.) (23-25).

3.5.2. Jocote de Mico

Aceituno

Simarouba glauca DC (Simaroubaceae)

3.5.2.1. Descripción y Distribución

Arbol maderable de 15-30 m. tronco recto, ramas esparciadas. Hojas siempre verdes, pinadas con 10-20 hojuelas oblongas, verdes, coriáceas de 5-10 cm. Flores pequeñas verdosas-amarillentas, en panículas, 4-8 pétalos. Drupa oval de 1.5-2.5 cm., comestible de aspecto de aceituna, rojo al principio, negra al madurar, con una carnaza blanca, jugosa, astringente, insípida con una sola semilla café-anaranjada. Nativa del Sur de México, Centro América y las Antillas en alturas menos de 900 msnm. En Guatemala se ha descrito en Baja Verapaz, Chiquimula, El Progreso, Izabal, Jutiapa, Petén, Quiché, Retalhuleu, Santa Rosa y Zacapa (25, 27).

3.5.2.2. Usos y Propiedades

La infusión o tintura de la corteza y raíz se usa como un remedio contra la amebiasis, diarrea infecciones de la piel, malaria, prurito y sarcoptosis. El jugo de las hojas se usa por vía externa o interna para el tratamiento de afecciones de la piel. Se le atribuyen propiedades antibióticas, estomáquicas, insecticidas y tónicas (25-28).

La glaucarrubina tiene propiedades antiamebianas; la causina tiene propiedades tónicas y digestivas. La glaucarrubina es un terpeno neutro de peso molecular 496, cristal blanco, como una DL 50 a 800 mg/kg, por vía oral en rata y 28 mg/kg. por vía subcutánea, tiene propiedades antibacterianas y antiprotozoáricas; la glaucarubinona es un terpeno neutro de peso molecular 492, cristal blanco con actividad antibiótica y citotóxica para tumores como la leucemia linfoide del ratón, carcinoma epidermoide humano y melanoma. Estudios de tamizaje de la actividad antibacteriana realizados en Guatemala demuestran que la maceración etanólica de las hojas inhibe el crecimiento de *S. typhi* y *S. flexneri* (25-30).

3.5.2.3. Composición Química

La semilla contiene 46-62% de aceite, 24% de proteína, un glucósido cristalino tóxico, lípidos, alcaloides (cuasina), alcoholes triterpénicos, ester de glaucarrubol, glaucarrubina, glaucarubinona; las hojas, ramas y corteza contienen flavonoides polifenoles y taninos (30-32).

4. JUSTIFICACIONES

Guatemala posee una variedad de plantas usadas para el tratamiento de diversas infecciones, lo cual forma parte de la medicina tradicional heredada por nuestros antepasados. Las enfermedades gastrointestinales y respiratorias son las principales causas de morbilidad y mortalidad en nuestro país, además de las enfermedades de la piel que afectan con frecuencia a la población.

En la actualidad se cuenta con varias plantas medicinales de uso popular para el tratamiento de dichas infecciones pero es necesario validar científicamente sus usos y propiedades. Es por eso que la demostración de la actividad de los extractos de estos árboles puede orientar hacia la búsqueda de nuevos tratamientos para enfermedades comunes como los procesos antes mencionados.

Además de ser plantados para obtención del fruto, tienen otras propiedades que son de interés al agricultor y de uso popular medicinal para la población.

5. OBJETIVOS

5.1. General:

5.1.1. Validar la información popular acerca del uso de plantas medicinales en Guatemala.

5.2. Específicos:

5.2.1. Confirmar la acción inhibitoria *in vitro* de extractos de dos árboles frutales: *Simarouba glauca* y *Spondias purpurea*, contra *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans*, *S. pyogenes*, *S. typhi*, *S. flexneri*, *E. coli* (enteropatógena), *A. flavus*, *E. floccosum*, *M. gypseum* y *T. rubrum*.

5.2.2. Establecer que órgano de la planta (corteza, hoja y raíz), tiene la mayor actividad antimicrobiana.

5.2.3. Determinar que disolvente extrae la mayor actividad antimicrobiana.

5.2.4. Determinar la concentración inhibitoria mínima del extracto con mayor actividad antimicrobiana.

6. HIPOTESIS

- 6.1. *Simarouba glauca* y *Spondias purpurea* tienen actividad antimicrobiana.
- 6.2. La corteza en ambos árboles es el órgano que tiene más actividad antimicrobiana.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. Universo del trabajo

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

7.2. Muestra

7.2.1. Partes aéreas y subterránea de: *Simarouba glauca* y *Spondias purpurea*.

7.2.2. Cepas de seis bacterias:

Escherichia coli ATCC 9637

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Salmonella typhi ATCC 14028

Shigella flexneri INCAP 706608

Staphylococcus aureus ATCC 6558

Streptococcus pyogenes INCAP 90809

7.2.3. Cepas de cinco hongos:

Aspergillus flavus CCQQ A-75

Candida albicans ATCC 10231

Epidermophyton floccosum IGSS 761

Microsporium gypseum CCQQ M-71

Trichophyton rubrum CCQQ T-3.5

7.3. Recursos

7.3.1. Recursos Humanos

Autor: Br. Ana Rosa Zamora Martínez

Asesor: Lic. Armando Cáceres Estrada

7.3.2. Materiales

7.3.2.1. Recursos físicos

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

Laboratorio de Productos fitofarmacéuticos FARMAYA.

7.3.2.2. Solventes y medios

Etanol al 50% y 95%.

Diclorometano

Agua destilada

Agar Mueller Hinton

Agar Sabouraud

Agar Sabouraud para producción de esporas (de Takashio)

Agar sangre de carnero al 5%

7.3.2.3.

Balanza analítica

Autoclave

Refrigerador

Incubadora

Mechero

Campana microbiológica

Unidad de filtración con bomba al vacío

Vortex o mezclador

Papel filtro Whatman No. 1

Soporte con anillo gravesande

Tubos con tapón de rosca

Pipetas serológicas

Probeta graduada

Earlenmeyer de 250 a 500 ml.
Embudo de vástago corto
Cajas de petri de 15 mm.
Algodón
Gaza
Asa de nicromo calibrada
Fracos de color ambar de 3 onzas
Agitadores de vidrio

7.4. Procedimiento

7.4.1. Selección de plantas

S. purpurea y *S. glauca* en los cuales algunos de sus órganos han presentado acción antimicrobiana en trabajos anteriores.

7.4.2. Recolección y clasificación

Se recolectó órganos de las plantas en los departamentos de Guatemala, Santa Rosa y Chiquimula (32).

7.4.3. Preparación de las plantas

Se colocaron las partes de las plantas en secadores especiales para el proceso, posteriormente se hizo pedazos pequeños y molidos hasta alcanzar estructuras de igual tamaño. Se almacenó en bolsas plásticas selladas.

7.4.4. Obtención de las tinturas vegetales.

Para la obtención de la tintura vegetal se utilizó 10 g de materia vegetal y se mezcló con 100 ml de etanol al 50% durante tres días. Se filtró con papel filtro Whatman No. 1 (32, 33).

7.4.5. Preparación del medio (Técnica de Mistcher *et al.* 1972) para bacterias y levaduras.

Se preparó 9 ml de agar Mueller Hinton y se agregó 1 ml de extracto vegetal de cada planta y se vertió en una caja de petri para su confrontación microbiana. Se incubó a 35°C durante 24 h para observar crecimiento bacteriano, se almacenaron las cajas libres de contaminación en bolsas plásticas a 4°C (34).

7.4.6. Preparación del inóculo

Se purificaron los microorganismos a ensayar y se inocularon en un tubo con 8 ml de agar tripticasa soya y se incubaron a 36°C durante 24 horas. Se inoculó una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 3 ml de caldo tripticasa soya, se incubó a 36°C durante 24 h, para el caso de 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.

7.4.7. Demostración de la actividad

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

7.4.8. Interpretación de resultados

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

Si hay crecimiento (- = negativo) no actividad.

Si hay apareamiento morfológico (p = parcial)

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

Presencia de microorganismos fuera del lugar de los inóculos (C = Contaminación) (34, 35).

7.4.9. Preparación del medio (Técnica de Takashio) para hongos.

Se preparó agar Sabouraud modificado según la técnica de Takashio, para la mayor producción de esporas. Se inocularon los hongos estudiados, se incubaron a 27°C durante 15 días. Se agregaron

3 ml de agua destilada estéril a cada tubo y se agitaron 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 para llevar a cabo una concentración de 300 esporas por ml y de 100 esporas por ml para *A. flavus*. Almacenar en viales a 4°C hasta su utilización (36).

7.4.10. Preparación del agar planta para hongos (Técnica de MacRae *et al.* 1980)

Se prepararon los tubos de ensayo conteniendo 13.5 ml del medio Sabouraud estéril aproximadamente a 50°C; estando aún líquido se agregó 1.5 ml del extracto del órgano 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 (3).

7.4.11. Demostración de la actividad

Se perforaron 4 pocitos en el agar planta con la boca de una campana de Durham de 5 mm de diámetro, se inocularon 30 ul de la suspensión de esporas preparado previamente, se guardaron en la incubadora a 27°C durante 24 h, posteriormente se dio vuelta a las cajas y se incubaron a 27°C durante 15 días.

7.4.12. Interpretación de los resultados

Se midieron los diámetros de crecimiento de las colonias de cada inóculo. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento comparando el diámetro de las colonias control con el de las colonias en cajas con agar y planta. Se tomó como positivos aquellos extractos que redujeron el diámetro de la colonia control en un 75% (36).

7.4.13. Selección del mejor disolvente

Una vez determinado el o los órganos con mejor actividad antimicrobiana, se obtuvo los extractos etanólicos, acuosos y con diclorometano. Se concentró cada extracto en el rota vapor hasta alcanzar una consistencia de miel. Finalmente, se resuspendió cada extracto en su respectivo disolvente para obtener una dilución 1:10, 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 demuestren mayor actividad (36).

7.4.14. Determinación de la CIM

Se ensayó el órgano con el mejor disolvente que demostrara mayor actividad contra tres concentraciones (10, 50 y 100 ul) en el caso de bacterias y levaduras, con los hongos se confrontó los extractos que presentaron mayor inhibición (36).

7.5. Diseño estadístico

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

La parte experimental se inició con un tamizaje tanto para bacterias como para hongos, para determinar el mejor órgano de los dos árboles en estudio, luego se determinó el mejor disolvente y por último, se realizó la CIM del mejor disolvente.

7.5.1. Diseño estadístico para tamizaje de bacterias.

Diseño de bloques al azar.

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

Ho: el extracto de la planta no tiene efecto inhibitorio. ($p = 0.5$)

Ha: el extracto de la planta sí tiene efecto inhibitorio. ($p > 0.5$)

Ho: se rechazará si la probabilidad de error es $< \alpha$ 0.1.

Variable binomial: éxito = inhibición (+)

fracaso = crecimiento (-)

7.5.2. Diseño estadístico para tamizaje de hongos

Diseño de bloques

Criterio de clasificación

- Sí hay inhibición: el diámetro debió ser menor o igual al 25% del diámetro del control.
- No hay inhibición: el diámetro debió ser mayor o igual al 25% 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. CIM

Se trabajó los órganos que presentaron mayor actividad, se trabajaron tres concentraciones (10, 50 y 100 ml), el diseño fue el mismo que para el tamizaje para bacterias y hongos según sea el caso.

8. RESULTADOS

En el presente estudio se ensayaron las hojas, corteza y raíces de *S. glauca* y *S. purpurea* con el fin de determinar la actividad antimicrobiana de dichos árboles frutales contra microorganismos causantes de infecciones respiratorias, gastrointestinales y dermatomucosas. Los ensayos de tamizaje se hicieron con 10 mg/ml y los resultados contra bacterias y levaduras son los siguientes:

Tabla 1

Fase de tamizaje de la actividad antimicrobiana de *S. glauca* y *S. purpurea* en una tintura con etanol al 50%.

Planta 10 mg/ml	Parte usada	Microorganismos						
		A	B	C	D	E	F	G
<i>S. glauca</i>	Hoja	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. glauca</i>	Corteza	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. glauca</i>	Raíz	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. purpurea</i>	Hoja	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. purpurea</i>	Corteza	-	-	-	+	-	-	+
<i>S. purpurea</i>	Raíz	-	-	-	-	-	-	-

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

En el caso de la actividad contra dermatofitos se observó que la raíz de *S. glauca* y la hoja de *S. purpurea* inhibieron el crecimiento de *E. floccosum* mientras que la corteza de *S. purpurea* inhibió el crecimiento de *T. rubrum*.

Tabla 2

Fase de tamización de la actividad antidermatofítica de *S. glauca* y *S. purpurea* con una tintura de etanol al 50%.

Planta 10 mg/ml	Parte usada	Microorganismos			
		A	B	C	D
<i>S. glauca</i>	Hoja	-	-	-	-
<i>S. glauca</i>	Corteza	-	-	-	-
<i>S. glauca</i>	Raíz	-	+	-	-
<i>S. purpurea</i>	Hoja	-	+	-	-
<i>S. purpurea</i>	Corteza	-	-	-	+
<i>S. purpurea</i>	Raíz	-	-	-	-

Hongos ensayados: A = *A. flavus*, B = *E. floccosum*, C = *M. gypseum*, D = *T. rubrum*

+ = inhibición (% de crecimiento < 25%)

- = no inhibición (% de crecimiento > 25%)

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

Tabla 3

Confirmación de la actividad antimicrobiana de hojas, corteza y raíz de *S. glauca*, hoja, corteza y raíz de *S. purpurea* usando tres disolventes.

Planta 10 mg/ml	Disolvente	Parte usada	Microorganismos					
			A	B	C	D	E	F
<i>S. glauca</i>	Diclorometano	Hoja	-	-	-	-	-	+
<i>S. glauca</i>	Etanol 80%	Hoja	-	+	-	-	+	-
<i>S. glauca</i>	Agua	Raíz	+	-	-	-	-	+
<i>S. glauca</i>	Diclorometano	Corteza	-	-	-	-	-	-
<i>S. glauca</i>	Agua	Corteza	-	-	-	-	-	-
<i>S. purpurea</i>	Diclorometano	Hoja	-	-	-	-	-	+
<i>S. purpurea</i>	Etanol 80%	Corteza	-	-	-	-	-	-
<i>S. purpurea</i>	Agua	Corteza	-	-	-	-	-	-
<i>S. purpurea</i>	Diclorometano	Raíz	-	-	-	-	+	-
<i>S. purpurea</i>	Etanol 80%	Raíz	-	-	-	-	-	+
<i>S. purpurea</i>	Agua	Raíz	-	-	-	-	-	-

Microorganismos ensayados: A = *E. coli*, B = *P. aeruginosa*, C = *S. typhi*, D = *S. flexneri*, E = *S. aureus*, F = *C. albicans*, + = inhibición, - = no inhibición.

En la tabla 4 se presentan los resultados de la fase de determinación de concentración inhibitoria mínima para bacterias y levaduras, de aquellos extractos que mostraron actividad en el ensayo anterior.

Tabla 4

Concentración inhibitoria mínima (mg/ml) de *S. glauca* (Hoja y raíz) y *S. purpurea* (Hoja y raíz) utilizando tres disolventes.

Planta	Parte usada	Disolvente	Microorganismos					
			A	B	C	D	E	F
<i>S. glauca</i>	Hoja	Diclorometano	-	-	-	-	-	4.7
<i>S. glauca</i>	Hoja	Etanol 80%	-	7.5	-	-	7.5	-
<i>S. glauca</i>	Raíz	Agua	7.5	-	-	-	-	7.5
<i>S. purpurea</i>	Hoja	Diclorometano	-	-	-	-	-	3
<i>S. purpurea</i>	Raíz	Diclorometano	-	-	-	-	0.3	-
<i>S. purpurea</i>	Raíz	Etanol 80%	-	-	-	-	-	7.5

Microorganismos ensayados:

A = *E. coli*, B = *P. aeruginosa*, C = *S. typhi*. D = *S. flexneri*, E = *S. aureus*, F = *C. Albicans*.

+ = inhibición - = no inhibición.

9. DISCUSION DE RESULTADOS

En el presente estudio se confirmó la actividad antimicrobiana en varios órganos de dos árboles frutales, *Simarouba glauca* y *Spondias purpurea*, que son cultivados por sus frutos y que además son utilizados como medicina popular en nuestro país para el tratamiento de infecciones por microorganismos que causan diarrea, infecciones respiratorias y dermatomicosis.

Basados en los estudios que realizaron MacRae *et al.* (3) para dermatofitos y Mitscher *et al.* (4) para bacterias y levaduras, usando una técnica de dilución en agar, en el presente estudio se utilizó la misma técnica con el propósito de enfatizar acerca de la actividad antimicrobiana de los dos árboles frutales mediante un estudio llevado a cabo en tres fases.

Esta técnica permite la dispersión homogénea de la muestra en el medio de cultivo. Es un procedimiento usado para determinar principalmente la CIM de un extracto o sustancia pura, además de ser un método simple, rápido y que por ser un método no paramétrico su reproducibilidad es alta y su análisis fácil.

Los resultados obtenidos en algunos estudios anteriores demuestran que la hoja de *S. purpurea* no tiene ninguna actividad antibacteriana (38), sin embargo, en otros estudios si presento actividad contra *E. coli*, *S. typhi* y *S. flexneri*, aunque en ambos casos se realizaron por técnicas de difusión (38). En otros estudios llevados a cabo anteriormente en los extractos acuoso y etanólico no se observó actividad contra *S. aureus* y *E. coli* (39).

No se han realizado suficientes estudios acerca de la actividad antimicrobiana de *S. purpurea*, pero si se han realizado estudios con extractos de *Spondias mombin*, entre los cuales, los extractos acuoso y etanólico de las hojas de *S. mombin* inhibieron el crecimiento de algunas bacterias gram positivos y gram negativo (40). Estas dos especies son usadas popularmente con el nombre de Jocote.

Solamente uno de los órganos de cada árbol presentó actividad, ya que la hoja de *S. glauca* inhibió el crecimiento de *E. coli* y la corteza de *S. purpurea* inhibió el crecimiento de *S. flexneri* y *C. albicans*, ambos en la fase de tamizaje antimicrobiano.

En la fase de tamizaje antidermatofítico, el órgano de *S. glauca* que presentó mayor actividad contra *E. floccosum* fue la raíz, mientras que la hoja y corteza de *S. purpurea* inhibieron a *E. floccosum* y *T. rubrum*, respectivamente. En este caso, son tres los órganos involucrados, dos de *S. purpurea* y uno de *S. glauca*, diferentes al de la fase de tamizaje.

En la siguiente fase, en el caso de la hoja y corteza de *S. glauca*, el mejor disolvente fue el etanol al 80 por ciento, y seguidamente el agua. Esto explica porque se usa con fines medicinales, ya que se utilizan las hojas de las plantas que se preparan en forma de infusión de tal forma que sirven como tratamiento para algunas de las infecciones mencionadas anteriormente.

La causa que podría explicar la diferencia encontrada entre el extracto etanólico y el acuoso podría ser que el componente activo antibacteriano de los extractos no tiene un sólo componente químico responsable sino dos o más componentes y uno de ellos ser más soluble en etanol que en agua.

Mientras tanto, con la raíz de *S. purpurea*, el mejor disolvente fue el diclorometano. Los resultados de este estudio demuestran que algunos de los componentes activos de la raíz de *S. purpurea* son solubles en diclorometano, que es disolvente apolar, insoluble en agua, aceitoso y que puede contener aceite esencial. Contrario al etanol al 80 por ciento y agua, con los cuales no se presentó actividad con ninguno de los órganos (corteza y raíz) pues en este caso, los componentes bioactivos de estas dos moléculas son más polares que apolares.

En la fase de CIM, se observó que fue el extracto con diclorometano el que dio la CIM más baja para bacterias (0.3 mg/ml). El diclorometano es el disolvente más apolar entre los tres utilizados, pues su momento dipolar es menor de cero, razón por la cual puede extraer compuestos apolares, como es el caso de los triterpenos, flavonoides, taninos y aceite esencial, algunos de los compuestos que contienen los órganos de estos dos árboles.

Entre las diferencias que podrían afectar los resultados obtenidos en estudios anteriores y los del presente estudio se encuentran: la edad de la planta, su etapa de crecimiento, el lugar donde se recolectó, los disolventes utilizados para extraer el principio activo y los microorganismos empleados.

El que ciertos órganos de los dos árboles no hayan presentado ninguna actividad contra bacterias y hongos, no significa que no tengan un efecto medicinal, pues las hojas y corteza de *S. purpurea* son astringentes, solamente la corteza se usa para tratar diversos estados febriles, úlceras, resfrío y dolor de riñones. Además, se le atribuyen propiedades diuréticas, antiespasmódicas, antianémicos, analgésicos y cicatrizantes. De igual forma, la corteza de *S. glauca* se utiliza contra vómitos, debilidad general y fiebres palúdicas además de tener propiedades antidiarreicas, antiamebianas y tónico estomáquicos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se tiene que los extractos de los árboles frutales investigados presentaron actividad antimicrobiana contra por lo menos un microorganismo y de ésta forma se confirma la primera hipótesis planteada en este estudio.

Con lo descrito anteriormente, este estudio resalta la importancia que podrían tener estos dos árboles, no solo para obtencion de sus frutos, con valor comercial sino también por el uso que se le puede dar a otros órganos, ya que por podarse en ciertas épocas del año, aportan material vegetal que puede servir como tratamiento de algunas infecciones y que generalmente se descartan por ignorancia. En esta forma se tira a la basura una parte con posible efecto medicinal, que puede estar al alcance de toda la población guatemalteca para el alivio de sus enfermedades.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 Los dos árboles frutales investigados presentaron actividad antimicrobiana *in vitro*.
- 10.2 De los tres extractos utilizados, el diclorometano y el etanólico son los que presentaron mayor inhibición.
- 10.3 La bacteria y levadura que presentaron mayor inhibición en las diferentes fases fueron: *S. typhi* y *C. albicans*.
- 10.4 *E. floccosum* fue inhibido por la raíz de *S. glauca* y la hoja de *S. purpurea*, mientras que *T. rubrum* fue inhibido por la corteza de *S. purpurea*.
- 10.5 La CIM de *S. glauca* para bacterias y *C. albicans* fue de 4.7 mg/ml y la CIM de *S. purpurea* para bacterias y *C. albicans* fue de 0.3 mg/ml.
- 10.6 *P. aeruginosa*, *S. pyogenes* y *A. flavus* no fueron inhibidos por ninguno de los extractos ensayados.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1. Demostrar el efecto inhibitorio de las plantas estudiadas contra otros microorganismos causantes de infecciones en el hombre.
- 11.2. Realizar tamizajes fitoquímicos de los extractos que resultan activos para poder establecer su perfil y posteriormente llevar a cabo el fraccionamiento de dicho extracto.
- 11.3. Demostrar la actividad farmacológica de estos extractos que podrían justificar las propiedades popularmente atribuídas tales como diuréticas, analgésicas, cicatrizantes y desinfectantes.
- 11.4. Evaluar la toxicidad aguda y crónica de los extractos que muestran actividad.
- 11.5. Realizar estudios de fraccionamiento bioguiado para contribuir en la elucidación del principio activo de la planta.

12. REFERENCIAS

1. Uso de plantas medicinales. México D. F. Arbol editorial, S. A. de C. V. Junio 1989. 173 p.
2. Nickel L. Antimicrobial activity of vascular plants. Connecticut: Economic Botany 1959. p (281-317).
3. MacRae WD, Hudson JB, Towers GHN. Studies on the pharmacological activity of *Amazonian euphorbiaceae* J Ethnopharmacol 1988, 22: 143-172.
4. Mitscher LA, et al. At modern look of folkloric use of antiinfective agents J Nat Prod. 1987; 50: 1025-1040.
5. Cáceres A, et al. Screening of Antimicrobial Activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosas diseases. J. Ethnopharmacol 1987; 20: 223-337.
6. Cáceres A, et al. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory disease. 1. Screening of plants against Gram positive bacteria. J. Ethnopharmacol 1991; 31:193-208.
7. Cáceres A, et al. Actividad Antimicótica de Plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de dermatofitos. III Semana Científica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala: Memorias, 1989. B (p. 4-7).
8. Cáceres A, Menéndez HE, Cohobon E. Antigonorrhoeal Activity of Plants Used in Guatemala for the treatment of Sexually transmitted diseases. Memories IV National Congress of Microbiology. 1991; Guatemala. (p. 1-5).
9. Medinilla B. Evaluación farmacológica y toxicológica "in vitros" de algunas plantas comúnmente empleadas en Guatemala contra la malaria. Revista Científica. 1989; 9.1: (p.7-10)

10. Germosén-Robineau L. Investigación científica y uso popular de plantas medicinales en el Caribe. San Andrés Colombia: Seminario Tramil 7. Feb. 1995. (p. 588, 589 y 601, 602 s).
11. Ríos JL, Recio Mc, Villar A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity. J. Ethnopharmacol 1988; 23: 127-149.
12. Finegold SM, Martin WJ, Bailey and Scotts. Diagnóstico Microbiológico. 6a. ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana 1982. 670 p (270).
13. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EH. Manual de Microbiología. 9a. ed. México: El Manual Moderno. S. A. 1981, 595 p.
14. Rytal MW, Mogabgab WJ. Manual de enfermedades infecciosas. México: Ed. Interamericana, S. A.; 1986, 546 p.
15. Carpenter PL. Microbiología. 4a. ed. Blengio JR, Espinosa R, Folch A; Trad. México: Interamericana 1982. XIII 518 p.
16. Lynch M, *et al.* Métodos de laboratorio. México D. F.: Nueva Editorial Interamericana 1985. 1522 p (p. 1018-1020).
17. Lennette WR, *et al.* Manual of clinical Microbiology. 4 th. ed. USA: American Society for Microbiology, 1986. 1149 p.
18. Finegold JM, Baron EJ, Bailey and Scotts. Microbiology. 7th. ed. USA: The C. V. Mosby Company, 1986 XVIII. 914 p.
19. Alvarez A. Inhibición de *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* por extractos vegetales usados en el tratamiento de afecciones respiratorias. Guatemala. (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1987 - 56.
20. Joklik ER, Willet HP, Amos DB. Microbiología. 17a. ed. México: Editorial Panameri-

cana, 1983. 831 p.

21. Koneman EW, *et al.* Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas a color. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 1983. 533 p (p. 446-449).
22. Cano JO, Susceptibilidad bacteriana in vitro a extractos vegetales utilizados popularmente en el tratamiento de infecciones gastrointestinales. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Médicas) 1985. 46 p.
23. Pelczar J. *et al.* Microbiología. México: Editorial Mac Graw Hill. 1982. 505 p.
24. Weninger B, Robinson L. Investigaciones científicas y uso popular de plantas medicinales en el Caribe. Santo Domingo: Seminario Tramil 4. Nov. 1986. (p. 185-188).
25. Morton JF. Atlas of Medicinal Plants of Middle America. Illinois. Charles Thomas publishers. 1981. (p. 477, 478-492).
26. Weninger B, Robinson L. Investigaciones científicas y uso popular de plantas medicinales en el Caribe. Santo Domingo: Seminario Tramil 2 Nov. 1986. (p 185 y 188)
27. Guzmán DJ. Especies útiles de la flora salvadoreña. San Salvador, El Salvador: Ministerio de Educación. 6:1975. 651 p.
28. Martínez M. Las plantas medicinales de México. 54a. ed. México: Editorial Botas 1969, 656 p.
29. Steggermark A, Standley P. Flora de Guatemala. Feldiana Botany. 1946 IV. 24: 79 p.
30. Núñez E. Plantas Medicinales de Costa Rica y su folklore. Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica. 1986. 318 p.
31. Mendieta RM, del Amo S. Plantas Medicinales del estado de Yucatán, México: Compañía Editorial Continental S. A. 1981. 322 p.

32. Uso de Plantas Medicinales. México: Editorial Arbol S. A. Junio 1989. 173 p.
33. Díaz JL. Usos de Plantas Medicinales en México. México: Instituto Mexicano para el Estudio de las plantas. 1976. 271 p.
34. Mejía JV. Geografía de la República de Guatemala. 2a. ed. Guatemala: Tip. Nac. 1927 163 p.
35. Dominguez XA, Alcorn JB. Screening of medicinal plants used by Huastec Mayans of North eastern México. J. Ethnopharmacol. 1985; 13: 139-159.
36. Duke JA, Atchley AA. Handbook of proximate analysis of higher plants, USA: CPR Press Inc.; 1985. 389 p.
37. Maldonado P. *et al.* Determinación de la Prevalencia de Resistencia Antimicrobiana en *Escherichia coli* de la Microbiota Normal. Memorias, III Congreso Nacional de Microbiología, Guatemala. 1986. p. 195.
38. Obtención y Aprovechamiento de Extractos vegetales de la Flora Salvadoreña. El Salvador. Planter. Oct. 1989. Vol I: (57, 58) (p. 526-527).
39. 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.
40. Antibacterial Effect of Aqueous and Alcohol Extracts of *Spondias mombin*, and *Alchornea cordifolia*. Two local Antimicrobial Remedies. Int. J Crude. Drug. Res. 23 (1985), 2, (p. 67-72).



ANA ROSA ZAMORA MARTINEZ

TESISTA



LIC. ARMANDO CACERES E.

ASESOR



LIC. GERARDO ARROYO

DIRECTOR



LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR

DECANO