

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

**ACTIVIDAD BIOCIDA DE CUATRO PLANTAS DE USO MEDICINAL
EN EL PARQUE NACIONAL LAGUNA DE LACHUÁ**

INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR:

GERBERT GIOVANNI SOLÍS ROSALES

PARA OPTAR AL TÍTULO DE

QUÍMICO BIÓLOGO

Guatemala, abril de 2003

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
BIBLIOTECA CENTRAL

DL
06
T (2134)

JUNTA DIRECTIVA

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

M. Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	Decano
Licda. Jeannette Magali Sandoval de Cardona	Secretaria
Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo	Vocal I
Lic. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Dr. Federico Adolfo Richter Martínez	Vocal III
Br. Jorge José García Polo	Vocal IV
Br. Liza Leonor Carranza Jui	Vocal V

ACTO QUE DEDICO

A DIOS

A MI MADRE Juanita, en este momento la extraño mucho y la realidad de que usted no pueda estar presente junto a mí, no me deja sentir una felicidad completa. Solamente puedo decir a todos que dedico este acto para honrar el recuerdo de una mujer sencilla, trabajadora, solidaria y madre ejemplar, Mi mamá Juanita.

A MI PADRE Diego, dedico este acto como agradecimiento por todos esos días de trabajos y desvelos que dedicó para cuidar de mí y poder brindarme todas las oportunidades a las que usted no pudo acceder. Este triunfo es suyo.

A MI HERMANO Mynor. Además de ser mi hermano usted es mi mejor amigo, gracias porque siempre se esfuerza por orientarme, por corregirme y sobre todo porque siempre me hace sentir que soy capaz de superar cualquier adversidad. A pesar de todo querido hermano, alcanzamos nuestra meta.

A MIS SOBRINOS Javier Eduardo y José Alejandro. Dedico este momento del acto para decirles que los quiero mucho y que desde el día que nacieron he encontrado otra razón para vivir.

A MI CUÑADA Maria Elena, gracias por la dedicación para con tus hijos y tu esposo, espero contar siempre con tu amistad. Así también a la familia Muñoz Rivera.

A MIS TIOS Y TÍAS Gracias por su cariño y sus consejos.

A MIS PRIMOS Especialmente a Jorge, Oscar, Allan, Rosita y Juanito.

A MIS PADRINOS Roberto y Ana María por todo el cariño que siempre me han brindado.

A MIS AMIGOS Especialmente a Karla, Gabriella, Octavio, Ernesto, Héctor Hugo, Francisco y Angela, Ingrid y Marcos, Arturo, Leonel, Jorge, Walter y Claudia, Nixon, Rafael, gracias por la amistad que compartimos durante nuestra vida estudiantil.

AGRADECIMIENTOS

A MI ASESOR

Lic. Armando Cáceres, por compartir con mi persona no solo conocimientos científicos sino que también enseñanzas de vida.

AL DEPARTAMENTO
DE CITOHISTOLOGÍA

Especialmente a la Licda. Paredes, Adolfo, Swisly y Lourdes.

A MIS REVISORAS

Licda. Margarita Paz y M Sc. Blanca Samayoa por las observaciones y recomendaciones con respecto a la edición del presente documento

PROYECTO FLORA
REGIONAL

Por apoyar investigaciones como la presente, que benefician grandemente a la humanidad.

A LA UNIVERSIDAD
DE SAN CARLOS
DE GUATEMALA

Por la oportunidad de superarme y por ser mi *alma mater* así como a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

ÍNDICE

I.	Resumen	1
II.	Introducción	2
III.	Antecedentes	
	A. El uso de las plantas medicinales	
	1. En la antigüedad	3
	2. En la actualidad	4
	B. Uso de las plantas medicinales en Guatemala	6
	C. Descripción de la zona de estudio	7
	D. Etnobotánica médica del PNLL	8
	1. <i>Cissampelos tropaeolifolia</i>	8
	2. <i>Hyptis verticillata</i>	9
	3. <i>Passiflora coriacea</i>	10
	4. <i>Piper aeruginosibaccum</i>	10
	E. Determinación de la actividad Biocida (fase de pretamizaje)	11
	1. Método de difusión	11
	2. Método de dilución en agar	12
	3. Método Bioautográfico	12
	F. Procedimientos del tamizaje de la actividad Antimicrobiana	13
	1. Preparación del extracto etanólico	13
	2. Pruebas antimicrobianas	14
	3. Actividad Larvicida	14
	4. Citotoxicidad contra <i>Artemia salina</i>	15
	5. Actividad Antriprotozoaria	16

IV.	Justificación	18
V.	Objetivos	19
VI.	Hipótesis	20
VII.	Materiales y Métodos	21
	A. Universo	21
	B. Muestra	21
	C. Materiales y equipo	21
	D. Metodología	
	1. Obtención de los extractos	22
	2. Determinación de actividad Antibacteriana y levaduras	22
	3. Actividad antifúngica	23
	4. Actividad contra protozoos	24
	5. Tamizaje de la actividad larvicida	24
	6. Citotoxicidad	25
	E. Diseño experimental	
	1. Tipo de estudio	25
	2. Muestreo	25
	3. Variables	25
	4. Interpretación de resultados	25
	5. Tamizaje antimicótico <i>in vitro</i>	26
	6. Actividad antriprotozoaria <i>in vitro</i>	26
	7. Determinación de Citotoxicidad	27
	8. Tamizaje de la actividad larvicida	27
VIII.	Resultados	28
IX.	Discusión	34
X.	Conclusiones	36
XI.	Recomendaciones	37
XII.	Referencias	38

I. RESUMEN

La información respecto a las indicaciones y el uso de las plantas con fines medicinales por parte de los pobladores de la zona de influencia del Parque Nacional Laguna Lachuá (PNLL), fue recopilada mediante la encuesta etnobotánica realizada por Cleaves en el año 2000. De los resultados de esta encuesta se planteó, como objetivo general del presente trabajo de tesis, analizar la actividad biocida de las plantas nativas utilizadas con fines medicinales que no hayan sido estudiadas previamente. Según este criterio se seleccionaron y obtuvieron las plantas: *Cissampelos tropaeolifolia*, *Hyptis verticillata*, *Passiflora coriacea* y *Piper aeruginosibaccum*. Las partes aéreas de dichas plantas fueron secadas a temperatura ambiente luego se procedió a molerlas y pesarlas. Los extractos etanólicos se prepararon por percolación utilizando para esto alcohol al 95% y evaporación al vacío.

Estos extractos fueron sometidos a pruebas de actividad antibacteriana *in vitro*, utilizando el método de Mitscher et al.¹ obteniendo un resultado positivo con el extracto etanólico de las partes aéreas de *Piper aeruginosibaccum*, para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a una concentración de 0.25 mg/ml, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607 a una concentración de 0.25 mg/ml y *Bacillus subtilis* ATCC 6051 a una concentración de 0.25 mg/ml. Para determinar la actividad antifúngica se utilizó el método de Bracato & Golding modificado por MacRae et al.^{2,3}, demostrándose que ninguna de las plantas tuvo actividad contra los hongos a los que se enfrentaron sus respectivos extractos etanólicos.

La actividad contra protozoos se determinó por el método de González et al. & Hocqueimiller et al.^{4,5}, para epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* MHOM/GT/96/SMI-04392, promastigotes de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2903 y *Leishmania mexicana* MNYC/BZ/62/M376, resultando con actividad positiva el extracto etanólico de *Hyptis verticillata* para *T. cruzi* a una concentración (CI₉₀) de 0.92 mg/ml y para *L. braziliensis* a una concentración de 0.81 mg/ml, Utilizando regresión lineal y el programa Finney's Probit Analysis. El extracto etanólico de *Piper aeruginosibaccum* tiene actividad contra *T. cruzi* a una concentración de 1 mg/ml. Los ensayos para determinar la actividad larvicida según el método de Mishra et al.^{6,7}, demostraron que ninguno de los extractos tienen actividad contra larvas de *Aedes aegypti* ni contra *Aedes albimanus*.

Los extractos también se sometieron a pruebas de actividad citotóxica contra *Artemia salina* Método de Meyer et al.⁷, según el análisis DL₅₀ se determinó que el extracto etanólico de *Piper aeruginosibaccum* se considera con actividad positiva a una concentración de 0.68 mg/ml.

II. INTRODUCCIÓN

El Parque Nacional Laguna Lachuá (PNLL) está definido como área de protección especial según decreto 4-89 del Congreso Nacional de la República de Guatemala. Se encuentra localizado en el departamento de Alta Verapaz, consiste en una extensión de 10,000 ha de bosque maduro y una laguna de color azul-turquesa de 5 kms². Su estado poco alterado ha permitido la conservación de una importante biodiversidad, misma que es explotada por los habitantes de la zona de influencia, que obtienen recursos del bosque para suplir algunas de sus necesidades básicas tales como la alimentación, vivienda y salud⁸.

Uno de estos recursos lo constituyen las plantas medicinales, cuya utilización se realiza por información que se ha transmitido de generación en generación a un reducido número de personas de la comunidad. Muchas veces estas plantas son el único recurso disponible para el tratamiento de las enfermedades infecciosas de mayor incidencia en la región, aunque la aplicación terapéutica de las mismas es totalmente empírica⁹. Considerando que esta situación es común en la mayoría de los países de América Latina, la Organización Mundial de la Salud, mediante la Resolución WHA 31.33 reconoce la importancia de las plantas medicinales en el cuidado de la salud, y llama la atención a los Estados miembros a utilizar un enfoque comprensivo al tema de las plantas medicinales, recomendando entre otras cosas, la aplicación de criterios científicos y métodos para asegurar su eficacia en el tratamiento de condiciones y enfermedades específicas¹⁰.

La presente tesis tuvo como principal objetivo el realizar los bioensayos correspondientes para analizar la actividad larvicida, antibacteriana, antifúngica, antiprotozoaria y la citotoxicidad contra *Artemia salina* de los extractos etanólicos de cuatro plantas seleccionadas por ser nativas poco estudiadas y que son utilizadas por la población de la zona de influencia del PNLL con fines medicinales. Estas plantas fueron seleccionadas de un total de 209 especies reportadas por el estudio etnobotánico de la región, realizado por Cleaves¹¹.

Los resultados obtenidos constituyen criterios científicos que permitirán que las aplicaciones medicinales de dichas plantas, se aprovechen de la forma más confiable, eficiente y eficaz, además de orientar estudios fitoquímicos posteriores que pretendan determinar los compuestos responsables de las actividades biológicas demostradas. Estos criterios permitirán también aumentar el conocimiento de las características de los recursos naturales de la región para promover su conservación y desarrollo sostenible.

III. ANTECEDENTES

A. El uso de las plantas medicinales:

1. En la antigüedad:

Todos los pueblos primitivos han adquirido información sobre las propiedades medicinales de gran número de plantas propias de su ambiente. Estos conocimientos, generalmente los han acumulado sacerdotes, hechiceros, curanderos, etc., quienes lo han transmitido, de generación en generación, a determinados aprendices y a sus descendientes. En ocasiones, historiadores, viajeros o curanderos, han dejado útiles descripciones de plantas medicinales y su utilidad. Así, en la Biblia están descritas unas 200 plantas medicinales y sus aplicaciones. El papiro de Ebers, escrito hace aproximadamente unos 3500 años, contiene descripciones de enfermedades e indicaciones para tratarlas con plantas entre las que se han identificado la Silla marítima, empleada con el mismo fin que, 1000 años después, la empleaba Hipócrates, quien además conocía los usos del ajeno, cicuta, beleño, ruibarbo y manzanilla. En países como China, India y Japón, se ha encontrado abundante información escrita sobre la flora medicinal. En muchas de las tribus de América, como en otros países del África, la mayor parte de los conocimientos sobre plantas medicinales continúa transmitiéndose verbalmente entre unos cuantos elegidos. Si se logra difundir esta información y estudiarla científicamente, la humanidad obtendrá sorprendentes e importantes sustancias que, de lo contrario, permanecerán ignoradas por muy largo tiempo, pues la civilización tiende a romper la cadena de la tradición verbal que se ha preservado esta información, además del proceso de globalización que propiciaría la desaparición de dichas tribus y sus tradiciones⁹.

El aborígen de América de la época precolombina, se caracterizó por una relación muy especial con su entorno, habitando en zonas ecológicas ricas en especies vegetales y animales, vemos que los vestigios arqueológicos evidencian los asentamientos periódicos en zonas ecológicas consideradas hoy en día como puntos focales de biodiversidad. Basaba su relación con dicho entorno en una solidaridad vital y un sentimiento general de vida muy particular, ya que se consideraban una hermandad entre todas las formas de vida existentes, esta cosmovisión particular en que se considera que las plantas y el hombre, tienen la misma dignidad y son hermanos, fue lo que determinó que a pesar de aprovechar y utilizar sus productos, existiera un respeto y cuidado con la biota, clasificando a las plantas y animales por su utilidad pero también por su simbolismo mágico religioso. La llegada de los españoles implica la implantación de una ideología providencialista y antropocéntrica de la relación del

hombre con la naturaleza, dándole potestad sobre las cosas creadas, la naturaleza por lo tanto está al servicio del hombre y el control del medio físico está asegurado por mandato divino, provocando una despreocupación e irresponsabilidad sobre su capacidad destructiva. Esta ideología justificó la depredación de los recursos naturales, la explotación extensiva de las maderas y cualquier producto útil para el enriquecimiento de los conquistadores. Se desintegra además la sociedad aborígen, se pierden y se mezclan las etnias, lenguajes, historias, sepultándose también los conocimientos sobre plantas y animales, conocimiento que había sido aprovechado por los médicos aborígenes a través de su experiencia milenaria conocían perfectamente. Sus plantas y sus medicinas se degradaron y se convirtieron en "alimentos o remedios de indios", debido a que el modelo económico-social impuesto en la colonia relegó al indígena al último escalón social y con él declinó el valor cultural de su mundo material¹⁰.

2. En la actualidad:

Los descendientes de estos antiguos pobladores americanos aún se encuentran en condiciones similares de vida. Las obvias diferencias en el poder adquisitivo de la población en América Latina, el bajo consumo per cápita y la falta de recursos por parte del sector público para la compra y distribución de medicamentos a la población, son algunas de las causas por las cuales un significativo porcentaje de la población no tiene acceso a medicamentos. Los porcentajes varían mucho entre los diferentes países de la región, pero no parece exagerado estimar que el 50 por ciento de la población de América Latina tiene poco o ningún acceso a los medicamentos. En 1980 el consumo de medicamentos, fue de 80 mil millones de USD, aproximadamente, de los cuales en América Latina se usó un 8 por ciento del total mundial. En 1990 se reporta un 5 por ciento, tendiendo a ser cada vez menor. Este pobre acceso de la población a medicamentos, el creciente control del mercado por las empresas transnacionales y la cada vez menor participación del sector público en el suministro de medicamentos, hacen que el uso de las plantas como medicamentos sean vitales en la mayor parte de nuestra población, así alrededor del 70 por ciento hace uso de ellas para la atención primaria en salud. Considerando que esta situación es común en la mayoría de los países de América Latina, la Organización Mundial de la Salud, mediante la Resolución WHA 31.33 reconoce la importancia de las plantas medicinales en el cuidado de la salud, y llama la atención a los Estados miembros a utilizar un enfoque comprensivo al tema de las plantas medicinales, recomendando:

- Un inventario y clasificación terapéutica, actualizadas periódicamente, de plantas medicinales utilizadas en los diferentes países.

- Criterios científicos y métodos para asegurar la calidad de las preparaciones con plantas medicinales y su eficacia en el tratamiento de condiciones específicas y enfermedades.
- Métodos para el uso seguro y efectivo de productos fitoterapéuticos por diferentes profesionales de la salud.
- Diseminación de la información a los Estados miembros y
- Designación de Centros de Investigación y Capacitación para el estudio de plantas medicinales.

En este mismo sentido en 1987, la 40ª Asamblea General de la OMS (Resolución WHA 40.33) reafirmó los puntos anteriores, en el sentido de iniciar programas globales para asegurar el cultivo y uso adecuado de plantas medicinales tradicionales, así como el control de la calidad de los medicamentos derivados de estas¹⁰.

Las plantas constituyen una fuente importante de materias primas para la industria farmacéutica. El mercado mundial de fármacos terminados fue de 173 mil millones en 1990. De estos un 25 por ciento contienen, aún hoy en día, al menos un compuesto de origen natural. Si un 5 por ciento de estos compuestos hoy se sintetizan, económicamente es razonable estimar, que un 20 por ciento de los medicamentos modernos contienen compuestos que aún se extraen de plantas o son basados en extractos vegetales, por lo tanto, se podría decir que el mercado mundial de fármacos terminados de origen vegetal es de alrededor de unos 350 mil millones anuales. Las plantas medicinales se utilizan en casi todos los países como materia prima, en forma de extractos, en forma semipurificada o como sustancias químicas puras o semisintéticas. Se estima que para el año 2020 la población mundial habrá alcanzado 7.5 mil millones de los cuales el 75 por ciento vivirá en los países en vías de desarrollo, los que no pueden tener acceso sino únicamente al 15 por ciento del mercado total de medicamentos, lo que indica que esta población tendrá que depender en el futuro aún más de las plantas medicinales. Considerando que entre el 60 al 70 por ciento de las 500 mil especies vegetales del mundo se encuentran en América, fundamentalmente en el bosque tropical húmedo, de las cuales al menos el 12 por ciento tienen actividad biológica, se podría decir que alrededor de 35 mil especies serían fuente importante de nuevos fármacos¹⁰.

Durante los últimos treinta años, se han logrado avances significativos en la metodología de aislamiento de los principios activos de las plantas, que junto con métodos analíticos, permiten estudiar con facilidad las plantas medicinales. Los nuevos métodos de separación y elucidación de estructuras y análisis cuantitativo, hacen factible la identificación de compuestos químicos complejos, paralelamente se ha avanzado mucho en el diseño y empleo

de bioensayos que permiten detectar una amplia gama de actividad biológica. La Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (ONUDI), también ha reconocido el valor potencial de las plantas en el cuidado de la salud y el desarrollo económico, así como en la segunda consulta sobre la Industria Farmacéutica organizada por la ONUDI se recomendó “desarrollar guías para asistir a los países en vías de desarrollo para mejorar el suministro de plantas medicinales como materias primas o como productos procesados” y “continuar el fomento y promoción de colaboración activa entre países en vías de desarrollo y países desarrollados en todas las áreas concernientes a la mejor utilización de las plantas medicinales”. La tercera consulta sobre la industria farmacéutica, realizada en Madrid, también enfatizó la necesidad de promover la industrialización de plantas medicinales y su uso. Por lo anterior queda establecido que las plantas medicinales representan una alternativa para el cuidado de la salud y que pueden ser importantes en el desarrollo económico¹⁰.

Ante la necesidad de buscar nuevos medicamentos que puedan combatir los principales microorganismos causales de infecciones causadas por bacterias, hongos y protozoos, especialmente como respuesta al creciente y alarmante incremento de cepas multiresistentes a los antibióticos que puedan combatirlos con eficacia, se llevan a cabo múltiples esfuerzos para demostrar la efectividad de algunas plantas como terapia alternativa. Las drogas a elección son producidas por síntesis o por levaduras, pero en estudios anteriores se ha demostrado que algunas de las plantas usadas popularmente para el tratamiento de enfermedades relacionadas con estos agentes, efectivamente tienen una actividad antiinfecciosa importante¹².

B. Uso de las plantas medicinales en Guatemala:

En Guatemala las plantas medicinales han tenido uso tradicional, situación que se mantiene vigente principalmente en las áreas rurales; sin embargo, hasta 1976 los estudios científicos sobre estos temas eran escasos¹⁰.

Durante 1978-82, el Centro Mesoamericano de Estudios sobre Tecnología apropiada (CEMAT) realizó encuestas etnobotánicas para conocer la flora medicinal del país y establecer un sistema de validación y uso de este recurso agrícola y terapéutico¹². La detección etnobotánica y bibliográfica demuestra que por lo menos 623 plantas se usan para tratar infecciones en Guatemala¹³. Durante 1987-93 se establecieron los procedimientos y se hicieron investigaciones con financiamiento de DIGI o IIQB para determinar la actividad de algunas plantas^{14,15,16}. Hasta 1996 se había tamizado la actividad de 1,022 extractos de 243 plantas, de las cuales un 19.5 por ciento, mostraron tener actividad contra las bacterias patógenas ensayadas¹⁷.

Durante 1995-99, el Departamento de Citohistología Humana recibió equipo, asistencia técnica y capacitación de personal por parte de JICA y OEA que permiten afirmar que se tienen las condiciones necesarias para realizar cultivos de microorganismos y los respectivos bioensayos para determinar la actividad biocida de los extractos de plantas de uso medicinal frente a varios agentes microbianos: hongos, bacterias y parásitos protozoarios. Durante el año 2001 se han realizado proyectos de investigación de la actividad biocida de plantas provenientes de zonas protegidas tanto de bioprospección como de encuestas etnobotánicas, siendo estas áreas: La sierra de las minas, el volcán Tacaná y Laguna Lachúa¹⁷.

C. Descripción de la zona de estudio:

Guatemala posee diversidad de recursos naturales por su cambiante topografía, lo que propicia que existan variadas condiciones climáticas específicas que permiten la proliferación de múltiples especies vegetales. Como consecuencia del conflicto armado interno que se desarrolló por más de 30 años, las tropas en contienda se escondían y libraban batallas en las montañas por ser áreas estratégicas de difícil acceso, lo cual dificultó grandemente el estudio científico de los recursos bióticos propios de estas áreas¹⁷.

Una de estas áreas es el PNLL, que se encuentra situado en el noroeste del departamento de Alta Verapaz, en las tierras bajas del norte de Guatemala. Es un área que cubre 10,000 ha de bosque maduro y representa uno de los pocos remanentes boscosos en esa región. Su estado está poco alterado, lo que ha permitido la conservación de muchas especies arbóreas de gran valor, mamíferos, aves, anfibios y reptiles. Sus suelos de origen cárstico, producto de su formación caliza, son sumamente frágiles⁸.

El atractivo principal del área es la belleza de la laguna, de increíble colorido azul-turquesa, con gran variedad de peces. Esta laguna, de forma circular, tiene tan solo 5 km² pero cuenta con profundidades de 220 m es refugio de mamíferos como el tapir y el jaguar, y de aves migratorias y residentes. Esta forma un importante corredor ecológico desde y hacia las tierras bajas del norte. La entrada al parque se encuentra en la aldea San Marcos, a 414 km de la Ciudad de Guatemala. A partir los 70s la Franja Transversal del Norte donde se encuentra ubicado el parque, por razones políticas se inicia la colonización de la zona. El Instituto Nacional de Transformación Agraria (INTA) que en aquel momento era encargado de acreditar la tierra, cuidó que el Parque no fuese invadido. Sin embargo en la actualidad existen más de 44 asentamientos humanos en el área de influencia. El parque está definido como área de protección especial según decreto 4-89 del Congreso Nacional de la República de Guatemala¹¹.

El INAB como parte del proyecto PNLL se encuentra trabajando desde el año 2000, en cuatro líneas de acción que buscan lograr una convivencia armoniosa entre las comunidades y el parque, entre las cuales cabe resaltar el desarrollo de un programa de investigación científica cuyo objetivo principal es el de contribuir al conocimiento sistemático de las riquezas naturales y ambientales de la región. Actualmente se han implementado 30 investigaciones en diferentes áreas temáticas, particularmente en ciencias como biología, sociología y economía¹¹.

D. Etnobotánica médica del PNLL:

En el año 2000, Cleaves desarrolló un trabajo de tesis de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, en el que se describe la etnobotánica médica en cinco de las comunidades de la zona de influencia del PNLL. En este trabajo se obtuvo una lista de 209 especies diferentes de plantas, de las cuales se investigó por medio de entrevistas con los informantes clave, los nombres comunes en español y k'eqchí, los usos, parte usada y forma de preparación, la forma de obtención, el lugar de recolecta y la abundancia, así como sus aplicaciones terapéuticas¹¹.

De este universo se escogieron 4 plantas nativas, no estudiadas previamente y que se usan en el tratamiento de enfermedades asociadas con procesos infecciosos.

De acuerdo a estas características, se escogieron las siguientes plantas:

1. *Cissampelos tropaeolifolia* DC.

- a) Familia: Menispermaceae.
- b) Procedencia: Etnobotánica
- c) Nombre/s común/es: Recibe nombres comunes tales como curarina macho, Aspirina (Huehuetenango), curarín hembra.
- d) Descripción botánica y hábitat: Propia de bosques húmedos o lluviosos o matorrales, aproximadamente hasta una altura de 2,000 msnm. Es un vástago delgado, sutilmente piloso, característica que disminuye con la edad; Hojas peltadas usualmente muy cerca de la base, delgadas, de forma oval-redondeada o suborbicular, comúnmente de 5-13 cm de longitud, redondeadas a agudas en el ápice, mucronada, truncada o anchamente redondeada en la base, algo pálidas debajo y a menudo glauscente, pudiendo ser pilosas o no, inflorescencia estaminada cimosa-paniculada, algunas veces de 15 cm de longitud, laxo, las ramas son bastante delgadas, usualmente con largas brácteas verdes similares a los de las inflorescencias pistiladas, las ramas presentan pelos largos, las flores verde

pálido, pedicelado delgado, sépalos de 1.2 mm de longitud; corola escasa de 1 mm de ancho; inflorescencia pistilada con bracteas largas, verdes, de forma cordado-orbicular o reniformes, esta se incrementa en los frutos, largo-ciliado^{11,18}.

- e) Usos: Popularmente es utilizada para aliviar el cólico menstrual, la fiebre y mordeduras de culebra. Recibe los nombres comunes de curarina macho, curarín, curarina hembra aspirina en Huehuetenango^{11,18}.

2. *Hyptis verticillata* Jacq.

- a) Familia: Lamiaceae.
 b) Procedencia: Etnobotánica
 c) Nombre/s comun/es: qis qaway, cola de caballo, isq'ij, hierbabuena de caballo, qye qaway Verbena, hierba Martín.
 d) Descripción botánica y hábitat:

Es propia de matorrales húmedos a secos, frecuentemente rocosos. 1150 msnm o menos, mayormente en lugares bajos. Arbusto erecto, generalmente de 1 a 2 m de altura, usualmente densamente ramificado, con tallos ascendentes o erectos, leñosos, muy foliosos, las ramas diminutamente puberulentas o glabras; hojas membranosas, verde oscuro, estrechamente lanceoladas a elíptico-lanceoladas, de 2 a 8 cm de largo, agudas a largamente acuminadas, agudas o atenuadas en la base, desigualmente aserradas, casi glabras; flores blanco verdosas, pequeñas en grupos axilares densos cortamente pediceladas o casi sésiles, formando espigas muy largas, interrumpidas, foliosas o casi desnudas, éstas paniculadas; brácteas setíferas, pequeñas e inconspicuas; tubo de cáliz de 1 mm de largo en la floración, glabro por fuera y dentro, los dientes triangulares, obtusos, un poco más pequeños que el tubo, verde el tubo de cáliz durante la fructificación de 2 mm de largo, los dientes conniventes; corola de 3 mm de largo, núculas oblongos, redondeado-truncadas en el ápice, diminutamente reticulados^{11,18}.

- e) Usos: En Tzetoc se usa contra calambres. De la rama se hace un cocimiento que se usa para un preparado oral y para baños. Del preparado oral se toma un vaso. También se usa contra resfriados. Las hojas y raíz que se preparan para baños calientes. En Santa Lucía se usa contra el dolor de estómago. Se hace un cocimiento de la hoja y se toma tres veces al día. Otras aplicaciones son: picaduras de insectos, reumatismo, piel irritada,

laxante, lavado de heridas, bronquitis, anticatarral, alivio del dolor post parto. Esta planta también se utiliza para repeler piojos de las aves de corral^{11,18}.

3. *Passiflora coriacea* Juss.

- a) Familia: Passifloraceae
- b) Procedencia: Etnobotánica
- c) Nombres comunes: Recibe los nombres comunes de Hoja de murciélago, ala de murciélago, granadilla de monte, media luna, Xicozotz (Petén, Maya); Xa mama'; Xab li sui, granadilla de monte.
- d) Descripción botánica y hábitat: Crece en bosques húmedos o secos, algunas veces en bosques de pino o mixtos, usualmente a 1,000 metros o menos de altitud sobre el nivel del mar. Usualmente es una pequeña parra herbácea; con estipulas lineares angostas, pecíolos de 2 a 4 cm de longitud, biglandular cerca de la base, raramente glandulares al ápice o 4-glandular, las glándulas son césiles; las hojas transversalmente oblongo-elípticas, de 7 cm de longitud y de 7 a 25 cm ancho, coriáceas o membranosas^{11,18}.
- e) Usos: En Guatemala y otras partes de América Central, son utilizadas como medicina doméstica particularmente para infecciones de los riñones así como diurético, se utilizan los vástagos y hojas secas. También es utilizada para el asma, la tos y afecciones nerviosas^{11,18}.

4. *Piper aeruginosibaccum* Trelease.

- a) Familia: Piperaceae.
- b) Procedencia: Etnobotánica.
- c) Nombre/s común/es: tical q'en, tiec q'em, sunum qie, ri lo mi tzul.
- d) Descripción botánica y hábitat: Crece en bosques húmedos, algunas veces de pino o en pantanos de Mancarí a una altura de 900 metros o menos sobre el nivel del mar. Es un arbusto de más o menos 2 m de alto, algunas veces un pequeño árbol, las hojas pueden ser densamente hirsústulas o hispídulas, aunque algunas veces sin pelos. Los pecíolos tienen 1 centímetro o menos de longitud, algunas veces más largos en las hojas más bajas. Las hojas son ovals-oblongas o elípticas-ovaladas, de 12 a 20 cm de longitud y 4.5 a 9 cm de ancho, terminando abruptamente en forma acuminada o largamente acuminada, bastante desigual en la base y más o menos oblicua,

usualmente redondeada o más o menos obtuso en unos de sus lados que el otro. Su superficie es lustrosa cubierta de finos pelos, su color es verde oscuro o negruzco, aterciopelada al tacto, hispídulo por debajo, especialmente en los nervios, con pelos cortos sórdidos, menos áspero al tacto, penninervado, los nervios son 3 de cada lado, arqueado ascendente, el nervio central se encuentra sobre la mitad de la hoja, las venas son prominentes por debajo, laxamente reticulado, pedúnculos cortos, delgados, densamente puberulentos o hispídulos^{11,18}.

e) Usos: Es utilizada para aliviar el dolor de corazón, tos, calentura, granos¹¹.

E. Determinación de la actividad biocida (fase de pretamizaje):

Se entiende por pretamizaje a una serie de ensayos biológicos (bioensayos) generalmente *in vitro* que dan una idea preliminar de la posible bioactividad de un extracto crudo, fracción purificada o principio activo puro. Las técnicas de pretamizaje pretenden orientar al investigador con técnicas relativamente sencillas, que no involucren animales, que tengan bajo costo y que pueda realizarse un número grande de muestras en forma rápida, sencilla, reproducible y de bajo costo. Los estudios de la actividad antimicrobiana se utilizan para evaluar la actividad inhibitoria de una planta o sus derivados, la potencia del compuesto, la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas de una droga vegetal, el espectro de microorganismos inhibidos y la concentración de la droga en el organismo humano. Para evaluar la actividad es preciso conocer el modelo microbiano perfectamente y tenerlo controlado en las condiciones de laboratorio, ya sea por procedimientos *in vitro* o *in vivo*. La medición de esta actividad pueden realizarse por medio de tres diferentes métodos, que son por difusión, por dilución y bioautografía. De estos se ha hecho un considerable número de modificaciones con el fin de obtener los mejores resultados. Algunos factores como la composición del medio, los microorganismos utilizados en la prueba, método de extracción, pH y la solubilidad de la muestra en el medio de cultivo; pueden hacer variar los resultados, por lo que es difícil establecer un método estandarizado para estudiar la actividad antimicrobiana de las plantas medicinales propuestas²⁰.

1. Método de difusión: Tienen la característica de no requerir una dispersión homogénea en agua del extracto a probar, se utiliza un disco, agujero o un reservorio cilíndrico el reservorio contiene la muestra a probar es puesta en contacto con un medio inoculado y, después del período de incubación, el diámetro de la zona clara alrededor del reservorio (diámetro de inhibición) es medido. Este método fue originalmente diseñado para monitorear la cantidad

de sustancias con características de antibióticos presentes en extractos crudos. Los métodos de dilución requieren de una dispersión homogénea de la muestra en agua. Se utiliza para determinar, principalmente, la concentración inhibitoria mínima (CIM) de extractos, aceites esenciales y sustancias puras. Pueden también utilizarse como tamizaje preliminar de actividad antimicrobiana.²⁰ Los métodos de difusión son muy utilizados en la investigación a pesar de ciertas dificultades, puesto que son modelos de baja credibilidad para muestras que sean de difícil difusión en el medio no existiendo relación entre el poder de difusión y la actividad antimicrobiana²⁰.

La determinación de la actividad antimicrobiana puede dividirse en dos fases: tamizaje y concentración inhibitoria mínima (CIM). Este último procedimiento se realiza únicamente con los microorganismos cuyo crecimiento fue inhibido por el extracto en la primera fase. Estos procedimientos emplean la dilución de los extractos en el agar indicado para el tipo de microorganismo a ensayar, inoculándolos en la superficie del medio según un patrón determinado²⁰.

2. Método de dilución en agar: En este método, una cantidad definida de muestra es mezclada con agar nutritivo. La ventaja de este método es la simplicidad y la rapidez así como la posibilidad de usarla en estudios antimicrobianos de muestras solubles e insolubles en agua como los aceites esenciales. Pueden manejarse seis microorganismos en cajas de Petri y se interpreta como un resultado positivo, la ausencia del crecimiento característico de cualquiera de estos. El método de dilución en agar es aplicable tanto a muestras de característica polar como apolar²⁰.
3. El método Bioautográfico: De acuerdo a Betina¹² es el método más importante de detección para compuestos antimicrobianos nuevos o no identificados. Este se basa en los efectos antibacterianos, antiprotozoos, antitumorales, etc. de las sustancias de interés. Consiste en un procedimiento basado en una técnica de difusión en agar, en donde el compuesto antibacteriano es transferido de una capa cromatográfica e inoculado en una placa con agar, en donde las zonas de inhibición son visualizadas por la actividad de la deshidrogenasa demostrada por los reactivos utilizados²⁰.

F. Procedimientos del tamizaje de la actividad antimicrobiana:

Un programa de tamizaje antimicrobiano puede considerar el evaluar la inhibición de bacterias, hongos, virus, parásitos, según sea la capacidad y requerimientos e intereses de la investigación¹.

El tamizaje de la actividad antimicrobiana de las plantas y sus diferentes extractos es un procedimiento que sirve para revelar la potencial fuente de nuevos agentes antiinfectivos que estas pudiesen constituir²³.

Muchos de los primeros estudios realizados, utilizaron cultivos de microorganismos los cuales generalmente no estaban disponibles o incluían individuos que no eran representativos de sus respectivos géneros, además de requerir condiciones muy especiales para su estudio. Por muchos años los cultivos de microorganismos representativos utilizados para muchos propósitos han sido depositados en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC por sus siglas en inglés), así como en otras colecciones estándar. Un buen número de estas cepas se encuentran comercialmente disponibles y son utilizadas para el tamizaje de antibióticos. Esto ha permitido obtener un extenso conocimiento de la potencia clínica específica de muchos antibióticos sobre cultivos de microorganismos de esta colección. De esta colección se sugiere incluir para un estudio de tamizaje, como ya se había mencionado anteriormente, aquellos microorganismos más representativos de sus géneros y que además, en lo posible, no requieran de condiciones extremadamente especiales para su desarrollo. Para esto se proponen bacterias Gram positivo, Gram negativo, Ácido resistentes, levaduras y hongos¹.

- a) Preparación del extracto etanólico: Para la utilización de las plantas medicinales la población usa técnicas sencillas, dependiendo del nivel técnico del curandero, los medios disponibles y la tradición. Sin embargo, para la investigación fitoquímica y farmacológica es necesario realizar además extracciones que sean reproducibles, cuantitativas, estables y eficientes para el efecto que se desea demostrar.²⁰ Rutinariamente, 500 g de la parte de la planta a utilizar es molida y posteriormente introducida a un percolador en el que se lleva a cabo la extracción con etanol al 95 por ciento. Normalmente 5000 ml o menos de etanol son suficientes para este procedimiento. El percolado es concentrado en un rotavapor a una temperatura que no exceda de 40 °C bajo presión reducida por una bomba de vacío.

b) Pruebas antimicrobianas:

De los procedimientos que se aplican para estas pruebas, el más conveniente para laboratorios pequeños es el de dilución en agar. En este proceso una cantidad determinada del extracto a estudiar es mezclada con agar nutritivo o sabouraud. Este procedimiento tiene la ventaja de que no es totalmente necesaria la esterilidad del extracto. Los microorganismos son mantenidos en agar Trypticasa Soya en "slant" y recobrados para la prueba incubándolos en caldo Trypticasa soya por 24 h. *Mycobacterium smegmatis*, *C. neoformans*, *C. albicans*, son incubadas por 48 hrs. Luego los organismos son diluidos 1:100 con agua estéril para las bacterias y en solución salina estéril para las levaduras. Los microorganismos son inoculados en cuadruplicado siguiendo para esto, un patrón radial para dos cajas de agar-planta A y B, en un orden al azar. Las placas ya inoculadas son incubadas a 37 °C por 24 a 48 horas, si es necesario. Se evalúa si hubo crecimiento. Una completa supresión del crecimiento es requerida para declarar que el extracto es activo. Los extractos que son activos deben ser probados nuevamente para confirmar los resultados. Deben colocarse dos cajas de control positivo por lote de pruebas, para evitar confusiones en la interpretación provocadas por probable contaminación durante la preparación del medio de cultivo¹.

En el caso de los hongos, el procedimiento considera la preparación del agar-planta utilizando para esto agar sabouraud; preparando 4 repeticiones con igual número de cajas por cada extracto. En la superficie del medio se horadan 4 agujeros equidistantes en los cuales se depositarán esporas de los hongos filamentosos a probar, en una concentración aproximada de 1×10^5 esporas/ml. Las cajas ya inoculadas se incuban a 27 °C por 14 días. Se coloca 1 caja control con agar sabouraud como control negativo³.

c) Actividad Larvicida:

En respuesta a la fuerte presión selectiva a la que las plantas son sometidas por parte de los herbívoros, estas han desarrollado una gran variedad de respuestas defensivas químicas y estructurales. Las defensas fitoquímicas que se encuentran en algunos fotoautótrofos pueden producir una amplia variedad de respuestas tóxicas en los herbívoros. Los fitoquímicos tóxicos son metabolitos secundarios, sintetizados como resultado de vías biosintéticas aberrantes. Su acción tóxica afecta principalmente los axones y sinápsis del sistema nervioso de los insectos, así como sus músculos, la respiración y el comportamiento de estos. De hecho, algunos fitoquímicos han sido utilizados para desarrollar insecticidas comerciales y servir como nuevos

modelos de control de insectos. Sin embargo, los estudios de las defensas químicas de las especies tropicales han sido poco estudiadas aunque se han desarrollado investigaciones orientadas a determinar la acción tóxica de algunas plantas en los diferentes estadios de larvas de insectos. Por su importante papel en la transmisión de enfermedades se tiene interés en larvas de mosquitos tales como algunas especies de *Anopheles*, *Aedes* y *Culex*. Este tipo de estudios se ha encontrado que la efectividad de las plantas para matar a las larvas depende de las dosis aplicadas, la parte de la planta utilizada así como la especie de mosquito que se utiliza²⁴.

d) Citotoxicidad contra *Artemia salina*:

En la investigación de compuestos fitoquímicos con bioactividad se requiere de bioensayos cuya aplicación sea simple, rápida y económica, además de que sea posible aplicar métodos estadísticos para su interpretación. Utilizando estos métodos se logra una rápida detección de nuevos y diversos compuestos con bioactividad, especialmente en el caso de compuestos con actividad antitumoral o toxicidad. La mayoría de compuestos antitumorales son citotóxicos, para poder demostrar esto se puede utilizar la prueba de letalidad de estos compuestos contra nauplios de *Artemia salina*, esta prueba ha demostrado tener buena correlación ($p=0.036$) con la citotoxicidad en 9KB, así como la prueba de la inhibición de la tumefacción de la papa. Esta última prueba y la citotoxicidad contra *Artemia salina* son reportadas como las más adecuadas para el pretamizaje de sustancias antitumorales²⁵.

La *A. salina* es un crustáceo perteneciente a la subclase Branchiopoda orden Anostraca, tiene la característica de soportar amplios grados de salinidad en el medio en que habite, esto lo hace ser un animal relativamente fácil de cultivar y estudiar. El primer reporte de su uso como organismo de prueba aparece en 1956, desde esa fecha se ha tenido reportes del uso de este animal en estudios ambientales, tamizaje de toxinas naturales, y en general para evaluar sustancias bioactivas en extractos de plantas. Para esta última aplicación ha sido propuesto como prueba estandarizada por Vanhaccke y Persoone. La reproducción de este crustáceo puede realizarse tanto de forma ovípara como vivípara, la embriogénesis empieza y se completa en aproximadamente 16 o 36 horas después de la inmersión de los huevecillos en el medio líquido. Al salir de la membrana que los protege, los nauplios empiezan inmediatamente a nadar y a mover sus antenas, anténulas y mandíbulas. En el ensayo estos nauplios, en número de 10 a 15, se depositan en los pocillos de una placa a la cual se agregan diferentes concentraciones del extracto de la planta a probar. Se cuentan, con la ayuda de un

estereóscopo, la cantidad de nauplios muertos en relación con el número total de nauplios en el pozo. Si el porcentaje de muertos es mayor del 50 por ciento se procede a calcular el LD_{50} , que representa la dosis a la cual se presentará el 50 por ciento de nauplios muertos con un límite de confianza del 95 por ciento. Este dato puede calcularse ya sea por la fórmula: $SE_{LD_{50}} = \sqrt{(0.79 \ln R/n)}$ o bien por medio de un gráfico que se traza según el número acumulado de sobrevivientes con el número acumulado de muertos en el mismo eje (número de animales vs. Dosis logarítmica). Como un nauplio se considera muerto si se encuentra al fondo del posillo de prueba, es importante considerar si es que está solamente inmovilizado y agonizante al momento del escrutinio. Es necesario evaluar el movimiento de mandíbulas, antenas y anténulas no solamente de su comportamiento natatorio. Algunas veces los restos del extracto pueden provocar esta inmovilización mecánica, por lo que es recomendable filtrar el extracto antes de agregarlo. Otros factores que afectan la reproducibilidad de la prueba son la edad de la larva, la temperatura, la composición salina del medio²⁶.

e) Actividad Antiprotozoaria:

Una de las mayores causas de enfermedad, especialmente en países del tercer mundo, son las enfermedades causadas por protozoos de diferentes tipos. La *Leishmania* afecta a unas 12 millones de personas. Cerca de 350 millones están expuestos a infectarse, con aproximadamente 400,000 a 2,000,000 de nuevos casos anualmente. En Guatemala la leishmaniasis cutánea o mucocutánea son causadas por *L. mexicana* y *L. braziliensis*. El norte del país es el área más afectada, principalmente el departamento de El Petén. La incidencia de Leishmaniasis cutánea es de 0.9 por ciento con aproximadamente 2500 nuevos casos durante el año 1990. Las drogas a elección para el tratamiento de esta enfermedad requieren una terapia por largo tiempo de duración, pudiendo causar efectos tóxicos lo cual hace necesario el encontrar urgentemente nuevas drogas para el tratamiento efectivo de esta patología. La enfermedad de Chagas es otra de las enfermedades de importancia en América. Esta enfermedad se encuentra distribuida desde México hasta Brasil, endémica en 21 países con 16 a 18 millones de personas infectadas. En Guatemala se encuentra principalmente en áreas rurales. El organismo responsable es el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido a los humanos por el insecto *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*. Las drogas disponibles para el tratamiento son efectivas únicamente en el estado agudo de la enfermedad²⁷. Pueden causar anorexia, desordenes gastrointestinales, neuropatías y rash. Como consecuencia de estos efectos secundarios, muchas personas detienen el tratamiento

por largo tiempo. Se considera que el tratamiento con plantas medicinales utilizadas popularmente en Guatemala pueden constituir una alternativa en el tratamiento de este tipo de enfermedades, analizando sus propiedades mediante estudios que incluyan bioensayos²⁸. El método de tamizaje de la actividad antitripanosoma consiste en un procedimiento *in vitro* adaptado por González et al. y Hocquemiller et al.⁵, para epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Los epimastigotes son mantenidos en medio LIT con 10 por ciento de suero bovino fetal inactivado con calor, a 26 °C. Los subcultivos son hechos una vez a la semana. Los tripomastigotes se cultivan a 37 °C en cultivos de células fibroblásticas (L-cell) mantenidos en medio MEM y enriquecido con suero fetal inactivado el cual se describió anteriormente. Los tripomastigotes son separadas de los fibroblastos utilizando una columna de CM-celulosa. Para el ensayo tripanocida una suspensión de 2×10^6 epimastigotes/ml y $3-5 \times 10^6$ tripomastigotes/ml se preparan añadiendo medio LIT y MEM, respectivamente. Estas suspensiones se inoculan por triplicado con una dilución del extracto de la planta en estudio de 1 mg/ml en una microplaca de titulación, evaluando el número de parásitos vivos y muertos, calculando la relación utilizando el programa Finney's Probit Análisis en ambiente DOS Basic.^{6,27} obteniendo como resultado la concentración a la que los extractos inhiben al 90 por ciento de los protozoos a los que se enfrentan (CI_{90}).

IV. JUSTIFICACIÓN

El PNLL presenta la única muestra representativa de los ecosistemas naturales de la región noroeste del departamento de Alta Verapaz. Su estado poco alterado le hace ser considerada como una importante zona para la obtención de recursos naturales, así como para la conservación de las especies animales y vegetales que en él existen. Así mismo en la zona de influencia del PNLL, sobreviven en condiciones muy precarias, varias comunidades de personas que en su mayoría pertenecen a la etnia k'eqchi'. Esta región presenta un desigual desarrollo socioeconómico, carente de todo tipo de recursos, pero principalmente en lo que respecta a la atención en salud, características que hacen que la población sea más vulnerable a las enfermedades infecciosas asociadas con estas condiciones de vida. Ante esta situación las comunidades recurren a conocimientos y prácticas ancestrales del cuidado de la salud, principalmente al uso de plantas medicinales de forma empírica.

Si se consideran las precarias condiciones de vida de la población y la importancia que las plantas medicinales representan para ellos como recurso para el cuidado de su salud, así como la necesidad de conocer las características de los recursos con que cuenta el parque para asegurar su conservación y desarrollo sostenible, se plantea la necesidad de un proyecto de investigación como el presente, que utilizando las metodologías ya establecidas y estandarizadas en estudios anteriores, determine si las plantas utilizadas por la población presentan alguna actividad efectiva contra las bacterias, hongos, larvas y protozoos considerados como parte del pretamizaje en el estudio de las propiedades biológicas de las plantas medicinales, así también si tienen actividad Citotóxica contra *Artemia salina*, prueba que se considera como indicadora de una potencial actividad anticáncer o sugerente de algún nivel de toxicidad en caso de ser positiva.

Estos resultados pueden utilizarse para fortalecer y mejorar las prácticas tradicionales del uso de las plantas medicinales por parte de la población; constituyen la parte inicial de pruebas posteriores para detectar fuentes naturales de medicamentos e incluso constituirse en futuras alternativas de producción que propicien el desarrollo sostenido del área en mención.

Se consideró necesario investigar aquellas plantas que, siendo utilizadas con fines medicinales, fuesen nativas de la región y no hubiesen sido estudiadas previamente. Se encontraron entonces cuatro plantas que, de acuerdo a la información obtenida de la base de datos NAPRALERT, no se tenían referencias en cuanto a su actividad biológica de cualquiera de sus extractos.

V. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL:

- a) Analizar la actividad biocida de los extractos etanólicos de las plantas: *Cissampelos tropaeolifolia*, *Hyptis verticillata*, *Passiflora coriacea* y *Piper aeruginosibaccum* provenientes del PNLL.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Obtener las cuatro plantas de uso medicinal en el PNLL y los extractos etanólicos de: *Cissampelos tropaeolifolia*, *Hyptis verticillata*, *Passiflora coriacea* y *Piper aeruginosibaccum*.
- b) Determinar la actividad contra bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Mycobacterium smegmatis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Escherichia coli*), hongos (*Trichophyton rubrum*, *Aspergillus flavus*, *Microsporum gypseum*) y levaduras (*Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*) incluidas en la fase de pretamizaje, de los extractos etanólicos de las cuatro plantas en estudio.
- c) Determinar la actividad citotóxica contra nauplios de *Artemia salina* de los extractos etanólicos de las cuatro plantas en estudio.
- d) Determinar la actividad Antiprotozoaria (*Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis* y *Trypanosoma* y *T. cruzi*) de los extractos etanólicos de las cuatro plantas en estudio.

VI. HIPÓTESIS

El estudio es de tipo experimental, en donde se está probando los efectos biocidas de las plantas, pero las plantas en si no están siendo modificadas por lo que la hipótesis que se plantea es estadística y se escribe en la sección de análisis de resultados.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo: 209 plantas de uso medicinal, detectadas en estudio etnobotánico previo, en la zona de influencia en el PNLL.

B. Muestra: 4 plantas de uso medicinal en el PNLL (*Cissampelos tropaeolifolia*, *Hyptis verticillata*, *Passiflora coriacea* y *Piper aeruginosibaccum*) que cumplen con la características de: no haber sido estudiadas previamente, ser nativas de la región detectadas anteriormente por la encuesta etnobotánica correspondiente y que puedan ser obtenidas durante la época de recolección asignada.

C. Materiales y equipo:

Campana de flujo laminar.

Equipo de rotavapor.

A temperatura de 40 ± 1 °C

Equipo de percolación.

Pipetas automáticas.

de 10 µl, 100 µl, 1000 µl,

Incubadoras

2 incubadoras a 27 °C y 36 °C

Refrigeradoras y congeladores

1 refrigeradora a 5 °C y un congelador a -80 °C

Balanza analítica.

0.001 g \pm 1

Liofilizador.

a 4 atm de presión

Autoclave.

Medios de cultivo

Tripticasa soya, Mueller Hinton, Sabouraud, Medio Takashio,

Solventes

Agua desmineralizada, etanol al 50 por ciento, etanol 95 por ciento

Cajas de Petri descartables

Simples y cuadrilate.

Botellas de cultivo

Cristalería

Placas de Microtitulación de fondo plano.

D. Metodología:

1. Obtención de los extractos:

Las plantas se escogieron entre las 209 con usos terapéuticos, detectadas por encuesta etnobotánica previa, y utilizando como criterio que sea una planta nativa poco o no estudiada previamente. Las muestras serán obtenidas en su lugar de crecimiento silvestre en el área boscosa del PNLL, por la colaboradora de la escuela de Biología de la Universidad de San Carlos de Guatemala, Cecilia Cleaves.

El material vegetal se secó a la sombra, se molió y el polvo se colocó en el percolador realizando extracciones etanólicas por precolación. Los extractos se concentraron en rotavapor y luego en desecadora⁶.

2. Determinación de la actividad antibacteriana y levaduras:

La actividad antibacteriana y antilevadura se determinó por el método de dilución de Mitscher et al¹. En 9 ml de agar Muller-Hinton, previamente autoclaveado, (AMH) se agregó 1.0 ml de solución del extracto disuelto. Este debe tener una concentración de 10 mg/ml. La concentración final que se obtiene es de 1 mg/ml. Se dejó solidificar e incubar a 36 °C por 24 horas, para comprobar esterilidad. Se purificaron los microorganismos a ensayar inoculando en un tubo con 8 ml de agar Mueller Hinton inclinado, incubando a 36 °C por 24 horas. Se utilizaron las bacterias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Candida albicans* ATCC 10231, *Cryptococcus neoformans* C13, inoculando una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5.0 ml de caldo Trypticase soya, incubándolos por 24 h a 36 °C. Para *C. albicans* y *C. neoformans* el caldo a utilizar fue Sabouraud incubando por 48 hrs a 27 °C. Luego se diluyó con agua destilada estéril, 0.05 ml de la suspensión anterior en 4.95 ml de agua (dilución 1:100), para las levaduras se utilizaron 4.5 ml de solución salina estéril suspendiendo 0.5 ml de caldo. Se inocularon en dos cajas con agar-planta (A y B) una asada de cada uno de los microorganismos en posiciones de asignadas al azar en una disposición radial. Se realizaron cuatro repeticiones por microorganismo y se dejó reposar durante 5-10 minutos.

Se incubaron a 36 °C durante 24 horas. Se colocaron dos cajas como control negativo en las cuales se diluye 1 ml de alcohol al 50 por ciento en 9 ml de agar Muller-Hinton. La actividad fue demostrada por inhibición del crecimiento bacteriano. En los extractos positivos se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) en cajas cuadrilate con 1, 0.5 y 0.25 mg/ml. Las cajas fueron preparadas con las siguientes diluciones del extracto:

3.6 ml de agar + 0.4 ml de la solución de extracto = 1.0 mg/ml

3.8 ml de agar + 0.2 ml de la solución de extracto = 0.5 mg/ml

3.9 ml de agar + 0.1 ml de la solución de extracto = 0.25 mg/ml

Un cuadrante con 4.0 ml de agar como control negativo.

Estas cajas se inocularon con tres estrías en cada uno de los cuadrantes y se incubaron a 36 °C por 24 horas. La lectura e interpretación es la misma que para el tamizaje de actividad antibacteriana.

3. Actividad antifúngica: La actividad contra hongos filamentosos: *Aspergillus flavus* CCQQ A-75, *Microsporium gypseum* CCQQ-M-71, *Trichophyton rubrum*, se determinó por el método de Brancato & Golding modificado por MacRae et al³⁴. Que consiste en purificar los hongos en Sabouraud, según sea el crecimiento de cada hongo, luego se inoculan en medio Takashio (Sabouraud modificado para producción de esporas), estos se incuban a 27 °C por 21 días. Se colectaron las esporas agregando 2 ml de agua destilada estéril y desprendiendo el hongo con la ayuda de una varilla. Se procedió a contarlas en cámara de Neubauer hasta estandarizar una suspensión de 100 esporas/ml lo que es aproximadamente 10 esporas/cuadrante, ya obtenidas se procedió a guardar la suspensión en viales estériles a 4 °C. Se prepararon cuatro cajas con 13.5 ml de agar sabouraud al que se agregaron 1.5 ml del extracto a probar (Dilución 1:10), la concentración final que se obtuvo fue de 1 mg/ml. Las cajas se incubaron a 36 °C durante 24 horas para comprobar esterilidad, luego se guardaron en refrigeración hasta el momento de su uso. Se perforaron agujeros de 6 mm de diámetro, en los cuales se inocularon 30 µl de la suspensión de esporas, luego se incubaron a 27 °C por 14 días.

Se midió el diámetro de la colonia del hongo en mm. Se calculó el porcentaje de inhibición, comparando el diámetro contra el de las colonias en las cajas control. Se tomaron como positivos los extractos que redujeron el diámetro de la colonia en un 75 por ciento. Para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) se utilizó el mismo procedimiento, pero con diluciones de extracto con 1.0, 0.5 y 0.25 mg/ml; la interpretación de los resultados es la misma que se aplicó en el procedimiento de tamizaje¹⁶.

4. Actividad contra protozoos:

La actividad contra epimastigotes se determinó por el método de González et al. Y Hocquiemiller et al.^{5,29}. Consistió en cultivar epimastigotes de *T. cruzi* MHOM/GT/96/SMI-04392 proporcionados por el departamento de Citohistología, en medio LIT. Se realizaron pasajes sucesivos, usando el crecimiento exponencial de 2×10^6 epimastigotes/ml. Los tripomastigotes se cultivaron en células fibroblásticas (células L) y se purificaron en columna de intercambio iónico con CN/Celulosa según Kambara & Nakabayashi⁵. El reto se hizo en microplaca usando medio MEM con suero bovino³⁰.

La actividad contra promastigotes de *Leishmania* se determinó por una adaptación del método usado para epimastigotes^{3,4}; las cepas utilizadas fueron *Leishmania brasiliensis* MHOM/BR/75/M2903 y *L. mexicana* MNYC/BZ/62/M376 proporcionadas por el MERTU de la Universidad del Valle de Guatemala. Los amastigotes se cultivaron en medio Evans-LIT adicionado de 10 por ciento de suero bovino fetal, 20 por ciento de sangre desfibrinada de caballo y antibióticos.

Cada cultivo se mantuvo en el medio específico; se ajustó el pH a 6.9-7.2 porque favorece el crecimiento y es el adecuado para los ensayos²⁹. Se disolvió el compuesto en DMSO y en medio, esterilizando en filtro de 0.22 μ m, se preparó solución stock de 2 mg/ml, haciendo diluciones en placa con concentración final de 1,000, 500 y 250 ppm, agregando un volumen igual de suspensión de parásitos con 2×10^6 protozoos/ml e incubar a 26-27 °C por 24-72 horas.

Cada prueba se realizó en triplicado y incluyendo controles sin el extracto. Luego de la incubación se examinaron los ensayos al microscopio. Contando el número de parásitos y calculando el porcentaje de sobrevivencia comparado con el inóculo inicial y el control negativo.

5. Tamizaje de la actividad larvicida:

Luego de colocar en un vaso de precipitar 200 ml de agua del chorro y dejarla reposar por 48 horas, se agregaron unos 40 mg de huevezuelos de *Aedes aegypti*. Incubando por 24 horas a temperatura ambiente.

Se pesó 1 mg del extracto a ensayar y se disolvió con 1 ml de agua de chorro reposada. En la micro placa se agregaron por triplicado: 100 μ l del extracto disuelto + 100 μ l de agua de chorro reposada con 10 a 15 larvas. Esto se incubó a temperatura ambiente (entre 25-28 °C). Se contaron con el estereoscopio el número de larvas muertas y se determinó la CL₁₀₀ (concentración letal al 100 por ciento). La prueba de tamizaje es positiva si todas las larvas

están muertas. Se calculó el CI_{100} repitiendo la prueba utilizando dosis de 0.5, 0.15 y 0.124 mg/dl⁶ en los casos en los que se hizo necesario.

6. Citotoxicidad:

Se preparó previamente un litro de agua de mar, disolviendo 35 g de sal de mar en un litro de agua destilada.

Se colocaron en un vaso de precipitar 200 ml de agua de mar aireando por 30 minutos como mínimo. Se colocó el agua en una pecera y se agregaron 40 mg de huevezuelos en el lado oscuro de la misma incubando por 48 horas a temperatura ambiente y con luz artificial. Al eclosionar, los nauplios (larvas) pasaron al área abierta de la pecera (lado con luz). Se pesaron 0.0040 g del extracto a ensayar y se disolverán con 2 ml de agua de mar. Se agregaron por triplicado en una microplaca: 100 μ l del extracto disuelto + 100 μ l de agua de mar con 10 a 15 nauplios. Como control negativo se colocaron: 100 μ l de agua de mar + 100 μ l de agua de mar con 10 a 15 nauplios. Las placas se incubaron a temperatura ambiente con luz artificial por 24 horas.

Se contaron en el estereoscopio o microscopio el número de nauplios muertos. Agregando metanol a los pozos, esperando 15 minutos y contando de nuevo todos los nauplios. Si se observaban nauplios muertos en el control negativo la prueba no era válida y se repetía de nuevo²⁴.

E. Diseño experimental:

1. Tipo de estudio: Experimental.
2. Muestreo: El muestreo se realizó con la colaboradora del área Lic. Cecilia Cleaves, según las características ya establecidas para las muestras.
3. Variables de interés:
 - i) Variable independiente: Plantas de uso medicinal en el PNLL.
 - ii) Variable dependiente: La actividad biocida de los extractos etanólicos de las plantas seleccionadas.
4. Interpretación de resultados:
 - i) Demostración de la actividad antibacteriana:
 - Si había crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo: Actividad Negativa.
 - Si no había crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo: Actividad Positiva.
 - Presencia de microorganismos fuera de la inoculación: Contaminación.

ii) Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM):

Se prepararon diluciones de extracto en agar de 1, 0.5, 0.25 y se reportaron los resultados según el paso 4.i.

5. Tamizaje antimicótico *in vitro*:

i) Hongos filamentosos: Se midió el diámetro de la colonia del hongo en mm, se calculó el porcentaje de inhibición, comparando el diámetro contra el de las colonias en las cajas control según la fórmula: Porcentaje de inhibición = $D_m/D_c * 100$. Se tomaron como positivos los extractos que redujeron el diámetro de la colonia en un 75 por ciento.

ii) Hongos levaduriformes: Se observó el crecimiento de la levadura en el medio:
Crecimiento (+) = NO HAY ACTIVIDAD.

Crecimiento (-) = Inhibición o ACTIVIDAD ANTILEVADURA.

Para evaluar la concentración inhibitoria mínima (CIM), se ensayaron cantidades decrecientes del extracto vegetal: 1:10, 1:50; 1:100. su interpretación es la misma que en el inciso 5.ii.

6. Actividad Antiprotozoaria *in vitro*:

i) Actividad contra protozoos: Epimastigotes de *T. cruzi*

La actividad antitripanosoma *in vitro* según Fournet *et al.*³⁰ y adaptado por González *et al.*⁵ consistió en descongelar rápidamente a 37°C un vial conteniendo cepa *T. cruzi*. Se lavó con PBS estéril, se centrifugó a 3000 RPM por 10 minutos. Se lavó con medio LIT, se trasladaron los parásitos a frascos de cultivo con medio LIT. Se incubó a 26°C. Se revisaron los cultivos cada dos días contando los parásitos para alcanzar un recuento de 1×10^6 parásitos/ml diluyendo con medio LIT. se disolvió 100 mg de extractos en agua destilada si el compuesto era polar o bien en dimetilsulfóxido (DMSO) si era apolar, se mezcló 10 µl de la solución de extracto con 990 µl de medio de cultivo LIT (1mg/ml). Se pipeteó en triplicado 100 µl de extracto en microplaca, se agregaron 100 µl de la suspensión de parásitos a cada pozo (1:1). Se utilizó como control positivo una solución al 50mg/ml de Nifurtimox y como control negativo una solución al 0.5 por ciento de DMSO en medio LIT. Se incubó a 26°C por 48 horas. Se contó en cámara de Neubauer y se interpretó: comparando el número de parásitos vivos contra el control negativo. Se utilizó regresión lineal y el programa Finney para calcular la CI_{90} ^{5,28}

ii) Actividad contra protozoos: Promastigotes de *Leishmania* sp.

La actividad contra promastigotes según Berger *et al.*²⁷, González *et al.*⁵, Hocquemiller *et al.*²⁹ y Fournet *et al.*³⁰ consistió en preparar tubos conteniendo 2 ml de medio difásico Evans-LIT. Se preparó una suspensión de 1×10^6 promastigotes/ml de las cepas de *L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2903 y de 2×10^6 para *L. mexicana* MNYC/BZ/62/M376, por conteo en cámara de Neubauer diluyendo con medio LIT. Se inoculó el medio con los promastigotes y se incubaron a 26°C, se realizó resiembra en tubos cada cuatro días. Se disolvió 100 mg de los extractos en agua destilada o DMSO según su afinidad polar. Se mezcló 10 µl de la solución de extracto con 990 µl de medio de cultivo LIT (2mg/ml). Se pipeteó por triplicado 100 µl de extracto en microplaca, se agregó 100 µl de la suspensión de parásitos a cada pozo (1:1). Se incubaron las microplacas a 26°C durante 48 horas. Se determinó la actividad contra *Leishmania* sp., por conteo de promastigotes viables en cámara de Neubauer y se interpretó comparando el número de parásitos vivos contra el control negativo. Utilizando Regresión Lineal y el programa Finney para calcular la CI_{90} ^{27,28}.

7. Determinación de Citotoxicidad con *Artemia salina*:

Interpretación: Para calcular el porcentaje de camarones muertos

Se sumó el número de camarones muertos en los tres pozos (X)

Se sumó el número total de camarones en los tres pozos (Y)

Dividiendo X dentro de Y y luego multiplicando por 100.

Si el porcentaje de camarones muertos es mayor del 50 por ciento, se repitió la prueba utilizando dosis de 1.0, 0.5 y 0.25 mg/ml. Se obtuvieron los valores de X y Y en cada dosis y se determinó el valor de DL_{50} con el programa Finney Probit en ambiente DOS.

Si el porcentaje era menor del 50 por ciento la Citotoxicidad se consideró mayor de 1 mg/ml.

8. Tamizaje de la actividad larvicida:

Interpretación: La prueba de tamizaje se consideró positiva si todas las larvas estaban muertas. Si el porcentaje de larvas muertas era del 100 por ciento, Se calculó la CL_{100} para ello se repitió la prueba utilizando dosis de 0.5, 0.15 y 0.124 mg/ml.

VIII. RESULTADOS

A. Rendimiento de las plantas en estudio:

En la tabla 1, se observan las cantidades de material vegetal recolectado (en gramos), la cantidad de extracto obtenido (en gramos) y el porcentaje de rendimiento de cada planta.

Tabla No.1
Rendimiento del proceso de obtención de los extractos etanólicos de las plantas en estudio

Planta	Peso (g)	Extracto (g)	Porcentaje de rendimiento (%)
<i>Cissampelos tropaeolifolia</i>	126.88	22.26	17.5
<i>Hyptis verticillata</i>	112.44	22.76	20.2
<i>Passiflora coriacea</i>	118.41	18.36	15.5
<i>Piper aeruginosibaccum</i>	181.81	15.58	8.57

De estas *Hyptis verticillata* resultó ser la planta con mayor porcentaje de rendimiento con un 20.2 por ciento, mientras *Piper aeruginosibaccum* es la especie con menor porcentaje de rendimiento.

B. Determinación de la actividad contra bacterias, hongos y levaduras:

B.1. Fase de tamizaje:

Se determinó la actividad de cada uno de los extractos etanólicos obtenidos, contra las bacterias gram +: *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, las bacterias gram -: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*; los hongos levaduriformes: *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*, los hongos filamentosos: *Aspergillus flavus*, *Trichophytum rubrum* y *Microsporium gypseum*; así como la Mycobacteria: *Mycobacterium smegmatis*. Los resultados de estos ensayos se observan en la tabla No.2.

Tabla No.2
 Actividad antibacteriana y antifúngica de las plantas en estudio
 en el procedimiento de tamizaje

Planta	Bacterias					Mycobacterias	Levaduras		Hongos		
	Gram (+)		E.coli	Gram(-)		M. smegmatis	C. albicans	C. formans	A. flavus	T. rubrum	M. gypseum
S. aureus	B. subtilis	P. aeruginosa		S. typhi							
<i>Cissampelos trapaeolifolia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hyptis verticillata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Passiflora coriacea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Piper aeruginosibaccum</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Referencias: (+) = No hay crecimiento o actividad positiva, (-) = Si hay crecimiento o actividad negativa.

Cuando un microorganismo fue inhibido o no en su crecimiento, se consideró que el extracto tenía actividad positiva (+) o negativa (-) respectivamente. Según se observa en la tabla anterior, la especie vegetal *Piper aeruginosibaccum* es la única de las plantas con actividad biocida positiva contra las bacterias gram +: *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, contra la Mycobacteria: *Mycobacterium smegmatis*. Este mismo extracto no presentó actividad biocida positiva contra el resto de los microorganismos a los que se enfrentó.

Los otros tres extractos de las plantas en estudio no presentaron actividad positiva contra ninguno de los microorganismos a los que se enfrentaron.

B.2 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM):

Esta determinación se realizó únicamente con el extracto de *P. aeruginosibaccum*, puesto que los otros tres extractos en estudio no presentaron ninguna actividad positiva en la fase de tamizaje. Los resultados se observan en la tabla No.3

Tabla No.3

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima de la actividad antibacteriana de *Piper aeruginosibaccum* en mg/ml

Planta	<i>B. subtilis</i>			<i>S. aureus</i>			<i>M. smegmatis</i>		
	1	0.5	0.25	1	0.5	0.25	1	0.5	0.25
<i>Piper aeruginosibaccum</i>	+	+	-	+	+	-	+	+	-

Referencias: (+)= No hay crecimiento o actividad positiva.

(-)= Hay crecimiento o actividad negativa.

Se observa que el extracto etanólico de *Piper aeruginosibaccum* nuevamente inhibió el crecimiento de los tres microorganismos contra los que ya se había enfrentado en la fase de tamizaje. Coincidentemente a la concentración de 0.5 mg de extracto por ml de agar se inhibió el crecimiento de los tres microorganismos en estudio, por lo que se considera que este valor de concentración corresponde a la CIM *in vitro* del extracto contra las bacterias gram +: *B. subtilis*, *S. aureus* y la Mycobacteria: *M. smegmatis*. En la concentración de 0.25 mg/ml se observó crecimiento bacteriano por lo que se considera que a esta concentración el extracto ya no tiene actividad.

- C. Determinación de la actividad Antiprotozoaria (*Leishmania mexicana* y *Trypanosoma cruzi*) de los extractos etanólicos de las cuatro plantas en estudio:

Esta actividad se determinó contra epimastigotes de *T. cruzi* y amastigotes de *L. mexicana* y *L. braziliensis*. Para esto se enfrentaron los extractos a los protozoos antes mencionados determinando, microscópicamente, el número de parásitos vivos en los pozos de prueba contra el control negativo. Los resultados se analizaron mediante el modelo estadístico Finney's Probit Análisis, para obtener de esta manera el valor de la concentración a la que los extractos ensayados tenían actividad contra el 90 por ciento de los protozoos (CI₉₀) a los que se enfrentaron.

Tabla No.4
Actividad Antiprotozoaria (*L. mexicana*, *T. cruzi* y *L. braziliensis*)
de las cuatro plantas en estudio en mg/ml*

Planta	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>T. cruzi</i>
<i>Cissampelos tropaeolifolia</i>	>1	>1	>1
<i>Hyptis verticillata</i>	0.81	>1	0.92
<i>Passiflora coriacea</i>	>1	>1	>1
<i>Piper aeruginosibaccum</i>	>1	>1	1

* Finney's Probit Analysis CI_{90}

El extracto de *H. verticillata* tuvo actividad contra *L. braziliensis* y *T. cruzi* a las concentraciones de 0.81 y 0.92 mg/ml, respectivamente. El extracto de *P. aeruginosibaccum* presentó actividad contra *T. cruzi* a una concentración de 1 mg/ml. El resto de los extractos ensayados no presentaron actividad contra ninguno de los protozoos a los que se enfrentaron.

D. Determinación de la actividad larvicida:

Esta prueba consistió en enfrentar los extractos etanólicos contra larvas de los mosquitos *A. aegypti* y *A. albimanus* de 24 horas de vida, mediante un ensayo en placa y por triplicado. Se estableció que la actividad positiva sería considerada como tal, si el extracto en estudio provocaba la muerte del 100 por ciento de las larvas presentes en los pozos de prueba, de lo contrario se estableció que la Concentración Letal (CL_{100}) es mayor de 1 mg/ml o sea que el extracto no tiene actividad biocida contra dichas larvas. Los resultados de esta prueba aparecen en la tabla No.5.

Tabla No. 5
Actividad larvicida contra *A. aegypti* y *A. albimanus* de las cuatro plantas en estudio
en mg/ml*

Planta	<i>A. aegypti</i>	<i>A. albimanus</i>
<i>Cissampelos tropaeolifolia</i>	>1	>1
<i>Hyptis verticillata</i>	>1	>1
<i>Passiflora coriacea</i>	>1	>1
<i>Piper aeruginosibaccum</i>	>1	>1

* Concentración Letal CL_{100}

Como se puede observar, ninguno de los extractos resultó tener actividad positiva contra las larvas a las que se enfrentaron o bien que la concentración es mayor de 1 mg/ml.

E. Determinación de la actividad citotóxica contra nauplios de *Artemia salina*

E.1 Fase de tamizaje:

La actividad citotóxica fue determinada según la letalidad de los extractos contra nauplios del crustáceo *A. salina* de 48 horas de vida a los que se enfrentaron. En la fase de tamizaje se consideró que un extracto tenía actividad positiva si era capaz de matar a más del 50 por ciento de los nauplios contra los que se enfrentó. Este procedimiento se realizó por triplicado por lo que el valor obtenido es el promedio de los tres pozos de prueba.

En la tabla No.6 se incluyen los resultados de la prueba de tamizaje de las cuatro plantas en estudio.

Tabla No.6
Tamizaje de la actividad citotóxica de las plantas en estudio
Contra nauplios de *Artemia salina*

Planta	Pozo No.1 Muertos / totales	Pozo No.2 Muertos / totales	Pozo No.3 Muertos / totales	Nauplios muertos (%)
<i>Cissampelos tropaeolifolia</i>	1/10	1/11	0/10	6.4
<i>Hyptis verticillata</i>	0/11	0/12	0/12	0.0
<i>Passiflora coriacea</i>	3/11	4/12	1/11	23.5
<i>Piper aeruginosibaccum</i>	10/12	8/11	10/13	77.8

Como se observa en la tabla anterior, únicamente el extracto etanólico de *P. aeruginosibaccum* presentó actividad positiva en la fase de tamizaje, puesto que se obtuvo un porcentaje de nauplios muertos del 77.8 por ciento; este valor fue mayor del 50 por ciento que era considerado como el valor indicador de la actividad biocida positiva.

E.2 Determinación de la Dosis Letal (DL₅₀):

Ya que el extracto etanólico de *P. aeruginosibaccum* presentó actividad positiva contra los nauplios de *A. salina* en la fase de tamizaje, se procedió a determinar la dosis a la que el mismo era capaz de matar al 50 por ciento de estos crustáceos. Para esto se repitió el procedimiento aplicado en la fase de tamizaje, pero utilizando tres diferentes concentraciones del extracto (1.0, 0.5 y 0.25 mg/ml). Estos resultados se observan en la tabla No.5

Tabla No.7

Determinación de la Dosis Letal (DL₅₀) del extracto de *P. aeruginosibaccum*
contra nauplios de *A. salina*

Concentración mg / ml	Pozo 1 Muertos / totales	Pozo 2 Muertos / totales	Pozo 3 Muertos / totales	Dosis Letal DL ₅₀ mg / ml
1.0	9/12	9/15	12/13	
0.5	2/11	2/13	6/11	0.69*
0.25	0/13	0/13	1/15	

* Finney's Probit Analysis DOS; IC_{95%} = (0.590 - 0.825)

IX. DISCUSIÓN

Rendimiento de las plantas en estudio

La especie *P. aeruginosibaccum* resultó ser la más importante de las cuatro analizadas, en cuanto a las diversas actividades biocidas demostradas, pero también es necesario considerar que fue el de menor porcentaje de rendimiento en la obtención del correspondiente extracto etanólico. Esto implica que para su utilización con los fines medicinales correspondientes, deben considerarse las dosis o concentraciones a las que demostró tener actividad positiva en relación con la cantidad de materia vegetal necesaria para obtener las propiedades establecidas en el presente estudio.

Actividad contra bacterias, levaduras y hongos

Los microorganismos utilizados en las determinaciones de la fase de tamizaje fueron escogidos según el criterio de tener representantes de los principales géneros y especies de microorganismos patógenos o con alguna relación taxonómica con estos.

La actividad positiva para inhibir a las bacterias *B. subtilis* y *M. smegmatis*, mismas que no son consideradas patógenas, plantean la posibilidad de que el extracto de *P. aeruginosibaccum* sea efectivo también contra otras bacterias del mismo género con mayor importancia clínica, pero de cultivo más difícil.

La actividad contra *S. aureus* obviamente constituye la comprobación científica de la efectividad del extracto de *P. aeruginosibaccum*, a una concentración de 0.5 mg/ml, para inhibir el crecimiento *in vitro* de esta bacteria.

Las bacterias contras las que se demostró actividad positiva, coincidentemente son gram positivo, y ninguna de las gram negativo resultaron inhibidas por el extracto. Este hecho también ha sido observado en investigaciones anteriores, en las que se ha considerado que las características de la pared celular de las bacterias gram negativo son las que les confieren resistencia a factores ambientales y a la acción de algunos antibióticos, principalmente los que actúan al nivel de la misma¹⁰

Actividad Antiprotozoaria:

En la determinación de esta propiedad se utilizaron las fases evolutivas de amastigotes de *L. mexicana*, *L. braziliensis* y epimastigotes y *T. cruzi*, debido a que estas son las indicadas por las técnicas respectivas, además de poder ser manipuladas con más seguridad y facilidad.

Según la encuesta etnobotánica que motivó la presente investigación, *H. verticillata* y *P. aeruginosibaccum*, que demostraron tener actividad positiva contra al menos uno de los tres protozoos a los que se enfrentaron, no son utilizadas directamente contra las enfermedades relacionadas con estos microorganismos; aunque si en algunos de los síntomas relacionados tales como calambres, dolor de cabeza, calentura y granos. Los resultados obtenidos indican que los extractos de estas dos plantas tienen actividad positiva *in vitro*, contra los protozoos *L. braziliensis* y *T. cruzi* en las fases de amastigote y epimastigote, respectivamente.

Actividad larvicida:

Aunque ninguna de las especies en estudio resultó tener actividad larvicida contra los mosquitos ensayados, es necesario evaluar esta misma actividad con otras fracciones de los extractos de estas plantas.

Actividad citotóxica contra nauplios de *Artemia salina*:

Los resultados de esta prueba demostraron que el extracto de *P. aeruginosibaccum* tiene actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina*, característica relacionada con la presencia de compuestos con actividad antitumoral en dicha planta.

Los resultados obtenidos también pueden sugerir la posibilidad de que *P. aeruginosibaccum* presente cierta toxicidad para el ser humano y que no se había considerado por las personas que la utilizan.

Aunque los usos medicinales reportados en la encuesta etnobotánica no fueron precisamente los que orientaron la presente investigación, los resultados obtenidos pueden relacionarse de manera que permitan comprobar científicamente la efectividad que tendrá el uso de las plantas en relación con algunos de los síntomas para los que se utilizan, teniendo mayor relevancia los resultados de actividad positiva contra los microorganismos *S. aureus*, *M. smegmatis*, *T. cruzi* y *L. braziliensis*. Esta investigación aportó datos que no se conocían y apoyan la investigación del uso de las plantas con fines medicinales.

Si bien las actividades positivas pueden ser evidentemente útiles para validar en parte el uso tradicional de las plantas, la concentración efectiva es relativamente alta, por lo que su importancia para el desarrollo de medicamentos es limitada.

X. CONCLUSIONES

1. De los cuatro extractos etanólicos de las cuatro plantas analizadas, dos presentaron al menos una actividad biocida positiva, siendo estas *Piper aeruginosibaccum* e *Hyptis verticillata*.
2. El extracto etanólico de *Piper aeruginosibaccum* tiene actividad biocida positiva contra las bacterias Gram +: *Bacillus subtilis* (CIM de 0.50 mg/ml), *Staphylococcus aureus* (CIM de 0.50 mg/ml) y contra la Mycobacteria: *Mycobacterium smegmatis* (CIM de 0.25 mg/ml).
3. El extracto etanólico de *Piper aeruginosibaccum* presentó actividad citotóxica positiva contra nauplios de *Artemia salina* con una Dosis Letal (DL₅₀) de 0.68 mg/ml.
4. Ninguno de los extractos etanólicos de las plantas en estudio tiene actividad antifúngica contra *T. rubrum*, *A. flavus* y *M. gypseum*, ni contra los hongos levaduriformes *C. neoformans* y *C. albicans*.
5. El extracto etanólico de *Piper aeruginosibaccum* presentó actividad antiprotozoaria positiva contra *Trypanosoma cruzi* a una concentración de 1 mg/ml. *Hyptis verticillata* tiene actividad contra *T. cruzi* a una concentración de 0.92 mg/ml y contra *Leishmania braziliensis* a 0.81 mg/ml.
6. Ninguno de los extractos etanólicos de las plantas en estudio tiene actividad larvicida contra las larvas de *Aedes aegypti* y de *A. albimanus*.

XI. RECOMENDACIONES

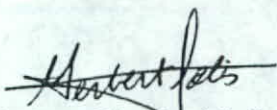
1. Dar seguimiento a los resultados obtenidos, principalmente en el caso de las plantas *Piper aeruginosibaccum* e *Hyptis verticillata*, realizando las investigaciones fitoquímicas apropiadas, que permitan elucidar los principios activos responsables de las actividades biocidas positivas que pudieron demostrarse. Principalmente *P. aeruginosibaccum* por ser la planta reportada como más utilizada y con más actividades biocidas, constituyendo por lo tanto una potencial fuente de compuestos antibacterianos, anticáncer y antiprotozoarios.
2. Enfrentar el extracto etanólico de la planta *P. aeruginosibaccum* a micobacterias de importancia clínica tales como *M. tuberculosis* y *M. bovis*, considerando su actividad biocida contra *M. smegmatis*.
3. Realizar ensayos biocidas similares a los del presente estudio, con extractos de diferentes polaridades de las plantas con actividades biocidas positivas.
4. Determinar cuál de las fracciones de los extractos con actividad positiva, es la más efectiva contra los microorganismos correspondientes.
5. Realizar estudios científicos de Farmacología pre-clínica y de Toxicología, de las plantas con actividades positivas, relacionadas con las propiedades demostradas mediante la presente investigación.
6. Propiciar la divulgación de los resultados del presente estudio, mediante la colaboración de los promotores de salud, profesionales y no profesionales del área de influencia del PNLL.
7. Realizar estudios que permitan determinar la preparación popular más aceptada y efectiva de las plantas que resultaron con actividades positivas en el presente estudio, propiciando que estas sean utilizadas por la población del PNLL de la manera más eficiente y eficaz.

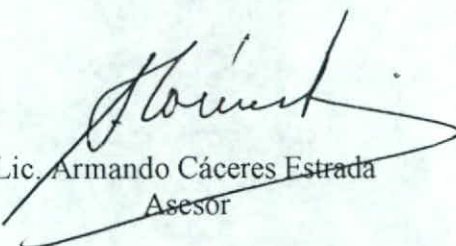
XII. REFERENCIAS

1. Mitscher A *et al.* 1988. Antimicrobial Agents from higher plants. 1 Introduction, rationale and methodology. *Llodia* (35):157-166.
2. CYTED. 1993. Manual de técnicas de investigación. Bogotá, Proyecto X-1, S/P.
3. Bracanto FP & Golding NS. 1983. The diameter of the mould colony as a reliable measure of growth. *J. Mycot.* (45): 848-863.
4. Mac Rae WD *et al.* 1988 Studies of the pharmacological activity of Amazonian *Euphorbiaceae*.(22):143-172.
5. González J *et al.* 1990. In vitro activity of natural products against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Phytoter.* (4):1-4.
6. Cáceres A *et al.* 1998. Plants used in Guatemala for treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American Trypanosomes of 13 native plants. *J Ethnopharmacol* (62):195-202.
7. Mishra SK *et al.* 1987. Insecticidal and nematocidal properties of microbial metabolites. *J Indust. Microbiol.* (2):267-276.
8. Conservation of Lake Lachuá and sustainable development of its influence area. Disponible en www.uicnhumedales.org/index.htm.
9. X.A.D.S. 1978. Plantas de interés terapéutico e industrial.. Monterrey, ed.Limusa., pp.11,13.
10. Varea, A. *et al.* 1997. Biodiversidad, Bioprospección y Bioseguridad. Quito, Editorial Abyayala.. pp. 151-159.
11. Cleaves, C. 2000. Etnobotánica Médica de Cinco Comunidades de la Zona de Influencia del Parque Nacional Laguna Lachuá (PNLL), Alta Verapaz, Guatemala. Tesis Licenciada en Biología. Proyecto Lachuá -Escuela de Biología, Universidad de San Carlos de Guatemala(USAC) / Instituto Nacional de Bosques(INAB) / UICN.
12. Cáceres A *et al.* 1990. screening of 16 plants for treatment of respiratory diseases. *J Ethnopharmacol*, 1(30):55-67.
13. Cáceres A *et al.* 1991. Respiratory diseases. Evaluation of activity of 16 plants against gram positive bacteria. *J Ethnopharmacol* (31):193-208.

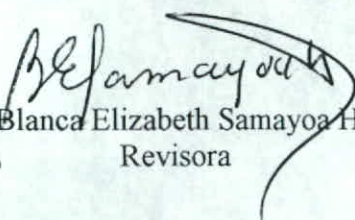
14. Cáceres A, Girón LM .1984. Etnomedicina en Guatemala. Guatemala. CEFOL, pp. 283-316.
15. Cáceres A *et al.*1993. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. Confirmation of activity against enterobacterias of 16 plants. J Ethnopharmacol (38):31-38.
16. Cáceres A *et al.* 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening of antimycotic activity of 44 plant extracts. Journal of Ethnopharmacology (40):207-213.
17. Cáceres A *et al.* 1990. Rev. USAC Guate. Memorias del XI Cong. CA Microbiol. (10):48-60
18. Stanley P., Williams, L. 1966. Flora de Guatemala. Chicago, The Chicago Natural History Museum. pp. 3:284-285; 4:261-262; 7:124-125.
19. Cáceres *et al.*1996. Ciencia & TECN. (1):49-62.
20. Ríos J.L., *et al.* 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity; a review of the literature.J Ethnopharmacology. (28):127-149.
21. Cáceres A *et al.*1995. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. J Ethnopharmacol (48):85-88
22. Cáceres A *et al.* 1987. Screening of 16 plants natives of Guatemala. J Ethnopharmacol. (20):223-237.
23. Rojas, A. *et al.* 1992. Screening for antimicrobial activity for crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plantas. Jorunal of Ethnopharmacology,. Ireland,. Elsevier Scientific Publishers (35):275-283.
24. Nirmal, Sharma *et al.* 1998. Larvicidal Activity of *Gliricidia sepium* Against Mosquito Larvae of *Anopheles stephansi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Pharmaceutical Biology. 36 (1) 3-7.
25. Anderson, J.E. *et al.* 1991. A Blind Comparison of simple Bench-top Bioassays and Human Tumor Cell Cytotoxicities as Antitumor Prescreens. Phytochemical Analysis. 2(1) 107-111.
26. Sam Wah T. y Colegate FM & Molineux RJ 1993. Toxicity testing using the brine shrimp. *Artemia Salina*. Ln. Bioactive Natural products. Detection, isolation and structural determination. Boca Ratón, CRC Press, pp. 441-456.
27. Berger, Ingeborg *et al.* 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. Journal of Ethnopharmacology (62):107-115.
28. Berger Ingeborg *et al.* 2001. Antiprotozoal Activity of *Neurolaena lobata*. Phytotherapy Research. Res. (15): 327-330 .
29. Hacquemiller R *et al.* 1991 Isolement syntese of 1 espinatol, nouveae antiparataiaire. J Nat. Prod. (54):445-452.

30. Fournet A *et al.* 1994. Leishmanicidal and trypanomicidal activities of Bolivian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* (37):159-264.
31. Proyecto Laguna Lachuá. Disponible en www.inab.gob.gt/Proyectos.htm.# Lac.
32. Colegate SM, Molyreux RJ. 1993. Bioactive Natural Products Detection, Isolation and Structural Determination. Boca Ratón, CRC Press. Pp. 44-454.
33. Dulger, Basaran *et al.* 2002. Antimicrobial Activity of some *Lactarius* species. *Pharmaceutical Biology.* 40(4):304-306.
34. Palombo, E.A. *et al.* 2001. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. Ireland, Elsevier, *J. of Ethnopharmacology.* (77)151-157.
35. Erdogru, O.T. 2002. Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Used in Folk Medicine. *Pharmaceutical Biology, Turkey.* 40(4) 269-273.
36. López, A. *et al.* 2001. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *J. of Ethnopharmacology, Ireland.* (77)189-196.
37. Taylor AER, Baker JR. 1987. *In vitro* Methods for parasite cultivation. London, Academic Press, p.465.
38. Michael A, Thompson CG & Abramovitz M. 1956. *Artemia salina* as a test organism for bioassay. *Science* (123):464.
39. Solis PN *et al.* 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). *Planta médica* (59):250-252.
40. Cáceres, A., *et al.* 1996. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. 1a. ed. Guatemala C.A., Editorial Universitaria. p.396.

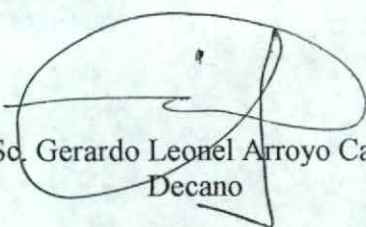

Gerbert Giovanni Solis Rosales
Autor


Lic. Armando Cáceres Estrada
Asesor


Licda. Margarita Paz de Ramirez
Revisora


M Sc. Blanca Elizabeth Samayoa Herrera
Revisora


Licda. Alba Marina Valdés de García
Directora


M Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
Decano