

267

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

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE RAIZ, RIZOMA, TALLO
Y HOJAS DE DIFERENTES ESPECIES DEL GENERO SMILAX



Guatemala, febrero de 1998

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

17
(172)
0.1

JUNTA DIRECTIVA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

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

DEDICO ESTE ACTO

- A Dios: Ser Supremo que me dió la vida
- A mi esposa: Laura de Pineda
Con amor y agradecimiento por su valiosa ayuda
- A mi hija: Laura Alejandra Pineda Ramírez
Con Amor
- A mis padres: Alfonso Pineda (Q.E.P.D.) y Lucrecia de Pineda
- A mis hermanos: César, Carlos, Ana y Rocío
- A mis abuelos: Carlos Gustavo Amézquita
Rosa Cortéz de Amézquita (Q.E.P.D.)
- A mis suegros: Romelio Ramírez
Catalina de Ramírez
- A mis: Cuñados, tíos y sobrinos
- A mis amigos: Abraham, Marwin, Henry, Oscar, Rafael, Lissette y Leopoldo

DEDICO ESTA TESIS

A la Escuela de Química Biológica de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

A mi Asesor: Lic. Armando Cáceres

A la Empresa: Comercial Selecta

AGRADECIMIENTO

Al Licenciado Armando Cáceres: Por su valioso aporte profesional en la realización de la presente tesis.

Al Personal del Laboratorio Farmacéutico FARMAYA por haberme permitido realizar este estudio.

A Abraham Mazariegos: Por toda su colaboración.

Indice

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION.....	3
3. ANTECEDENTES	4
3.1 DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO <u>SMILAX</u>	4
3.2 MICROORGANISMOS PATÓGENOS AL HOMBRE.....	10
3.3 TRATAMIENTOS ANTIMICROBIANOS	14
3.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	16
4. JUSTIFICACIONES.....	20
5. OBJETIVOS	21
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	21
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
6. HIPOTESIS.....	22
7. MATERIALES Y METODOS	23
7.1 UNIVERSO DE TRABAJO.....	23
7.2 MUESTRAS	23
7.3 RECURSOS.....	23
7.4 PROCEDIMIENTO.....	25
7.5 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	27
8. RESULTADOS.....	29
9. DISCUSION DE RESULTADOS	30
10. CONCLUSIONES	32
11. RECOMENDACIONES.....	33
12. REFERENCIAS	34
13. ANEXOS.....	40

1. RESUMEN

Las plantas del género Smilax son utilizadas en Guatemala, para el tratamiento de diferentes enfermedades, tales como afecciones cutáneas, reumatismo, enfermedades escrofulosas, sífilis y además por su acción diurética, depurativa y levemente laxante.

Estudios previos demostraron que la raíz y rizoma poseen actividad antimicrobiana. En el presente trabajo se determinó la actividad y la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), de los extractos de raíz, rizoma, tallo y hojas; de S. lundellii, S. regelii y S. spinosa.

El estudio se dividió en dos fases: en la primera se realizó el tamizaje, en el cual se determinó que extracto demostró tener actividad contra bacterias, dermatofitos y levaduras; la segunda consistió en la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de los diferentes extractos de la planta frente a los microorganismos ensayados. En ambas fases se utilizó un extracto hidroalcohólico de etanol al 50%, obtenido por extracción en frío. Tanto la actividad como la CIM se pusieron de manifiesto por el método de Mitscher et al para extractos vegetales. La metodología utilizada implica una determinación no paramétrica en bloques completamente al azar de la actividad (crecimiento o no del microorganismo), por tal motivo, para el análisis de los resultados se realizó una prueba de hipótesis binomial en la que la hipótesis nula establece que la probabilidad de obtener un resultado positivo es igual que la de un resultado negativo, contra una hipótesis alterna que indica que la probabilidad de obtener un resultado positivo es mayor que la de obtener un resultado negativo.

Se demostró que los extractos de raíz y rizoma de las tres especies, poseen la mayor actividad inhibitoria frente a todos los microorganismos ensayados. El tallo y las hojas no presentan actividad inhibitoria significativa a excepción del tallo de S. regelii, que demostró tener actividad antifúngica a una concentración de 15 mg. Sin embargo, es conveniente realizar estudios fitoquímicos; para determinar los principios activos. Ya que si bien se asume que su bioactividad depende de los saponósidos, falta demostrar que en las tres especies, éstos son los principios activos. Finalmente continuar con la investigación de otras propiedades que se le

atribuyen a este género de plantas, que es de suma importancia para la población de nuestro país como medicina alternativa.

2. INTRODUCCION

El género Smilax que pertenece a la familia de las Smiláceas, son enredaderas tropicales de las cuales se han descrito 12 especies autóctonas de Mesoamérica. Guatemala cuenta con varias especies de este género, ampliamente distribuidas en regiones tropicales y templadas (1,3).

Antiguamente estas plantas eran utilizadas por los indígenas debido a su acción diurética, depurativa y levemente laxante (1). En la actualidad las raíces de esta planta son utilizadas en medicina popular como depurativo de la sangre, excelente sudorífico, para combatir la sífilis, enfermedades escrofulosas, afecciones cutáneas, reumatismo y malaria (1,2).

En Guatemala las enfermedades infecciosas constituyen un grave problema de salud, y tienen una alta prevalencia sobre todo en los niños. Factores ambientales, tales como el clima, las condiciones de salubridad y otros como el hacinamiento, la desnutrición, la carencia de medidas de higiene; que a su vez están relacionados a condiciones socioeconómicas y culturales, favorecen el desarrollo de los microorganismos responsables de estas afecciones.

La utilización de plantas para el tratamiento de estas enfermedades, pone de manifiesto la necesidad de profundizar en la investigación de las propiedades de algunas de ellas. Lo que representará una alternativa de tratamiento con buenas posibilidades de éxito.

Estudios previos in vitro demostraron la actividad antimicrobiana de los extractos de rizomas de diferentes especies del género Smilax. El presente estudio tuvo por objetivo determinar si los extractos de otros órganos de la planta, tales como tallo y hojas poseen actividad antimicrobiana. La obtención de los resultados esperados, tendrá un profundo efecto ecológico, debido a que se evitará poner en peligro de extinción a las especies del género Smilax, puesto que no será necesario destruir completamente la planta; sino que únicamente cortar tallo y hojas.

3. ANTECEDENTES

3.1 Descripción del género Smilax

Género de enredaderas tropicales de las que se han descrito 12 especies autóctonas de Mesoamérica, en Guatemala su distribución geográfica es restringida y su producción es por recolección de plantas silvestres. La droga posee un característico color rojo (3).

Este género incluye un grupo de plantas trepadoras o bejucos, herbáceos o leñosos, tallos con espinas o inermes, que se elevan de tubérculos corpulentos, leñosos o de largos rizomas rastreros. Las hojas son generalmente coriáceas, enteras o lobuladas; con distinto perianto segmentado. Las flores poseen pedúnculos de soporte insertados sobre un receptáculo cónico o globoso con o sin ovario abortivo; los pistilos de las flores son generalmente pequeños, con un ovario y varios estambres abortivos (1).

3.1.1 Clasificación botánica y distribución geográfica

Smilax lundellii es una enredadera grande, ramas inferiores firmes, robustas, cilíndricas, estriadas, con espinas fuertes, glabras o pilosas; ramas superiores sin espinas, peciolo de 1-3 centímetros de largo, articulados, rizoma leñoso de color rojo, con raicillas alrededor. Hojas oblongo-lanceoladas o lanceoladas, verde-café, inferiores de 18-27 centímetros de largo por 10-13 centímetros de ancho, superiores más pequeñas, agudas, obtusas o agudas en la base. Pedúnculo fructuoso foliar estaminado, perianto segmentado, anteras cortas, 7 nervios. Pedúnculo fructuoso de 5-11 milímetros de largo, pedicelos fructíferos de 7-10 milímetros de largo, excediendo al pedúnculo; bayas globosas de 4-6 milímetros de diámetro negro-azuladas. Es nativa de México y Centro América. Se encuentra en bosques o maleza húmeda hasta 1,300 metros sobre el nivel del mar. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Izabal, Petén, San Marcos y Santa Rosa (3,4).

Smilax regellii es una enredadera de hasta 15 metros de largo; raíces delgadas, color café o

gris, olor débil, sabor mucilágino ligeramente amargo; tallos inferiores agudos, cuadrangulares, ángulos con espinas grandes, anchas, comprimidas, rectas o encorvadas, de 1 centímetro de largo; ramas superiores, agudas y espinosas. Las hojas inferiores poseen un peciolo espinoso de 7 centímetros de largo y 20 centímetros de ancho, 20-30 centímetros de largo por 15-20 centímetros de ancho, ovaladas u oblongas, base cordiforme, 5-7 nervios, color verde claro; las hojas superiores son más pequeñas, oblongo-lanceoladas, agudas en la base, glabras, a veces el nervio del envés tiene cortas espinas encorvadas. Pedicelo estaminífero de 6.5 centímetros de largo, más largo que los peciolos, perianto segmentado, pedicelos fructíferos de 9-19 milímetros de largo.

Frutos globosos, 1.3 centímetros de diámetro, color negro. Es nativa de México y Centro América. Se encuentra en bosques o malezas hasta 1,500 metros sobre el nivel del mar. En Guatemala se ha descrito en El Progreso, Petén, Izabal, Santa Rosa, Chimaltenango, Quetzaltenango y Zacapa (3,4).

Smilax spinosa es una enredadera de tallos cilíndricos provistos de espinas fuertes; ramas superiores de 4-6 ángulos, a veces flexibles, peciolos cortos, raramente más de 1 centímetro de largo, espinosos o no. Hojas inferiores ovaladas o elípticas, hasta 14 centímetros de largo y 8 centímetros de ancho, pero habitualmente más cortas; ápice agudo, redondeado y puntiagudo, base cordiforme, hojas superiores más pequeñas, ovaladas o lanceoladas, cilíndricas en el ápice, venas del envés con espinas. Pedúnculos estaminados de 8 milímetros de largo más o menos, peciolos más largos, pedicelos capilares de 5-13 milímetros de largo, perianto segmentado, ovado-oblongo, filamentos más largos que las anteras. Bayas negras, globosas, de 4-12 milímetros de diámetro. Es nativa de México y Centro América. Se encuentra en bosques o malezas húmedas o secas hasta 2,800 metros sobre el nivel del mar. En Guatemala se ha descrito en Petén, Alta Verapaz, Izabal, Zacapa, Juliapa, Santa Rosa, Guatemala, Suchitepéquez, Retalhuleu, Quetzaltenango y Huehuetenango (3,4).

3.1.2 Actividad antimicrobiana

El estudio de la actividad antimicrobiana in vitro de las plantas medicinales se ha encontrado

con algunos problemas debido a la diversidad de criterios, técnicas empleadas y a las propiedades lipofílicas de algunas muestras. La insolubilidad en agua de los aceites esenciales y los extractos no polares hacen bastante difícil usar un medio acuoso para las distintas pruebas (5).

Existen varios factores que pueden tener influencia directa sobre los resultados, entre estos se puede mencionar el volumen del inóculo, métodos de extracción, la composición del medio de cultivo, el pH y la temperatura de incubación (5,6).

Hasta el momento no existe un método estandarizado para expresar los resultados del tamizaje antimicrobiano, algunos autores usan el diámetro de los halos de inhibición o el peso mínimo del extracto que inhibe el crecimiento del microorganismo (5,6)

Los métodos para evaluar la actividad antimicrobiana se pueden clasificar en tres grupos: difusión, dilución y métodos bioautográficos.

Los métodos de difusión sobre capa de agar, no requieren una dispersión del agua, en el cual se usa un disco, agujero o cilindro como reservorio. El reservorio contiene la muestra a ser analizada, luego es puesto en contacto con el medio inoculado y después de la incubación, se mide el diámetro de inhibición de éste.

Los métodos de dilución requieren una dispersión homogénea de la muestra en agua. Se utilizan para determinar principalmente los valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) de extractos de aceites esenciales o sustancias puras.

En la dilución líquida, la turbidez se toma como un indicador de densidad bacteriana, el grado de inhibición está relacionado con la turbidez del medio y se mide con la ayuda de un espectrofotómetro.

Si se usa dilución en agar, una cantidad determinada de la sustancia se mezcla con el agar, se deja endurecer y se coloca el microorganismo, si no hay crecimiento la sustancia tiene actividad antimicrobiana (5).

Los métodos bioautográficos se basan en la técnica de difusión en agar, en los cuales el compuesto antimicrobiano se transfiere de una capa de cromatografía a una capa de agar

inoculado, las zonas de inhibición se visualizan por reactivos que detectan la actividad de deshidrogenasa (5).

Domínguez probó el efecto inhibitorio de extractos de plantas en bacterias y hongos colocando círculos de papel filtro impregnados con 0.5 mililitros de soluciones etanólicas (el etanol fue evaporado) de los extractos de las plantas en cajas de agar nutritivo o de papa que habían sido previamente inoculados, las cajas fueron incubadas 24 horas a 37°C y luego se midió el diámetro de la zona de inhibición (6).

Luc Van Puyvelde realizó estudios sobre la determinación de la actividad antimicrobiana de un compuesto de Tretanemia riparia, por método de dilución usando 0.1 mililitros de una suspensión estandarizada del microorganismo que fue agregado a tubos que contenían diversas cantidades de medio de cultivo, los tubos se incubaron por 24-48 horas a 37°C para las bacterias y 7 días a 27°C para hongos, se determinó el CIM a la menor concentración que inhibió el crecimiento (7).

MacRae y Janssen realizaron estudios de tamizaje antimicrobiano de diversas plantas, contra bacterias y hongos.

MacRae y col. ensayaron el método de discos de papel para bacterias y levaduras, los discos estériles de papel Whatman No. 1 se impregnaron con extractos (100mg/ml) en alícuotas de 10 microlitros y se colocaron en placas con Agar Nutritivo o Sabouraud-Dextrosa según el caso lo ameritara, los ensayos se realizaron por triplicado, las cajas se incubaron a 30°C de 24-48 horas y luego se midieron los diámetros de las zonas de inhibición; para los dermatofitos se prepararon suspensiones de esporas de cultivos maduros y alícuotas de éstas se transfirieron a Agar Sabouraud que contenía el extracto de la planta a ensayar, las cajas se incubaron a 20°C por 14 días luego de los cuales se midió el diámetro de la colonia (8). Janssen y col. ensayaron la actividad antimicrobiana usando diferentes técnicas sobre capa de agar con discos impregnados con 2.5 microlitros de los aceites esenciales aislados de las plantas diluidos en etanol.

La técnica del biograma usando placas de cromatografía en capa fina a las que se les aplicó

los aceites a estudiar, se dejó correr, secar y luego se puso en contacto con agar inoculado con el microorganismo ensayado, midiendo luego las zonas de inhibición (9).

Holt describió un método para evaluar la acción de drogas antifúngicas utilizando pruebas de sensibilidad en disco, usando la técnica de difusión en la que el inóculo del hongo se enfrenta a una zona variable de concentraciones de droga que se difunden radialmente del reservorio de la droga, se hacen suspensiones del hongo en amortiguador de fosfato, se estandarizan y una capa de 0.2 mililitros de la suspensión se coloca sobre placas de Agar Base Nitrógenada para Levaduras, cuando el fluido se ha absorbido en el agar, se colocan los discos impregnados con 30 microlitros de la droga, se incuban las cajas por 24 horas a 30°C para levaduras, después de las cuales se obtienen zonas de inhibición con organismos sensibles (10).

Chaumont y Bardey estudiaron las propiedades antifúngicas de aceites esenciales de plantas, prepararon suspensiones de blastosporas y de conidiosporas para luego determinar el CIM usando como medio Sabouraud para obtener diferentes diluciones (11).

3.1.3 Componentes Químicos del género Smilax

La raíz contiene glicósidos, saponinas, como las sarsaponina y parillina, que dan por hidrólisis sapogeninas isoméricas como sarsapogenina y smilagenina, aceite esencial como B-sitosterol, stigmasterol, sitosterol-D-glicósido, ácido sarsápico, resinas (1.25%), azúcares y grasas (3,12). La actividad antimicrobiana se atribuye a varias de las saponinas que contiene, pero en particular la parillina (3,13). También se encuentra almidón y materia colorante.

En el anexo 1 se presentan las características químicas de los compuestos con actividad biológica (13-14).

3.1.4 Usos Medicinales Populares

En medicina popular, la raíz de zarzaparilla es usada por sus propiedades estimulantes, diuréticas, diaforéticas y depurativas de la sangre (2,15). El cocimiento de las raíces se utiliza para combatir la sífilis, herpes, lepra, tiña, eccema, acné nervioso y urticaria.

La infusión de las hojas y de los tallos tiernos se usa para contrarrestar las úlceras de la boca (16-17).

La British Herbal Pharmacopoeia, le adjudica acción antiséptica y antipruriginosa, específica en casos de psoriasis (18).

También es un buen coadyuvante en el tratamiento del reumatismo, la artritis, la gota y las acumulaciones de ácido úrico. En dosis elevadas destruye los cálculos renales y evita la diabetes (2,16,18).

3.1.5 Otros Usos Populares

Las raíces cocidas y sazonadas con azúcar y canela sirven para preparar un refresco popular que también se ha comercializado (19).

3.1.6 Farmacología Experimental

Estudios microbiológicos efectuados demuestran que el extracto alcohólico de la raíz de Smilax lundellii y Smilax regellii, posee una amplia actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro*, inhibiendo el crecimiento de bacterias Gram negativo como Pseudomona aeruginosa, Salmonella typhi, y Shigella flexneri (20), Gram positivo como Staphylococcus aureus y Streptococcus pyogenes (21), Candida albicans (22), y dermatofitos (23). En un estudio de 20 cepas de bacterias patógenas, el extracto metanólico demostró un espectro de inhibición del 85% de cepas de Pseudomonas aeruginosa, 80% de salmonella typhi y 70% de Staphylococcus aureus (24).

Estudios efectuados con Smilax spinosa demuestran que la decocción de la raíz inhibe el crecimiento *in vitro* de microorganismos causales de infecciones de la piel y mucosas, como Escherichia coli y Microsporium canis, así mismo, aumenta la excreción urinaria en ratas. La DL50 por vía oral en ratas, de las tres especies estudiadas en Guatemala es mayor de 30g/kg de peso (25).

En 1983, Girón demostró que el extracto etanólico de la raíz de Smilax lundellii posee únicamente actividad fungistática (26).

En Marruecos se han tratado exitosamente pacientes con lepra usando una combinación de

extracto de Smilax ornata y una terapia con dapsona (27).

3.2 *Microorganismos Patógenos al Hombre*

3.2.1 Staphylococcus aureus

El S. aureus es un coco inmóvil de 0.8 a 1.0 μm de diámetro, que se divide en dos planos irregulares, para formar racimos de células. Los racimos se encuentran en forma característica en extendidos de cultivos en medios sólidos. En caldos de cultivo, son comunes encontrar cadenas cortas y las formas diplócocicas y a menudo se observa una semejanza con los neumococos.

Unas pocas cepas producen una cápsula o capa de mucosa que incrementa la virulencia del microorganismo. El S. aureus es una bacteria Gram positivo, pero las células viejas y los organismos fagocitados son Gram negativo.

Es un anaerobio facultativo, pero se obtiene un crecimiento más abundante en condiciones aeróbicas. Para su crecimiento en medios químicamente definidos requiere aminoácidos y vitaminas a pesar de lo cual crece bien en los medios utilizados de rutina. En placas de agar sangre, las colonias son lisas, circulares, convexas, bajas y varían de 1-4 milímetros de diámetro, el color de muchas cepas es amarillo pálido,

Es un componente normal de la microbiota humana, pero si se dan las condiciones adecuadas puede producir diversas enfermedades como osteomielitis, piaritis, enterocolitis, infecciones cutáneas y respiratorias. Puede producir infecciones en cualquier área paranasofaríngea, siendo la sinusitis la más común (28).

3.2.2 Salmonella typhi

Las Salmonellas infectan a muchas especies de animales, además del ser humano y son capaces de invadir tejidos extraintestinales, causando fiebres entéricas, la más severa de las cuales es la fiebre tifoidea. Esta bacteria no fermenta la lactosa, muchas son móviles y producen H_2S de tiosulfato y gas de la fermentación de la glucosa. Es un bacilo Gram negativo

pequeño.

La S. typhi causa la fiebre tifoidea la que se caracteriza por constipación, y diarrea en la primera semana, luego se produce una prolongada bacteremia. Además produce gastroenteritis y septicemia (28).

3.2.3 Shigella

Las shigellas son patógenas principalmente a los humanos, las cuatro especies pueden causar disenteria bacilar, pero la severidad de la enfermedad varía con las especies.

Son inmóviles, no producen H₂S, no producen gas durante la fermentación de los hidratos de carbono, son pequeños bastones Gram negativo de 0.5 por 3 μm, no forman esporas, causa la disenteria bacilar, diarrea dolorosa caracterizada por heces acuosas teñidas de sangre, moco y grupos de leucocitos polimorfonucleares al ser vistos al microscopio.

La S. flexneri es la especie de shigella que se presenta con mayor frecuencia en Guatemala (29).

3.2.4 Pseudomonas aeruginosa

Esta es una bacteria causante de infección dermatomucosa. Es un bacilo recto o ligeramente curvo, Gram negativo, no produce esporas, con flagelos polares monotricos, móvil, catalasa positivo, crece a 42°C., produce dos pigmentos, la piocianina y la pioverdina que la hacen fluorescente. Los pacientes se vuelven susceptibles al ataque de la P. aeruginosa luego de tratamientos prolongados con inmunosupresores, corticosteroides, antimetabolitos, antibióticos y radiaciones.

Puede contaminar heridas, úlceras, abscesos, quemaduras de piel y , mucosas (30).

3.2.5 Candida albicans

Es un habitante de la microbiota normal del tracto gastrointestinal, piel y vagina. Las

levaduras o blastosporas son redondas, ovales u oblongas. Mide de 2.5 por 14 μm , aparecen solas, en grupos o bien 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, de 24 a 36 horas aparecen colonias pequeñas, que llegan a tener 1.5 a 2 milímetros de diámetro después de 5-7 días en agar Sabouraud. Las colonias son de color blanco pero pueden virar a crema o beige con el tiempo (30,31).

C. albicans es el patógeno más importante de las especies de Candida (32). Se han reportado estudios en donde se ha aislado en un 51% de las candidosis (33). Es el agente etiológico usual del Trush oral o vaginal, candidosis dérmica, paroniquia y candidosis broncopulmonar (32).

Es una de las especies que más afectan al sistema nervioso central (34). Se ha determinado que la principal especie encontrada en micosis viscerles, abscesos cerebrales, renales y pleurales es la C. albicans (35,36).

3.2.6 Aspergillus flavus

Esta especie de hongo, es cosmopolita, son parásitos del árbol respiratorio de las aves. En la naturaleza se encuentran muy difundidos en la materia orgánica vegetal y animal. El hombre suele infectarse por inhalación de polvos de harina o al manipular gramíneas.

Las colonias crecen rápido y presentan una tonalidad amarilla, marrón o verde-amarillo. El A. flavus es una causa común de aspergilosis pulmonar alérgica y puede recuperarse de esputo o tapones mucosos bronquiales.

La presencia de numerosos eosinófilos y cristales de Charcot-Leyden en montajes microscópicos de esputo es altamente sugestiva de infección con A. flavus. También puede causar enfermedad diseminada en hospederos inmunocomprometidos (37).

En casos de diseminación, se producen abscesos en muchos tejidos, pudiendo ocasionar también meningitis y endocarditis (31,37,38).

3.2.7 Epidermophyton floccosum

Es un hongo de crecimiento lento, su colonia es de color blanco y de apariencia algodonosa al principio, luego se toma seca y aterciopelada, de color verdusco a canela, la superficie es plana o radiada y en el reverso presenta un pigmento de color café canela.

Tiene macroconidias numerosas, las que en cultivos jóvenes son aseptadas en forma de dedo, en grupos de 2 o 3 y luego toman forma de clava. Las microconidias están ausentes, las hifas en forma de espiral son muy raras, las clamidosporas sólo aparecen en cultivos viejos.

Para su cultivo no requiere de condiciones nutricionales especiales. Es un agente común de tinea pedis, tinea cruris y de tinea inguim.

No invade pelo, es un hongo antropofílico (30,31). Su frecuencia de aislamiento en Guatemala es del 16.3% (39).

3.2.8 Mycrosporium gypseum

Es un hongo geofílico, muchas cepas de M. gypseum producen densos conglomerados de macroconidias, pero algunas veces puede haber muchas microconidias. Esto lleva a un aspecto mucho más granuloso de la colonia. La superficie de la colonia es granulosa y de color marrón-crema.

El M. gypseum es un saprófito del suelo, que ataca al hombre sólo ocasionalmente, las lesiones producidas por el hongo son a menudo inflamación con foliculitis supurativas (30).

3.2.9 Trichophyton rubrum

Las colonias son de crecimiento lento, planas o abultadas en el centro, con una superficie blanca algodonosa que se torna rosada, puede tener mucho o poco micelio.

En el reverso tiene un pigmento color rojo tinto en el 95% de las cepas, el 5% restante de las cepas tienen un color más café o no lo poseen. Las microconidias son delgadas en forma de clava, adheridas en forma alterna a hifas indiferenciadas o en cortos tallos.

No tienen macroconidias, salvo la cepa africana que las tiene abundantemente alargadas y

enlongadas. No requiere de condiciones especiales de nutrición, es un agente común de tineas de piel, uñas y menos frecuente de pelo, ocasionalmente parasita animales. Es un hongo antropofílico (30). Su frecuencia en Guatemala es del 73.6% (39).

3.3 Tratamientos Antimicrobianos

3.3.1 Infecciones causadas por bacterias gram positivo

En el manejo de las infecciones causadas por S. aureus localizadas, el principio básico del tratamiento es el drenaje adecuado.

La eritromicina y la novobiocina son eficaces en infecciones cutáneas, dado que el microorganismo desarrolla resistencia al antibiótico en 7-10 días; se debe emplear otro tratamiento si éste se extiende por más tiempo.

En caso de otro tipo de infección más severa se debe principiar con un antibiótico penicilino-resistente como la metilicina, oxacilina o cefalotina (28).

3.3.2 Infecciones causadas por bacterias gram negativo

Para el tratamiento de salmonelosis en caso de fiebre entérica o septicemia, la ampicilina o el cloranfenicol son las drogas de elección, también puede utilizarse trimetoprim-sulfametoxazol.

En caso de gastroenteritis no complicada el uso de antibiótico sólo sirve para prolongar el estado de portador, por lo que no es recomendable (28).

Debido a la naturaleza autolimitante de la shigelosis muchas personas no buscan tratamiento, sin embargo el uso de antibióticos disminuye la severidad y mortalidad, particularmente en niños.

La ampicilina, tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol han sido efectivos para el tratamiento, pero es necesario realizar pruebas de susceptibilidad antibiótica para mayor seguridad (28).

Algunas cepas de P. aeruginosa han desarrollado resistencia a los antibióticos, por lo que son muy peligrosas en infecciones nosocomiales.

En general las Pseudomonas son sensibles a los aminoglucósidos, entre los que podemos mencionar la amikacina, gentamicina, carbenicilina y kanamicina (40).

3.3.3 Infecciones causadas por levaduras

El tratamiento indicado para la infección producida por las diferentes especies de Candida son los antibióticos poliénicos, los imidazoles y la 5-fluorocitocina (41).

Los antibióticos poliénicos tales como la nistatina y la anfotericina B son antifúngicos derivados de Streptomyces nodosus y actúa aumentando la permeabilidad de la membrana celular de los hongos, lo que provoca que pierdan sustancias vitales para su metabolismo (41).

La nistatina es utilizada tópicamente para el tratamiento activo y profilaxis de candidosis bucal, vaginal y cutánea (32,41,42). El tratamiento se efectúa en forma local porque no se absorbe cuando se ingiere por vía oral (38).

La anfotericina B se prescribe en las candidosis sistémicas (32,43-46). También puede utilizarse una combinación de anfotericina B y rifampicina (47), o anfotericina B y 5-fluorocitocina (44).

Los imidazoles como el clotrimazol, miconazol y quetoconazol, son antimicóticos de amplio espectro con acción antifúngica y antibacteriana. Producen cambios metabólicos y estructurales en las especies de Candida (43,46,48,49).

Tales sustancias poseen dos ventajas principales sobre cualquier tratamiento preexistente, son lo suficientemente inocuas como para preconizar su utilización intravenosa, incluso en pacientes gravemente enfermos. El quetoconazol no sólo comparte estas características de inocuidad sino que tiene la propiedad de ser el primer antimicótico relativamente no tóxico, efectivo por vía oral (46).

El clotrimazol se prescribe en candidosis superficial (43,50). El miconazol en candidosis superficial y sistémicas (50). El quetoconazol en candidosis sistémicas (46).

3.3.4 Infecciones causadas por dermatofitos

3.3.4.1 Antimicóticos naturales

3.3.4.1.1 Griseofulvina

Es un agente sistémico que se usa para tratar micosis superficiales que no responden a tratamientos tópicos.

Se obtiene del Penicilium griseofulvum, Penicilium nigricans y Penicilium raistrickii. Dicha droga actúa a nivel de la pared celular, interfiere con la síntesis de ácidos nucleicos (51).

3.3.4.2 Antimicóticos sintéticos

3.3.4.2.1 Fluorocitocina

Es un antimicótico oral que se puede utilizar sólo o en combinación con anfotericina B. Su acción se basa en la alteración de la síntesis de proteínas en el ARN del hongo y en una síntesis alterada de ADN fúngico (51,52).

3.3.4.2.2 Imidazoles

Existen alrededor de 40 derivados de los imidazoles que han reportado una potente actividad no sólo contra dermatofitos y levaduras sino también sobre algunas bacterias.

Los más conocidos y utilizados son clotrimazol (canestén), que se utiliza en preparaciones tópicas, el miconazol y ketoconazol que se administran por vía oral, para las micosis sistémicas y los más recientes derivados triazólicos como el fluconazol y el terconazol, que se utilizan en candidosis vaginal y micosis sistémicas. El itraconazol que se utiliza para el tratamiento de dermatofitos, dichos agentes actúan inhibiendo la síntesis de esteroides fúngicos (51).

3.4 Actividad Antimicrobiana

3.4.1 Actividad antimicrobiana de extractos vegetales in vitro

En la literatura mesoamericana se mencionan diversas plantas utilizadas en el tratamiento de infecciones respiratorias y gastrointestinales (23).

Entre los agentes antibacterianos de origen vegetal, en el listado nacional de las plantas medicinales en Guatemala, se mencionan 385 plantas utilizadas para el tratamiento de afecciones gastrointestinales. Se han investigado 80 plantas de las cuales 33 reportaron inhibición del crecimiento *in vitro* de las enterobacterias ensayadas (53).

De las 203 plantas usadas popularmente para el tratamiento de infecciones respiratorias, se estudiaron 67, de las cuales únicamente 16 demostraron tener actividad inhibitoria de algunas de las bacterias ensayadas (53). Por ejemplo Tagetes lucida, Psidium guajava, Mangifera indica y Plantago major presentaron inhibición del crecimiento *in vitro* de por lo menos tres enterobacterias que causan infecciones gastrointestinales.

Eucalyptus globulus, Lippia alba y Salvia officinalis inhibieron el crecimiento *in vitro* de S. aureus y S. pyogenes dos microorganismos causantes de infecciones respiratorias (53).

Extractos alcohólicos de Smilax lundellii y Smilax regelii demostraron tener amplia actividad antibacteriana *in vitro*. Inhibiendo el crecimiento de bacterias Gram negativo como P. aeruginosa, S. typhi, S. dysenteriae y S. flexneri. Bacterias Gram positivo como S. aureus y S. pyogenes (20,21,24).

Estudios efectuados con Smilax spinosa demuestran que la decocción de la raíz inhibe el crecimiento *in vitro* de microorganismos causales de infecciones de la piel y mucosas como la E. coli.

Cáceres y col. estudiaron la actividad de 68 plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de enfermedades respiratorias. Para dicho estudio se utilizaron las bacterias Gram positivo S. aureus, S. pneumoniae y S. pyogenes. Obteniéndose los siguientes resultados de inhibición del crecimiento: S. aureus (27.1%); S. pneumoniae (25%) y S. pyogenes (14%).

Las plantas que mostraron mayor actividad contra las bacterias ensayadas fueron: Physalis philadelphica, Eucalyptus globulus, Gnaphalium viscosum, Lippia alba, Lippia dulcis, Salvia officinalis, Satureja brownei, Solanum nigrescens y Tagetes lucida (21).

MacRae y col. colectaron material de 34 especies de plantas Amazónicas de la familia Euphorbiaceae. Los extractos obtenidos los enfrentaron contra las bacterias E. coli y S. aureus,

los resultados obtenidos demuestran la actividad antibacteriana de los extractos, E. coli (6%) y S. aureus (76%) (8)

Estudios de la actividad antibacteriana in vitro demuestran que la maceración hidroalcohólica de la raíz de Smilax lundellii posee actividad contra P. aeruginosa, S. aureus, S. typhi, S. dysenteriae, S. flexneri y S. pyogenes (54), pero no tiene actividad contra V. cholera (55).

Estudios preliminares indican que la decocción del rizoma de Smilax lundellii posee cierta actividad inmunomoduladora en ratones, medida por un aumento en la población de linfocitos y en los títulos de anticuerpos séricos (56).

3.4.2 Actividad antifúngica vegetal in vitro

En la literatura mesoamericana se mencionan diversas plantas usadas popularmente como antifúngico, Artocarpus altilis, Cryptostigia landiflora, Argemone mexicana y Anacardium occidentale (23).

Martínez hace mención de varias plantas utilizadas en México como antimicótico, entre las cuales menciona Brassica alba, Persea gratissima y Raphanus sativus (57). De la Rosa describe a Pelargonium inguinans (58), Díaz menciona a Artemisa mexicana (59). Carvajal menciona a Solanum dulcamara para el tratamiento de enfermedades secas de la piel (60).

En Guatemala se han realizado algunos estudios de plantas medicinales, utilizadas para el tratamiento de infecciones producidas por dermatofitos y levaduras. El extracto alcohólico de la raíz de Smilax lundellii demostró tener actividad antimicótica, inhibiendo el crecimiento de C. albicans (22,53).

Así mismo estudios de Smilax spinosa demostraron que la preparación acuosa de la raíz inhibe el crecimiento in vitro de M. canis (25). Otros estudios con Byrsonima crassifolia y Malpighia glabra demuestran tener actividad inhibitoria contra dermatofitos como E. floccosum, M. canis, T. rubrum, M. gypseum, T. mentagrophytes variedad algodonosa y T. mentagrophytes variedad granulare (61)

Investigaciones de la actividad antimicótica in vitro demuestran que la decocción y el

extracto metanólico de rizomas de Smilax lundellii tienen actividad contra C. albicans, C. krusei, C. parapsilosis y C. stellatoidea, con una CIM de 1-2mg (55,62).

La decocción del rizoma de Smilax regelii tiene actividad contra C. albicans, E. floccosum, M. canis, T. mentagrophytes y T. rubrum, con una CIM de 900 mg y actividad fungicida. La decocción del rizoma de Smilax spinosa tiene actividad contra M. canis (63).

Estudios clínicos efectuados en el tratamiento de 50 pacientes con vaginitis por C. albicans, demuestran que los óvulos vaginales a base de maceración hidroalcohólica del rizoma de Smilax lundellii, se comporta en forma similar al fármaco de referencia Nystatina (64).

En otro ensayo se probó el tratamiento con una crema a base de la maceración hidroalcohólica de Smilax lundellii, tomaron parte en dicho estudio 76 trabajadores de dos industrias de alimentos que presentaban pie de atleta clínicamente, en todos los casos se confirmó una infección dermatofítica por KOH y cultivo. Se demostró una mejoría similar al fármaco de referencia Tolnaftato, después de 15 días de tratamiento, aunque no se demostró negativización al examen con KOH o cultivo (65).

4. JUSTIFICACIONES

En nuestro país las enfermedades respiratorias y gastrointestinales son las principales causas de morbilidad y mortalidad. Además, las infecciones de la piel son frecuentes en nuestro medio.

Los tratamientos para estas enfermedades en la actualidad resultan de difícil acceso para la mayoría de la población, debido a su elevado costo, así como los efectos iatrogénicos que en ocasiones provocan.

Como alternativa tenemos la medicina natural, la cual representa una vía por medio de la cual un elevado número de la población podría tomar su tratamiento a un costo menor.

Con el estudio de las plantas medicinales con propiedades antimicrobianas, se demuestra científicamente lo que se ha venido utilizando por años como parte de nuestra herencia cultural. En estudios previos in vitro se demostró la actividad antimicrobiana de extractos de raíz y rizoma de diferentes especies del género Smilax. En el presente estudio se investigó los extractos de otros órganos de la planta, para determinar si poseen actividad antimicrobiana. La obtención de los resultados esperados, tendrá un profundo efecto en la ecología, por cuanto no será necesario destruir completamente la planta para obtener su producto medicinal; sino que únicamente será necesario cortar hojas y tallo.

Además, abriría las puertas para su uso comercial, ya que actualmente las plantas utilizadas en estos procesos son de crecimiento silvestre, las que han necesitado entre 25 y 30 años para su desarrollo.

5. OBJETIVOS

5.1 *Objetivo General*

Demostrar la actividad antimicrobiana in vitro de plantas medicinales de uso popular en Guatemala.

5.2 *Objetivos Específicos*

5.2.1 Comprobar la actividad antimicrobiana de extractos de rizoma y raíz de diferentes especies del género Smilax.

5.2.2 Demostrar la actividad antimicrobiana de extractos de hojas y tallo de Smilax lundellii, Smilax regelii y Smilax spinosa.

5.2.3 Determinar que órgano de la planta del género Smilax, posee mayor actividad antimicrobiana.

6. HIPOTESIS

Tanto los extractos las partes aéreas (hojas y tallo), así como los rizomas y raíces de las diferentes especies del género Smilax, poseen actividad antimicrobiana.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 *Universo de Trabajo*

El universo de trabajo estuvo constituido por microorganismos patógenos al ser humano: bacterias Gram positivo, bacterias Gram negativo, Candida albicans y dermatofitos.

Plantas del género Smilax que en estudios anteriores han demostrado actividad antimicrobiana.

7.2 *Muestras*

Extractos de cuatro órganos de Smilax lundellii, Smilax regelii y Smilax spinosa (raíz, rizoma, tallo y hojas).

Cuatro especies de dermatofitos y un hongo levaduriforme, que frecuentemente causan enfermedad al hombre, en Guatemala: A. flavus, E. floccosum, M. gypseu, T. rubrum y C. albicans.

Tres especies de bacterias Gram negativo: P. aeruginosa, S. typhi y S. flexneri.

Una especie de bacteria Gram positivo: S. aureus.

7.3 *Recursos*

7.3.1 Humanos

7.3.1.1 Luis Alfonso Pineda, autor del presente estudio

7.3.1.2 Lic. Armando Cáceres, asesor del estudio

7.3.1.3 Ing. Irina Johler, colaboradora

7.3.1.4 Laboratorio y Droguería de Productos Fitoterapéuticos, FARMAYA

7.3.2 Institucionales

7.3.2.1 Biblioteca del Centro de Estudios Mesoamericanos de Tecnología Apropriada CEMAT

7.3.2.2 Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala

7.3.2.3 Biblioteca del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, INCAP

7.3.2.4 Herbario de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala

7.3.3 Materiales

Materia vegetal

Etanol al 50%

Balanza analítica

Cajas de petri

Medio Mueller Hinton

Medio Tripticasa soya

Medio de Saboraud

Hisopos estériles

Papel filtro Whatman No.1

Incubadora para 27 °C

Incubadora para 35 °C

Campana de flujo laminar

Pipetas calibradas

Jeringas

Corchos

Removedores

Manguera de suero

Frascos de color ambar de 20 ml.

Autoclave

Tubos de hemólisis

Aza calibrada

Espectrofotómetro

7.4 Procedimiento

7.4.1 Se revisó literatura sobre las plantas seleccionadas para el presente estudio.

7.4.2 Se recolectó, identificó y elaboró el herbario en Farmaya con las plantas seleccionadas.

7.4.3 Se secó y pulverizó las partes de las plantas a utilizar.

7.4.4 La extracción del principio activo de las partes aéreas y terrestres de las diferentes especies del género Smilax; se realizó por el método descrito por Mitscher et al (66), para el tamizaje de actividad antimicrobiana de extractos vegetales. Las concentraciones utilizadas fueron de 10mg/ml para bacterias y 15mg/ml para dermatofitos.

Se pesaron 10 gramos del pulverizado de cada órgano, a los cuales se agregaron 90 ml. de una solución hidroalcohólica de etanol al 50%, dicha solución se agregó en tres etapas, la primera de 40 ml., la segunda de 30 ml. y la tercera de 20 ml. Entre cada adición de la solución se dejó reposar 24 horas y luego se efectuó la extracción. La misma se filtró por gravedad con papel Whatman No. 1.

7.4.5 Preparación del inóculo de bacterias y levaduras

Se purificó el microorganismo a ensayar e inoculó en un tubo con agar tripticasa soya, incubó a 35 °C en el caso de las bacterias por 24 horas, en el caso de de las levaduras se incubó 48 horas. Luego se inoculó un erlenmeyer de 25 ml. conteniendo 10 ml. de caldo tripticasa soya con una asada del cultivo microbiano, se incubó a 35 °C durante 24 horas. En el caso de las bacterias se diluyó 100 microlitros de esta suspensión en 10 ml. de solución salina estéril, y para las levaduras se diluyó 1 ml. de la suspensión en 10 ml. de solución salina estéril.

7.4.5.1 Preparación de cajas con agar-extracto para bacterias y levaduras

Se puso 9 ml. de agar Mueller Hinton y 1 ml. de extracto. Se agitó suavemente para homogenizar el medio, se dejó solidificar e incubó a 35 °C durante 24 horas, luego se verificó que no hubiera crecimiento, se almacenó en refrigeración hasta el momento de su análisis.

7.4.5.2 Demostración de la actividad

Se verificó que las cajas conteniendo el extracto estuvieran libres de cualquier contaminación. Se inoculó una asada de cada uno de los microorganismos, siguiendo un patrón radial de ocho partes iguales con una zona clara en el centro de la caja (anexo 2).

Se dejó reposar 5-10 minutos e incubó a 35 °C durante 24 horas.

7.4.6 Preparación del inóculo de dermatofitos

Se obtuvo cultivos puros en agar Saboraud de los dermatofitos a ensayar para preparar suspensiones de esporas. A los tubos con el cultivo del hongo se agregó agua destilada estéril con 0.05 por ciento de Tween 80, para reducir la tensión superficial de las esporas. Cada tubo se agitó por dos minutos y se ajustó la transmitancia de la suspensión hasta alcanzar un 80% a 530 nanómetros.

Cuando fue necesario se agregó agua destilada para diluir la suspensión. La densidad de la suspensión debe ser aproximadamente 10 células/mililitro. Como blanco se usó agua destilada con Tween 80 que se agitó en un tubo con agar Saboraud sin cultivo.

7.4.6.1 Preparación del agar-extracto para dermatofitos

En tubos de ensayo conteniendo 13.5 ml. del medio Saboraud estéril, aproximadamente a 50 °C, estando aún líquido, se agregó 1.5 ml. del extracto del órgano de la planta a ensayar (dilución 1:10). Se homogenizó y se vertió sobre cajas de petri estériles, se dejó solidificar por una hora. Se incubó a 35 °C durante 24 horas, se verificó que no existiera contaminación, luego se refrigeró por lo menos cuatro horas. Posteriormente se hicieron 4 agujeros equidistantes en el agar de cada caja, con la boca de un tubo de hemólisis de 10 milímetros de diámetro (anexo 3). Las cajas se guardaron en refrigeración hasta el momento de la prueba.

7.4.6.2 Demostración de la actividad

Con una pipeta estéril se transfirieron 30 microlitros de la suspensión de esporas a cada uno de los agujeros perforados en el agar con el extracto del órgano de la planta, se obtuvieron

cuatro repeticiones de cada reto, las cajas se incubaron por 14 días a 27 °C.

Se utilizó como control negativo: cajas conteniendo agar Saboraud sin el extracto de la planta, inoculadas como en el procedimiento anterior.

7.4.7 Concentración Inhibitoria Mínima

7.4.7.1 Preparación de los inóculos

Se prepararon tal como se describe en 6.4.5 y 6.4.6

7.4.7.2 Preparación de las cajas con agar-extracto

Para bacterias y levaduras se utilizaron cuatro cajas con diferentes volúmenes de extracto de cada órgano de la planta y de agar para obtener las concentraciones siguientes: 1:10, 9 ml. de agar + 1ml de extracto; 1:20, 9.5 ml. de agar+ 0.5 ml. de extracto; 1:40, 9.75 ml. de agar + 0.25 ml. de extracto; 1:80, 9.875 ml. de agar + 0.125 ml. de extracto o hasta donde fuese necesario. Las cajas se incubaron a 35°C por 24 horas, luego se verificó que no hubiera crecimiento y almacenó en refrigeración hasta el momento de su análisis.

Para los dermatofitos se utilizaron diferentes volúmenes de agar y extracto, para obtenerlas siguientes concentraciones: 1:10, 13.5 ml. de agar + 1.5 ml. de extracto, 1:15, 14 ml. de agar + 1 ml de extracto; 1:30, 14.5 ml. de agar + 0.5 ml. de extracto; 1:60, 14.75 ml. de agar + 0.25 ml. de extracto. Se dejó solidificar y posteriormente se perforaron cuatro agujeros equidistantes, con un tubo de hemólisis de 10 milímetros de diámetro. Las cajas se incubaron a 35 °C por 24 horas, se verificó que no hubiera crecimiento y finalmente se almacenaron en refrigeración hasta el momento de la prueba.

7.5 *Diseño Experimental*

El diseño experimental empleado fué en bloques completamente al azar, en el que los bloques los constituyeron los microorganismos y los tratamientos los extractos de los diferentes órganos de la planta a estudiar, para ello se efectuaron cuatro repeticiones.

Prueba Binomial

Variable respuesta: Crecimiento (no inhibición) o no crecimiento (inhibición)

p = probabilidad de éxito (inhibición) = 0.5

q = probabilidad de fracaso (no inhibición) = 0.5

$q = 1 - p$

Para "n" ensayos:

$H_0: p = 0.5$ (No existe efecto inhibitorio)

$H_a: p > 0.5$ (Si existe efecto inhibitorio)

α = Probabilidad de concluir que el resultado de "n" ensayos es positivo cuando no lo es (rechazo de la H_0 cuando es verdadera)

$\alpha = 0.1$

Si $p <$ Rechazo de H_0

Si cuatro ensayos son + $p = 0.063$

Si son tres + y uno - Hacer tres repeticiones más, esperando que el negativo se mantenga (anexo 4)

Para la demostración de la actividad de los dermatofitos se utilizó como criterio para clasificar la respuesta:

Exito = (diámetro de crecimiento menor del 25% respecto al control)

Fracaso = (diámetro de crecimiento mayor del 25% respecto al control)

Para la CIM se efectuará el análisis de las diluciones ensayadas, de igual forma que para la demostración de la actividad de los dermatofitos.

8. RESULTADOS

En este estudio se seleccionaron varias partes de las plantas del género Smilax, dos de las cuales en estudios anteriores (raíz, rizoma) ya se había demostrado su actividad antimicrobiana.

El propósito fue el de determinar la posible actividad antibacteriana, antilevadura y antifúngica in vitro de extractos de raíz, rizoma, tallo y hojas; contra cepas de bacterias Gram positivo, Gram negativo, Candida albicans y dermatofitos.

Los extractos que presentaron actividad contra bacterias Gram positivo fueron: raíz de S. regellii, y la mayor actividad contra estas bacterias la presentó el rizoma de S. lundellii (anexo 5).

Los extractos que presentaron actividad contra bacterias Gram negativo fueron: el rizoma de S. lundellii que demostró actividad contra todas las bacterias en estudio, mientras que el extracto de raíz de S. spinosa demostró actividad únicamente contra la P. aeruginosa (anexo 5).

Contra la Candida albicans únicamente el extracto de rizoma de S. lundellii demostró tener actividad (anexo 5).

De los extractos que presentaron actividad antifúngica in vitro únicamente la raíz de S. regellii demostró tener actividad contra todos los dermatofitos ensayados.

El extracto de raíz y rizoma de S. lundellii presentaron actividad contra tres dermatofitos, y el extracto de raíz S. spinosa presentó actividad contra dos dermatofitos (anexo 6).

El extracto de tallo presentó cierta actividad antimicrobiana, mientras que las hojas no demostraron actividad (anexo 5, 6).

Los resultados obtenidos de las CIM para bacterias, levaduras y dermatofitos se presentan en los anexos 7 y 8 respectivamente; donde se puede apreciar cuales son los extractos de los órganos de la planta, que presentan mayor actividad antimicrobiana.

9. DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el tamizaje confirman los hallazgos anteriores, que la raíz y rizoma de las diferentes especies del género Smilax, son las partes de la planta que poseen mayor actividad antimicrobiana, mientras que el tallo y las hojas poseen poca o ninguna actividad contra bacterias, levaduras y dermatofitos (anexos 5, 6).

La bacteria más susceptible a los diferentes extractos fue el S. aureus (62,5%) y la menos susceptible la S. typhi (12,5%).

Los dermatofitos más susceptibles a los diferentes extractos fueron T. rubrum (62,5%) y E. floccosum (62,5%), mientras que el A. flavus fué el menos susceptible (25%).

De acuerdo a los datos de los anexos 5 y 6, se puede establecer que en los resultados marcados con (*), P es menor que el valor $\alpha = 0.10$, por lo que se rechaza la hipótesis nula, que indica que los extractos a esa concentración no tienen efecto antimicrobiano.

Se demostró que los extractos de tallo y hojas no presentan actividad antimicrobiana significativa, a excepción del tallo de S. regellii, que demostró tener actividad antifúngica a una concentración de 15mg/ml.

Es importante hacer mención, de las propiedades que presentan las plantas del género Smilax, según los usos dados popularmente; entre estas propiedades tenemos: diuréticas, diaforéticas, depurativas de la sangre, utilizada para combatir la sífilis, herpes, lepra, acné nervioso, urticaria, úlceras de la boca, así como por su acción antiséptica y antipruriginosa, esta última de uso específico en los casos de psoriasis. También se le conoce por su actividad antiinflamatoria, por lo que se usa como un buen coadyuvante en el tratamiento del reumatismo, artritis, gota y en dosis elevadas destruye los cálculos renales.

Como se puede apreciar existe un número bastante grande de propiedades que aún faltan de demostrar científicamente, respecto a las plantas del género Smilax. Además es de suma importancia proseguir con la investigación de nuevas propiedades de los extractos de los diferentes órganos de la planta, especialmente de las partes aéreas; ya que de esta forma estaríamos contribuyendo a evitar la destrucción total de la planta, al conocer los beneficios que

pueden ofrecer; tallo, hojas y frutos.

Por otro lado es conveniente realizar estudios fitoquímicos para determinar los principios activos, ya que si bien se asume que su actividad biológica depende de los saponósidos, falta demostrar que en las tres especies, son estos los principios activos.

La metodología utilizada tanto para el tamizaje como para la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), fue la descrita por Mitscher y colaboradores (66). Esta metodología se basa en diluir el extracto sujeto a ensayo en agar nutritivo y la inoculación de los microorganismos a enfrentar en el mismo.

Se utilizó el método descrito, ya que permite una evaluación sencilla de la actividad antimicrobiana del compuesto adicionado al agar, determinando el crecimiento del microorganismo como (No Inhibición); o el no crecimiento como (Inhibición).

Otras ventajas que presenta el método por dilución son: que el procedimiento de preparación del ensayo, es más sencillo, por lo que representa una probabilidad menor de sufrir contaminación. Los resultados obtenidos no son parámetros, lo que implica un análisis estadístico fácil y confiable.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 La mayor actividad antimicrobiana de las plantas del género Smilax, se encuentra en los extractos obtenidos de raíz y rizoma.
- 10.2 Los extractos del tallo y hojas demostraron no tener actividad antimicrobiana significativa, por lo que no se justifica su uso.
- 10.3 La bacteria más susceptible a los diferentes extractos fue el S. aureus (62.5%) y la menos susceptible la S. typhi (12.5%).
- 10.4 Candida albicans fue susceptible únicamente al extracto del rizoma de la planta.
- 10.5 El dermatofito más susceptible a los diferentes extractos fue el T. rubrum (62.5%) y el menos susceptible el A. flavus (25%).
- 10.6 El método descrito por Mitscher y colaboradores, para tamizaje y CIM, basado en el crecimiento o la inhibición del crecimiento, es preciso para evaluar la actividad antimicrobiana de extractos vegetales.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Realizar estudios farmacológicos in vitro e in vivo, toxicológicos y clínicos que proporcionen más bases científicas para la utilización industrial de los órganos de las plantas que presenten actividad antimicrobiana.
- 11.2 Determinar la eficacia de los extractos aplicados en forma tópica, para el tratamiento contra dermatofitos, utilizando como pruebas KOH y cultivo seriados.
- 11.3 Seguir investigando las plantas que son utilizadas comunmente para el tratamiento de las diferentes entidades patológicas que afectan a la población de nuestro país.
- 11.4 Demostrar el espectro de inhibición antimicrobiano de los extractos de plantas del género Smilax, frente a otras bacterias, levaduras y dermatofitos.
- 11.5 Realizar estudios fitoquímicos para determinar los principios activos responsables de la bioactividad.

12. REFERENCIAS

- 12.1 Botany. Chicago: Natural History Museum. 1974;24: 92-101.
- 12.2 Ippish F. Contribución a las Investigaciones sobre Plantas Medicinales y Económicas de Guatemala. (Manuscrito), Guatemala, 1961.
- 12.3 Cáceres A, Ortiz S, Mulier T. Especies usadas medicinalmente en Guatemala. Farmacopea Vegetal Guatemalteca. Guatemala: CONAPLAMED, 1991. 1-9.
- 12.4 Standley P, Steyermark J. Flora of Guatemala. Fieldiana Botany. Chicago: Natural History Museum. 1952;24: 95-99.
- 12.5 Rios JL, Recio MC, Villar A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literatura. J Etnopharmacol 1988;23: 127-149.
- 12.6 Dominguez XA, Alcom JB. Screening of medicinal plants used by Huastec Mayans of Northeastern México. J Etnopharmacol 1985;13:139-159.
- 12.7 Van Puyvelde L, et al. Principies of Tetranemia riparia I. Antimicrobial activity of 8(14), 15-sandora coprimaradiene-7-8-diol. J Etnopharmacol 1986; 1 7: 269-275.
- 12.8 MacRae WD, Hudson JB, Towers GHN. Studies on the Pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. J Etnopharmacol 1988;22:143-172.
- 12.9 Janssen AM, Sheffer JJC, Ntezurubanza L. Antimicrobial activities of Some ocimum species grown in Rwanda. J Etnopharmacol 1989;26: 57-63.
- 12.10 Holt RJ. Laboratory test of antifungal drugs. Amer J Clin Path. 1975;28: 767-774.
- 12.11 Chaumont JP, Bardey I. Activites antifungiques in vitro de sept huiles essentielles. Fitoter 1989;60: 263-266.
- 12.12 Bennet RD, Heftmann E. Thin-Layer. Chromatography of Steroidal sapogenins. J Chromatograp 1962;9: 353-358.
- 12.13 Bérdy J, et al. Handbook of Antibiotic Compounds. Part II Boca Ratón, Florida: CRC Press Inc., 1982, 255p.

- 12.14 Windhoiz M. The Merck Index, Monografía 8228. Rahway. USA, Merck & Co.,1983.1205p.
- 12.15 De la Rosa F. Plantas y Yervas Medicinales de México. México: Editoriales Mexicanos Unidos, 1977. 529p. (p.99-100).
- 12.16 Guzmán DJ. Especies Útiles de la Flora Salvadoreña. 3a. ed. San Salvador: Ediciones Ministerio de Educación, 1975. 703p. (p.323-326).
- 12.17 Oblitas Poblete E. Plantas Medicinales de Bolivia. Cochabamba, Bolivia: Editorial "Los Amigos del Libro", 1969. 625p. (p.386-387).
- 12.18 Scientific Committee. British Herbal Pharmacopoeia. London: British Herbal Medicine Association. Tomo I, 1976.187p.
- 12.19 de Poll E. Plantas Comestibles y Tóxicas de Guatemala. Guatemala: CECON-USAC,1983.53p.
- 12.20 Cáceres A, et al. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. I.Screening of 84 plants against enterobacteria. J Etnopharmacol 1990;30: 55-73.
- 12.21 Cáceres A, et al.Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases; Screening of 68 plants against Gram positive bacteria. J Etnopharmacol 1991;31: 55-71.
- 12.22 Cáceres A, et al. Screening of antimicrobial activity of plants populary used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. J Etnopharmacol 1987;20: 223-273.
- 12.23 Morton JF. Atlas of Medicinal Plants of Middle America, Bahamas to Yucatán. Springfield: Fieldiana Botany, 1976. 1420+XXVIIp. (p.83-85).
- 12.24 Ramírez O. Espectro de inhibición de bacterias patógenas por extractos vegetales. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1983. 49p.
- 12.25 Arriaza DV. Acción diurética y antimicrobiana de algunos extractos vegetales del Género Smilax. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1983. 50p.

- 12.26 Girón L. Investigación de la inhibición de Candida albicans por preparaciones de plantas usadas en la medicina popular. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1983. 48p.
- 12.27 Martindale, O. The Extra Pharmacopoeia. London: The Pharmaceutical Press, 1982. 430p.
- 12.28 Jokiik WK, Willet HP, Amos DB. Eds. Zinsser. Microbiología. 17 ed. México: Editorial Panamericana, 1983. 831 p.
- 12.29 Torres MF. Coprocultivo.(Folieto), Guatemala: Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Usac, 1987. 13p.
- 12.30 Lennet WR, et al. Manual of clinical microbiology. 4 ed. Washington: American Society for Microbiology, 1986. 1149p.
- 12.31 Garrido JA. Técnicas de Laboratorio en Parasitología Clínica. Madrid: Editorial E. Sánchez Leal, 1966. 429p. (p. 139-150).
- 12.32 Emmons CW, et al. Medical Mycology. 3th. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1977. IX+592p. (p. 185-229).
- 12.33 Diamond RD. Mechanism host resistant to Candida albicans. p.200-202. (in: Microbiology. Washington: American Society for Microbiology, 1981. 422 p.)
- 12.34 Fetter BF, Klintworth GK, Hendry WS. Mycoses of the central nervous system. USA: Waverly Press, 1967. X+212p. (p.53-62-89-123).
- 12.35 Drouhet E. Les candidoses et leur diagnostic de laboratoires. France: Squibb Pain, 1965. 22p.
- 12.36 Utz JP, Drouhet E. Treatment of candida infection. (In: Bodey GP, Fainstein V. Candidiasis. New York: Raven Press, 1985. 281 p.)
- 12.37 Koneman EW, Roberts GD. Micología Práctica de Laboratorio. 3a. ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1987. 31 Op. (p. 114-117).
- 12.38 Conant NF, et al. Micología. 3 ed. México: Editorial Interamericano, 1972. XI+592p. (p.224-309).
- 12.39 Cáceres A, et al. Actividad antifúngica de plantas usadas en Guatemala para el

- tratamiento de dermatofitos. (Memorias), Guatemala: III Semana Científica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala: 1989. B 4-7p.
- 12.40 Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Review of medical microbiology. 15th. ed. USA: Lange Medical Publications, 1982. 210p.
- 12.41 Roberts SO. Treatment of superficial and subcutaneous mycoses. p.225-283. (In: Antifungal chemoterapic. London: Academy Press, 1980.)
- 12.42 Mas J, Piña E. Las cepas de *Candida* resistentes a la nistatina se vuelven sensibles al cultivarlas en ergosterol. Arch Invest Med (Mex), 1985;16: 145.
- 12.43 Shepherd MG, Poulter RT, Sullivan PA. *Candida albicans*: biology, genetics and pathogenicity. Ann Rev Microbiol. 1985; 39: 579-614.
- 12.44 Edwards JE, et al. Several candidal infections. Ann Intern Med. 1978; 89: 91-106.
- 12.45 Louria DB, Stiff DP, Bennett B. Disseminated moniliasis in the adult. Med 1962; 41: 307-337.
- 12.46 Medoff G. Treatment of infections caused by *Candida*. p.215-217. (In: Microbiology. Washington: American Society for Microbiology. 1981. 422p.)
- 12.47 Ahearn DG. Medically important yeast. Ann Rev Microbiol. 1978; 32: 59-68.
- 12.48 Kobayash GS, Medoff G. Antifungal agents: recent developments. Ann Rev Microbiol 1977; 31: 291-308.
- 12.49 Dismukes WE. Azole antifungal drugs: Old and New. Ann Intern Med 1988; 109(3): 177-179.
- 12.50 Gadebush H. Mechanism of action of candidal agent. p.210-214. (In: Microbiology. Washington: American Society for Microbiology, 1981. 422p.).
- 12.51 Speller DCE. Antifungal Chemoterapy. USA: John Willey & Sons, 1980. 446p.
- 12.52 Bevan LA, et al. Farmacología. 2a. ed. México: CEPESA, 1978. 651 p.
- 12.53 Cáceres A. Tamizaje de la actividad antimicrobiana de plantas de uso medicinal en Guatemala. (informe), Guatemala: Comisión Nacional para el Aprovechamiento de Plantas Medicinales CONAPLAMED, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Centro

- de Estudios Mesoamericanos sobre Tecnología Apropriada CEMAT, Universidad de San Carlos de Guatemala, Doc. Tec. 1989. 9p.
- 12.54 Cáceres A, Girón L, Martínez A. Diuretic activity of Plants used for treatment of urinary ailments in Guatemala. *J Ethnopharmacol* 1987; 19: 233-245.
- 12.55 Cáceres A, et al. Actividad contra Vibrio cholerae de cinco Plantas Americanas usadas en el tratamiento de infecciones. (Memorias), Guatemala: IV Congreso Nacional de Microbiología, 1991. 64p.
- 12.56 Lara R. Determinación de la Actividad Inmunomoduladora de los extractos de Zarzaparrilla, Quilete y Pericón. (Memorias). Guatemala: IV Congreso Nacional de Microbiología, 1991. 88p.
- 12.57 Martínez M. Las Plantas medinales de México. 5a. ed. México: Botas, 1969. 656p. (p.355-356).
- 12.58 De la Rosa F. Plantas y Yervas medicinales de México. México: Editores Mexicanos Unidos, 1979. 529p. (p.99-101).
- 12.59 Díaz JL. Uso de Plantas Medicinales de México. (Monografía), México: Instituto Mexicano de Plantas Medicinales. 1976.135p.
- 12.60 Carvajal P. El libro Magistral de las Yervas. México: Medina Hermanos, 1969. 53-54.
- 12.61 López MB. Demostración de la Actividad antimicrobiana de Byrsonima crassifolia y Malpighia glabra. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1992. 66p.
- 12.62 Hobbs C. sarsaparilla. A literatura review. *Herbal Gram.* 1988; 17:1-15.
- 12.63 Cáceres A, et al. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. I. Screening for antimycotic activity of 44 plants extracts. *J Ethnopharmacol* 1991; 31: 263-276.
- 12.64 Urizar FL. Ensayo Clínico sobre la efectividad de Smilax lundellii en el tratamiento de Candidosis vaginal. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación Facultad de Ciencias Médicas) 1989. 87p.

- 12.65 Fuentes AR. Tratamiento de la Tinea Pedis con Zarzaparrilla. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Médicas) 1989. 53p.
- 12.66 Mitscher LA, et al. A modern look at folkloric use anti-infective agents. J Nat Prod 1987; 50: 1025-1040.

13. ANEXOS

Anexo No 1.

Características químicas de los compuestos con actividad biológica o Parillina:

Tipo de antibiótico = 73230-3349, según Bérdy et al (1 2).

Tipo Químico= Saponina neutra

Fórmula = C₅₁H₈₄O₂₂. Peso molecular = 1,000

Características = cristales blancos

Rotación óptica = (-64, EtOH-agua)

Actividad = anti Candida albicans (CIM, 16 mg), anti-Trichophyton (CIM, 4 mg)

DL50 = 10 mg/kg por vía intraperitoneal; 30 mg/kg por vía oral. -9 Sarsapogenina (25S)-
espirostan-3B-01, (13).

Tipo Químico = saponina esteroideal

Fórmula = C₂₇H₄₄O₃. Peso molecular = 416

Características físicas = agujas prismáticas grandes obtenidas con acetona

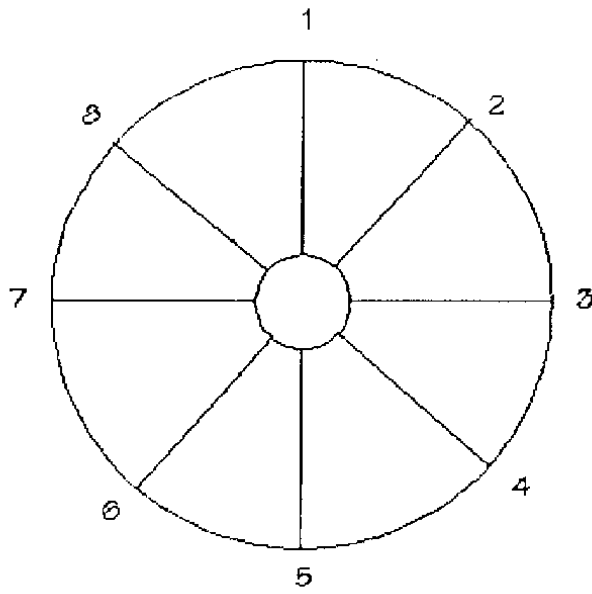
Características organolépticas = amarga, acrida

Punto de fusión = 199.0 - 199.5 °C

Soluble en: alcohol, acetona, benceno, CaCl₂, precipita al añadir digitonina.

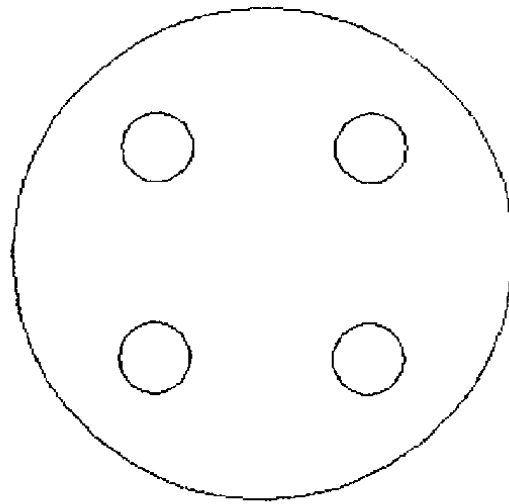
Anexo No. 2

Patrón Radial para inoculación de bacterias y levaduras



Anexo No. 3

Patrón para inoculación de dermatofitos



Anexo No. 4

Prueba Binomial

	7	6	5	4	3	2	1	0
1	+							0.5000
2	+	+						0.7500
3	+	+	+					0.8000
4	+	+	+	+				0.8100
5	+	+	+	+	+			0.8800
6	+	+	+	+	+	+		0.9090
7	+	+	+	+	+	+	+	0.9630
α	0.008	0.016	0.031	0.063	0.125	0.250	0.500	
β	7	6	5	4	3	2	1	

Anexo No. 5

Patrón de Inhibición Antibacteriano de Plantas del Género Smilax

Ext	Organo	10 mg					7.5 mg					5 mg				
		A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
1	Hojas	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
2	Tallo	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
3	Raíz	*++++	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
4	Hojas	*++++	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
5	Raíz	*++++	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
6	Rizoma	*++++	*++++	*++++	*++++	*++++	*++++	*++++	----	*++++	*++++	*++++	*++++	*++++	----	*++++
7	Hojas	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
8	Raíz	*++++	*++++	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
9	Control	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

+ = Inhibición

- = No inhibición

A = S. aureus

B = P. aeruginosa

C = C. albicans

D = S. typhi

E = S. flexneri

Extracto 1,2,3 : Smilax regellii

Extracto 4,5,6 : Smilax lundellii

Extracto 7,8 : Smilax spinosa

Extracto 9 : Control

* Significativo para $\alpha = 0.10$

Anexo No. 6

Patrón de Inhibición Antifúngico de plantas del Género Smilax

Ext.	Organo	15 mg.				10 mg.				5 mg.			
		A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	Hojas	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
2	Tallo	----	*++++	*++++	*++++	----	----	----	----	----	----	----	----
3	Raiz	*++++	*++++	*++++	*++++	----	----	*++++	----	----	----	----	----
4	Hojas	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
5	Raiz	*++++	*++++	----	*++++	----	----	----	----	----	----	----	----
6	Rizoma	*++++	*++++	----	*++++	*++++	*++++	----	----	----	----	----	----
7	Hojas	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
8	Raiz	----	*++++	----	*++++	----	----	----	----	----	----	----	----
9	Control	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

+ = Inhibición 25% de crecimiento respecto al control
 - = No inhibición 25% de crecimiento respecto al control

A = M. gypseum
 B = T. rubrum
 C = A. flavus
 D = E. floccosum

Extracto 1,2,3 : Smilax regellii
 Extracto 4,5,6 : Smilax lundellii
 Extracto 7,8 : Smilax spinosa
 Extracto 9 : Control

* Significativo para $\alpha = 0.10$

Anexo No. 7

Concentración Inhibitoria mínima para Bacterias y Levaduras (mg)

Ext.	Organo	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. flexneri</i>
1	Hojas	> 10	>10	> 10	> 10	> 10
2	Tallo	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
3	Raíz	10	> 10	> 10	> 10	> 10
4	Hojas	10	> 10	> 10	> 10	> 10
5	Raíz	10	> 10	> 10	> 10	> 10
6	Rizoma	5	5	10	7.5	5
7	Hojas	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
8	Raíz	10	10	> 10	> 10	> 10
9	Control	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10

Anexo No. 8

Concentración Inhibitoria Mínima para Dermatofitos (mg)

Ext.	Organo	<i>M. gypseum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>A. flavus</i>	<i>E. floccosum</i>
1	Hojas	> 15	>15	> 15	> 15
2	Tallo	> 15	15	15	15
3	Raíz	15	15	10	15
4	Hojas	> 15	> 15	> 15	> 15
5	Raíz	15	15	> 15	15
6	Rizoma	10	10	> 15	15
7	Hojas	> 15	> 15	> 15	> 15
8	Raíz	> 15	15	> 15	> 15
9	Control	> 15	> 15	> 15	> 15

Luis Alfonso Pineda Gerónimo
Autor

Lic. Armando Cáceres
Asesor

Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
Director

Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
Decano

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS
CAROLINA DE CHATEAUBRIANT
VENEZUELA