

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

Determinación de actividad inhibitoria *in vitro* de extractos diclorometánicos y metanólicos y aceites esenciales de doce especies condimentarias y medicinales guatemaltecas contra *Listeria monocytogenes*



Rosa Alejandra Alvarez de León  
Astrid Liseth García Higueros  
Nidia Verónica Oliva Retana  
Ana María Rojas Sazo

Químicas Biólogas

Guatemala, noviembre de 2010

## ÍNDICE

	Página
I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN.....	1
II. RESUMEN .....	2
III. INTRODUCCIÓN.....	4
IV. ANTECEDENTES	
A. Historia .....	7
B. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	8
1. Clasificación .....	8
2. Identificación molecular .....	8
3. Descripción general .....	9
4. Factores de virulencia .....	10
5. Patología .....	11
6. Epidemiología .....	15
7. Aislamiento de <i>L. monocytogenes</i> de muestras clínicas ...	17
8. Tratamiento de infecciones y susceptibilidad antimicrobiana	20
9. Prevención .....	20
C. PLANTAS EN ESTUDIO .....	21
1. <i>Eryngium foetidum</i> L. ....	22
2. <i>Cornutia grandifolia</i> (Schlecht & Cham) Schauer .....	23
3. <i>Lippia alba</i> (Miller) N. E. Brown ex Brit & Wils .....	24
4. <i>Lippia chiapasensis</i> Loes. ....	26
5. <i>Lippia graveolens</i> Kunth .....	27
6. <i>Litsea guatemalensis</i> Mez .....	30
7. <i>Ocimum micranthum</i> Willd .....	31
8. <i>Pimenta dioica</i> (L.) Merrill .....	33
9. <i>Pipper auritum</i> Kunth .....	35
10. <i>Pipper jacquemontianum</i> Kunth .....	36
11. <i>Psidium guajava</i> L. ....	37
12. <i>Tagetes lucida</i> Cav. ....	39

V.	JUSTIFICACIÓN .....	41
VI.	OBJETIVOS .....	42
VII.	HIPÓTESIS .....	43
VIII.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	44
	A. Universo .....	44
	B. Muestra .....	44
	C. Recursos .....	44
	D. Materiales .....	45
	E. Metodología .....	47
	F. Diseño estadístico .....	53
IX.	RESULTADOS .....	54
X.	DISCUSIÓN .....	59
XI.	CONCLUSIONES .....	63
XII.	RECOMENDACIONES .....	64
XIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65
XIV.	ANEXOS.....	74

## I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

El presente trabajo se encuentra en la línea de investigación que determinó la actividad inhibitoria de extractos y aceites esenciales de especies condimentarias y medicinales guatemaltecas contra microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos tales como *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter jejuni*. Se pretendió dar a conocer que el uso de extractos vegetales y aceites esenciales de especies condimentarias, las cuales tienen un efecto bioconservador de alimentos y puede constituir una alternativa en el control efectivo de estos enteropatógenos causantes de enfermedades gastrointestinales; reduciendo de esta forma el uso de productos químicos que pueden causar efectos secundarios en los consumidores.

## II. RESUMEN

El presente estudio determinó la capacidad inhibitoria de extractos diclorometánicos, metanólicos y aceites esenciales de plantas tanto medicinales como condimentarias de procedencia guatemalteca, contra tres cepas *Listeria* spp. (*L. monocytogenes* ATCC® 19115, *L. monocytogenes* HRO 634, *L. innocua* ATCC® 700402). La importancia de este estudio radicó en un método alternativo para la conservación de alimentos libres de *Listeria*, ya que muchos de los compuestos que se encuentran en las plantas estudiadas han sido identificados como antibacteriales efectivos, además que sus propiedades condimentarias son comúnmente utilizados en la dieta y remedios caseros.

Los extractos fueron obtenidos por percolación y concentración en rotaevaporador, utilizando diclorometano (disolvente apolar) y metanol (disolvente polar). En ambos casos el mejor porcentaje de rendimiento se obtuvo con las hojas *Lippia chiapasensis* 14.71% y 15.96% y *Piper auritum* 20.46% y 13.43%, respectivamente.

Los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación utilizando el equipo de Neoclevenger, siendo *Lippia graveolens* la planta con mayor porcentaje de rendimiento con un 3.08%.

Para la evaluación de los extractos y aceites esenciales, se siguió la metodología de difusión en disco, utilizando una concentración inicial de 200µg por disco en los extractos y de 10µl en los aceites.

Se detectó actividad inhibitoria positiva ( $p=0.0312$ ) utilizando 200µg del extracto diclorometánico obtenido de la parte aérea de *T. lucida* contra las tres cepas del estudio y del extracto diclorometánico de la hoja de *Eringium foetidum* solamente contra *L. monocytogenes* ATCC® 19115 y *L. innocua* ATCC®

700402. Mientras que los extractos metanólicos utilizando la misma concentración, no presentaron actividad contra ninguna de las cepas en estudio.

Los aceites esenciales que presentaron actividad antibacteriana significativa ( $p=0.0312$ ) fueron *Lippia graveolens*, *Lippia alba* y *Pimienta dioica* contra las tres cepas de estudio a una concentración 10 $\mu$ L. No se encontró correlación entre los extractos diclorometánicos y aceites esenciales a pesar de ser de naturaleza apolar.

### III. INTRODUCCIÓN

Las bacterias son microorganismos ubicuos en el ambiente, pudiéndose encontrar en el agua, aire y en los alimentos; muchos alimentos proporcionan un medio adecuado para su crecimiento debido a la alta cantidad de nutrientes presentes, lo que produce una reducción de la calidad y disponibilidad. Son las características físicas y químicas de los alimentos las que determinan su grado de susceptibilidad a la actividad microbiana; el uso de agentes químicos es uno de los métodos de conservación más antiguos y tradicionales que existen, sin embargo, no cumple con el concepto de natural o seguro que los consumidores demandan, ya que algunos de éstos son sospechosos por poseer cierto grado de toxicidad (1).

La Organización Mundial de la Salud estima que el 30% de la población en países industrializados ha sufrido de enfermedades transmitidas a través de los alimentos, de las cuales una gran proporción de muertes son atribuidas a enfermedades diarreicas debidas al consumo de agua y alimentos contaminados (2,3).

La alteración de los alimentos se evidencia cuando cambian las características organolépticas (apariencia, olor y/o sabor), haciéndolas inaceptables para el consumo. Sin embargo, en numerosas ocasiones los alimentos pueden encontrarse contaminados con organismos patógenos y no presentar evidencia alguna de alteración. Una inadecuada descontaminación y/o conservación permite el crecimiento de organismos patógenos, resultando en enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA), generalmente causadas por microorganismos enteropatógenos, que son de alta morbilidad y mortalidad (4).

Actualmente se han identificado un gran número de microorganismos que pueden causar las ETA, entre los microorganismos más comunes y de alta frecuencia se encuentra *Listeria monocytogenes*, la cual se considera uno de

los agentes más importantes de enfermedades de transmisión alimentaria, debido a que produce listeriosis, una infección alimentaria de carácter gastrointestinal que puede derivar en encefalitis, septicemia y meningitis, afectando mayormente a poblaciones de alto riesgo como ancianos, mujeres gestando, recién nacidos e inmunosuprimidos (5).

Una amplia variedad de productos naturales pueden ser útiles para extender la vida de anaquel de los alimentos, reduciendo o eliminando bacterias patógenas y aumentando la calidad de los productos alimenticios. A través de la historia, las hierbas y especias se han utilizado para saborizar los alimentos y bebidas y también para fines médicos. Los compuestos antimicrobianos de las plantas se encuentran generalmente en el aceite esencial obtenido a partir de hojas, flores, bulbos, rizomas y frutos, otros compuestos obtenidos de plantas los constituyen los compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides. La mayoría de estos compuestos, son identificados como metabolitos secundarios y enzimas hidrolíticas (gluconasas, citinasas) y proteínas que actúan principalmente sobre las membranas de los microorganismos, estos compuestos pueden ser letales para las células o simplemente servir como inhibidores de la producción de metabolitos (6,7).

La presente investigación se realizó con el objetivo evaluar la actividad inhibitoria *in vitro* de extractos y aceites esenciales de especies condimentarias y medicinales de doce especies de plantas sobre el crecimiento de una cepa ATCC (por sus siglas en inglés American Type Culture Collection) de *Listeria monocytogenes*, utilizando la técnica de difusión en disco. Las plantas condimentarias y medicinales de origen guatemalteco a utilizar son: *Eryngium foetidum* L. (cilantro), *Cornutia grandifolia* (Schlecht & Cham) Schauer in DC (jorobté), *Lippia alba* Miller N. E. Browne ex Brit. & Wils. (juanilamia), *Lippia chiapasensis* Loes (salvia santa), *Lippia graveolens* Kunth. (óregano), *Litsea guatemalensis* Mez. (laurel), *Ocimum micranthum* Willd. (albahaca), *Pimenta dioica* (L.) Merrill (pimienta gorda), *Piper auritum* Kunth. (Santa María), *Piper*



*jacquemontianum* Kunth. (cordoncillo), *Psidium guajava* L. (guayaba) y  
*Tagetes lucida* Cav. (pericón).

## IV. ANTECEDENTES

### A. Historia

En 1926 Murray aisló una bacteria corta Gram positivo, de forma bacilar, a la que denominó *Bacterium monocytogenes*, porque infectaba a los monocitos de la sangre. En 1930 Pirie aisló un organismo parecido en hígado de gerbos (roedores) por lo que lo denominó *Listerella hepatolytica*; en 1940 se cambió este nombre por *Listeria monocytogenes* debido a que *Listerella* había sido adoptada anteriormente para un grupo de mohos productores de mucílago (8,9).

*Listeria monocytogenes* es una bacteria patógena oportunista que produce la enfermedad conocida como listeriosis, la cual no es de elevada incidencia, pero grave y a menudo fatal. Afecta con mayor frecuencia y de forma más severa a personas pertenecientes a grupos de riesgo (ancianos, embarazadas, inmunodeprimidos, fetos, neonatos). Las principales complicaciones son septicemia, meningitis y aborto (10,11).

Aunque *L. monocytogenes* se consideró durante muchos años un patógeno de animales, su papel significativo como patógeno humano se hace evidente a partir de 1980, cuando comienzan a aparecer en la literatura informes documentados de brotes de listeriosis, detectados por consumo de alimentos contaminados. Hoy en día, *L. monocytogenes* se considera uno de los agentes más importantes de las ETA (10).

Las explicaciones posibles de la emergencia de la listeriosis humana transmitida por alimentos como un asunto de máximo interés de salud pública comprenden los cambios importantes en la producción, procesamiento y distribución de los alimentos, la utilización cada vez mayor de la refrigeración como medio de conservación primaria de los alimentos, los cambios en los hábitos de comida de la población (particularmente respecto a la comodidad de los alimentos ya

preparados) y un incremento del número de personas consideradas de alto riesgo de sufrir la enfermedad (12,13).

## **B. *Listeria monocytogenes***

### **1. Clasificación**

El género *Listeria* pertenece a la sub-rama de *Clostridium* sp. junto con *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Lactobacillus* sp. y *Brochothrix* sp. Se compone de seis especies divididas en dos líneas de descendencia; la presencia de cualquiera de estas especies es considerada como un indicador de higiene deficiente (8,10,14,15):

- i) *L. monocytogenes*
- ii) *L. ivanovii* (pueden invadir células de mamíferos en cultivo de tejido y pueden difundirse de célula a célula, carece de citotoxinas por lo que puede explicar su menor virulencia)
- iii) *L. innocua*
- iv) *L. welshimeri*
- v) *L. seeligeri*
- vi) *L. grayi*

Los determinantes antigénicos más caracterizados de *L. monocytogenes* son el antígeno O (somático) y antígeno H (flagelar) que permiten la clasificación en diferentes serotipos. Hasta la fecha se han descrito 13 serotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, y 7). La mayoría de enfermedades es debida a los tipos 4b, 1/2a y 1/2b mientras que en alimentos predominan otros serotipos diferentes (16,17).

### **2. Identificación molecular**

El género es definido por un contenido de 36-38% de ADN G+C, una pared celular típica de bacterias Gram positivo con una capa de peptidoglicano y mureína, conteniendo ácido meso-diaminopimélico (*meso*-DAP) adherido a la membrana celular por ácidos lipoteicoicos y ácidos poliribitol teicoicos asociados

a la membrana. Estudios genéticos indican que los organismos de *Listeria* exhiben la relación filogenética más cercana al género *Brochothrix* (organismo del ambiente) (16).

### 3. Descripción general

Las bacterias del género *Listeria* son bacilos pleomórficos, Gram positivo, de 0.5-2µm por 0.5µm, pueden presentarse como cocobacilos en cadenas cortas o en parejas parecidas a *Streptococcus* sp. Son móviles, microaerófilicos y no forman esporas. Tienen cuatro flagelos, los que se pierden cuando ingresan al ser humano (16).

Macroscópicamente se observan colonias pequeñas (0.5-1.5cm), translúcidas. En agar sangre producen colonias similares a *Streptococcus* sp. Las cepas patógenas producen un halo estrecho de β-hemólisis; frecuentemente es necesario remover las colonias para visualizar la hemólisis. Cuando crecen en agar nutritivo y examinarlas bajo luz oblicua (un ángulo de 45°), se observan las colonias de un color azul verdoso. Su crecimiento es estimulado con presión de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> del 5 al 10%. De las seis especies, sólo tres de ellas producen β-hemólisis en agar sangre: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* y *L. ivanovii*; esta última especie produce una zona amplia de hemólisis, *L. monocytogenes* produce zonas estrechas que generalmente no exceden el borde de la colonia (10).

Nutricionalmente no son bacterias exigentes. Su crecimiento óptimo es de 30 a 37°C pero puede crecer en un rango de 4 a 40°C. Esta característica fisiológica es útil para su aislamiento selectivo, ya que otras bacterias de interés médico no son capaces de desarrollarse a tan bajas temperaturas (técnica de enriquecimiento en frío). Por otra parte, le confiere a la bacteria una ventaja ya que es capaz de desarrollarse en alimentos refrigerados y así dar origen a infecciones a partir del consumo de los mismos (16-19).

#### 4. Factores de virulencia

*Listeria monocytogenes* es un patógeno intracelular facultativo que puede sobrevivir dentro de las células de mamíferos incluyendo macrófagos y muchas líneas celulares de cultivo de tejido humano. Entra en el cuerpo a través del tracto gastrointestinal con la ingestión de alimentos contaminados; el patógeno es fagocitado, crece en el interior de los fagocitos, los lisa y se extiende por las células de los alrededores. La inmunidad frente a *L. monocytogenes* es principalmente mediada por células T ayudadoras, es por estas que generalmente las personas en grupos de riesgo son más susceptibles de contraer la infección (7,17,20).

La bacteria produce una proteína de superficie de 80-kDa llamada internalina, la cual facilita que una variedad de células (macrófagos, células endoteliales) la fagociten. La internalina interacciona con el receptor de adhesión celular llamado E-cadherina (glicoproteínas transmembranales de 110 kDa que están relacionadas estructuralmente y son específicas del tejido) en células epiteliales humanas, provocando la inducción de fagocitosis. Una vez internalizada, *L. monocytogenes* puede escapar de la vesícula fagocítica y multiplicarse en el citoplasma (12,20).

Ya separados dentro de los fagosomas, los organismos producen listeriolisina O y varias fosfolipasas que facilitan la disolución de las membranas celulares, permitiendo que *L. monocytogenes* se extienda a células no infectadas. La listeriolisina O actúa uniéndose al colesterol de la membrana y luego se inserta a sí misma en la membrana blanco, provocando la formación de poros transmembranales. La listeriolisina O es codificada por el gen *hly* y es similar a la estreptolisina O del grupo A de estreptococos. Los mutantes que no tienen el gen *hly* son avirulentos y no pueden escapar de la vacuola internalizada. Estos mecanismos permiten al organismo moverse directamente de célula a célula sin exposición a factores inmunes solubles como anticuerpos y complemento. Los mutantes que no tienen fosfolipasas (PlcB) y fosfolipasas fosfatidilinositol

específicas (PlcA) de amplio rango demuestran alrededor de la mitad de la eficiencia en escapar de los fagosomas de los macrófagos (16,20).

## 5. Patología

Dentro de las diferentes especies, *L. monocytogenes* es el principal microorganismo de este género implicado en la producción de ETA produciendo listeriosis. En infecciones severas produce septicemia, meningitis, encefalitis, infección del sistema nervioso central y muerte; estas complicaciones pueden ser precedidas por síntomas como náuseas, vómito, diarrea, fiebre o dolor de cabeza (20,21).

a. Patogénesis: En humanos *L. monocytogenes* se comporta como un agente oportunista, produciendo infección en neonatos, ancianos, adultos inmunocomprometidos y embarazadas (16).

El tracto gastrointestinal es la entrada principal para esta bacteria. En el intestino, atraviesa la mucosa (con la ayuda de la endocitosis activa de los microorganismos por las células endoteliales). Una vez en el torrente sanguíneo, se puede producir la diseminación hematógena hacia cualquier sitio, posee una predilección especial hacia la placenta y el sistema nervioso central (20,23).

En humanos, la respuesta celular usual en casos de infección bacteriana diseminada es una leucocitosis de polimorfonucleares con formación de microabscesos. Sin embargo, debido a un componente de superficie de *L. monocytogenes* que tiene la habilidad de movilizar monocitos al torrente sanguíneo y sitios infectados, ocurre una marcada monocitosis (20).

b. Síndromes clínicos: La listeriosis no presenta una sucesión única de síntomas ya que el curso de la enfermedad depende del estado inmunológico del hospedador. El resultado más común de la adquisición del organismo es un

estado de portador gastrointestinal transitorio asintomático, que usualmente resulta de la ingestión de comida contaminada. Durante este tiempo el organismo puede ser excretado en las heces (16).

Se ha descrito un síndrome de gastroenteritis febril en brotes causados por comer alimentos contaminados con *L. monocytogenes*. Este síndrome incluye diarrea sin sangre, náusea y vómitos, acompañado por fiebre, fatiga, escalofríos y mialgias. Usualmente autolimitada, pero puede ocurrir enfermedad invasiva en pacientes inmunocomprometidos y en aquellos con otras infecciones gastrointestinales bacterianas o virales subyacentes (16,23).

A menudo ocurre infección sintomática aguda con este organismo durante el embarazo, generalmente durante la última mitad del embarazo (segundo o tercer trimestre), la enfermedad en la madre se presenta con síntomas parecidos a la influenza (fiebre, garganta irritada, mialgia, malestar, dolor abdominal, y dolor de espalda). Ocasionalmente hay flujo vaginal, diarrea y síntomas del tracto urinario. Puede presentarse leucocitosis periférica, y los hemocultivos tomados durante la fase aguda de esta enfermedad transitoria pueden ser positivos (16).

Durante la infección en el embarazo puede ocurrir bacteriemia oculta y transmisión transplacental del organismo, llevando a una infección intrauterina del feto. La Infección en el útero puede inducir trabajo de parto, provocando parto prematuro de un feto infectado o muerto. Los síntomas en la madre generalmente remiten seguido del parto del infante infectado y la placenta. La supervivencia del feto es parcialmente determinada por la duración de la gestación; el aborto espontáneo que ocurre cuando la infección es adquirida en etapa temprana del embarazo y la infección neonatal que resulta cuando la infección es adquirida más tarde (16).

Los neonatos pueden ser categorizados con enfermedad de aparición temprana o de aparición tardía:

- Enfermedad de aparición temprana: Los recién nacidos que son infectados dentro del útero generalmente presentan sepsis aguda, tienen enfermedad diseminada, con lesiones pustulares en la piel y granulomas en cerebro, hígado, riñones, pulmones y bazo que contienen *L. monocytogenes*. El tejido placentario generalmente muestra evidencia de corioamnionitis aguda. El índice de mortalidad de la listeriosis de aparición temprana es alto, pero las infecciones neonatales fatales son más comunes entre niños inmunocomprometidos (16).
- Enfermedad de aparición tardía: El infante es expuesto al organismo durante el parto vaginal a través del canal de parto; tragar al organismo en este entorno es el modo probable de adquisición del organismo y la infección. Los infantes que presentan este cuadro clínico tienen generalmente de 3 a 5 días de edad, y la enfermedad aparece 7 a 14 días después del nacimiento (16).

La listeriosis de aparición tardía generalmente se presenta como meningitis neonatal, con signos y síntomas de fiebre, irritabilidad, y fontanelas protuberantes presentes. En estos infantes, una tinción de Gram del líquido cefalorraquídeo (LCR), mostrará leucocitos polimorfonucleares y generalmente, en más del 50% de los casos serán vistos los bacilos Gram positivo de *L. monocytogenes*; las pruebas bioquímicas del LCR revelarán índices de proteínas altos e índices de glucosa bajos. En casos de enfermedad de aparición tardía, la madre, generalmente, ha tenido un embarazo sin complicaciones, sin signos presentes de infección o sepsis (16).

En las personas adultas no embarazadas, *L. monocytogenes* tiene un tropismo específico hacia el sistema nervioso central, estos pacientes se presentan con sepsis aguda, meningitis subaguda, meningocefalitis, o rombencefalitis. Adultos con sepsis listerial aguda, generalmente tienen enfermedades subyacentes o están inmunocomprometidos. Se observa generalmente



hemocultivos positivos y un cuadro clínico similar a la sepsis asociada con bacteriemia por Gram negativos (16).

En algunos pacientes, el organismo cruza la barrera hematoencefálica, provocando una infección de las meninges y del cerebro. La meningitis subaguda se desarrolla por varios días y es caracterizada por fiebre, dolor de cabeza y rigidez del cuello. En la presentación subaguda, los conteos de células del LCR son generalmente más bajos y los organismos a menudo son observados en las tinciones de Gram del LCR (8,16).

La meningoencefalitis causada por *L. monocytogenes* está asociada con varias características únicas. La rigidez de cuello es menos común, siendo encontrada en 80-85% de adultos. Los desórdenes motores como ataxia, temblores, parálisis de los nervios craneales, y actividad epiléptica, son más comunes con infección listerial que con otros agentes etiológicos de meningoencefalitis. Otra manifestación clínica en estos pacientes es un estado mental fluctuante. En algunos casos, la infección del sistema nervioso central puede progresar a incluir participación del tallo cerebral y los estudios de imágenes usualmente muestran microabscesos en el diencéfalo y cerebelo. Los abscesos cerebrales, únicos y múltiples, pueden ocurrir como complicaciones de meningoencefalitis listerial. El diagnóstico de meningoencefalitis y rombencefalitis es establecido por cultivo de muestra de LCR y sangre. El desarrollo de la enfermedad puede ocurrir entre 3 a 70 días después de la exposición (8,16)

Las infecciones focales causadas por *L. monocytogenes* incluyen infecciones cutáneas, abscesos, artritis, peritonitis (incluyendo peritonitis bacterial espontánea), abscesos de hígado y bazo, colecistitis, endoftalmitis, infecciones de las prótesis de articulaciones/injertos vasculares, osteomielitis, miocarditis y endocarditis. La mayoría de estas complicaciones están asociadas con diseminación hematógena y generalmente ocurre en huéspedes inmunocomprometidos (16).

La endocarditis por *L. monocytogenes* resulta de bacteremia y usualmente involucra válvulas aórticas/mitrales nativas o prótesis de válvulas dañadas. Es común que ocurra embolia séptica y formación de abscesos en lugares distantes. En pacientes trasplantados, diabéticos e individuos con cirrosis u otras enfermedades hepáticas pueden presentarse abscesos hepáticos y esplénicos, hepatitis, granulomas hepáticos, y peritonitis espontánea (16).

Las infecciones del líquido pleural con *L. monocytogenes* han sido más documentadas en pacientes donde la infección pleural ocurrió por inserción hematogénea de efusiones pleurales malignas, que secundario a procesos parapneumónicos. *L. monocytogenes* es también capaz de causar infecciones en pacientes con diálisis peritoneal ambulatoria continua y en aquellos con válvulas ventriculoperitoneales. Individuos con infección con VIH tienen mayor riesgo de desarrollar infecciones como meningitis o bacteriemia (16).

## **6. Epidemiología**

La listeriosis invasiva es una enfermedad relativamente poco común pero habitualmente grave; con una frecuencia típica de 3 a 8 casos por cada millón de personas y tasas de mortalidad del 20 por ciento al 30 por ciento de los pacientes hospitalizados (22).

La listeriosis evoluciona bajo la forma de casos esporádicos que a veces se incrementan en pequeños brotes y aún hasta en verdaderas epidemias. La mayoría de los casos de listeriosis humana son esporádicos y en este tipo de casos, la fuente y la vía de infección generalmente no se conocen, aunque se considera que los alimentos contaminados son la principal vía de transmisión. La listeriosis invasiva es una enfermedad relativamente rara pero a menudo grave, por lo general con tasa de incidencia de 4 a 8 casos por 1,000,000 personas (16).

Todas las especies de *Listeria* pueden ser aisladas del ambiente (suelo, agua, vegetación) y en animales, pero sólo *L. monocytogenes* es patógeno en animales y humanos. El reservorio es fundamentalmente animal y se conocen hasta el momento unas 40 especies entre mamíferos (rumiantes, equinos, felinos, roedores, etc.) pájaros y peces. Los ovinos son los animales más frecuentemente afectados. Estos animales padecen la enfermedad con formas clínicas variadas, pero la bacteria se ha aislado de animales portadores de las secreciones nasales o heces. Además se ha aislado a partir de ratones capturados en granjas, donde existían animales con listeriosis (20).

También es un contaminante común en productos alimenticios. Puede crecer en biofilms en la superficie de varios alimentos y la refrigeración aumenta el crecimiento posterior del organismo, debido a su habilidad para crecer a 4°C (criotolerancia). Por su ubicuidad en alimentos, los humanos tienen contacto con estos organismos a diario, y, como resultado, algunos individuos se convierten en portadores fecales del organismo (16).

*L. monocytogenes* está presente como un contaminante en muchos tipos de productos alimenticios incluyendo leche sin tratar, vegetales crudos, pescados, aves de corral, y tanto carne fresca como procesada. En comida contaminada, el conteo de colonias del organismo puede exceder  $10^9$  unidades formadoras de colonia (UFC)/g de comida, que es la cantidad que se requiere para producir infección clínica, según estudios (23).

La leche puede contaminarse con *L. monocytogenes* al pasar por la ubre de la vaca. El organismo puede recuperarse de leche sin pasteurizar y quesos preparados de leche sin pasteurizar. Un brote fue ubicado en repollo y ensalada de col contaminados. El repollo implicado en estos brotes fue cultivado en suelo contaminado con deposiciones fecales de ovejas infectadas. En 1985, un gran brote en el condado de Los Ángeles, California involucró a más de 181 personas, incluyendo 93 casos perinatales y provocó un índice de fatalidad de

33%. El alimento implicado fue un queso suave estilo mexicano que había sido preparado de leche no pasteurizada (16,24-26).

También ha sido implicado helado contaminado, carnes crudas y productos procesados provenientes de carnes y pescado. En 1994, un brote originado de alimentos ocurrió en 10 de 36 personas (incluyendo 2 mujeres embarazadas) que asistieron a una fiesta en la ciudad de Nueva York. En este brote, el camarón fue implicado como el alimento contaminado. Otro brote entre 45 personas que habían asistido a un picnic en Illinois se ubicó en leche con chocolate contaminada (16).

Puede convertirse en constituyente transitorio de la flora intestinal humana y puede ser excretado en las heces. La listeriosis humana ocurre principalmente durante la primavera y el verano. Los casos esporádicos (fuera de los brotes provenientes de alimentos) ocurren en tasas anuales de menos de 1 caso por 100,000 personas, siendo la infección más común en infantes (10 casos por 100,000 personas) y ancianos (1.4 casos por 100,000 personas). La infección sintomática es relativamente rara, sin embargo debe sospecharse en infecciones de huéspedes inmunocomprometidos (15).

La listeriosis es una enfermedad de baja morbilidad, pero alta letalidad (20-30% de los casos), y es la tercera causa más frecuente de meningitis bacteriana en recién nacidos, tras la originada por estreptococos del grupo B y *Escherichia coli*. (4).

## **7. Aislamiento de *L. monocytogenes* de muestras clínicas**

a. Muestra: *L. monocytogenes* puede ser aislada de sangre, líquido cefalorraquídeo, secreciones urogenitales, líquido amniótico, y muestras de biopsia derivadas de tejido materno/fetal (16).

b. Cultivo: *L. monocytogenes* crece bien en agar sangre de carnero (ASC), produciendo colonias blancas grisáceas que se parecen bastante a las del grupo B  $\beta$ -hemolítico de estreptococos. Después de 18-24 h de incubación a 37°C, las colonias pueden mostrar una zona delgada de  $\beta$  hemólisis que no se extienden muy lejos más allá del borde de la colonia. Antes de este tiempo, la  $\beta$  hemólisis puede notarse solamente directamente debajo de la colonia después de remover el crecimiento de la colonia de la superficie del agar con un hisopo. En incubación más prolongada, o en áreas de la caja que han sido inoculadas por pinchadas, la  $\beta$  hemólisis del organismo se vuelve más obvia (16).

Entre las otras especies, las subespecies de *L. ivanovii* producen zonas anchas o hasta zonas múltiples de  $\beta$  hemólisis en medios que contienen sangre de carnero o de caballo, mientras que *L. seeligeri* produce zonas hemolíticas que son más delgadas que las de *L. monocytogenes* (16).

Las colonias de *L. monocytogenes* tienen un crecimiento característico en diferentes medios de cultivo, en agar Oxford se observan colonias redondas, con una pequeña depresión en el centro, con un diámetro aproximado de 2mm, de color gris azulado, rodeadas por un halo negro debido a la hidrólisis de la esculina. La mezcla de los diversos antibióticos (cicloheximida, colistina sulfato, acriflavina, cefotetán y fosfomicina) inhibe en gran medida la flora acompañante en el cultivo selectivo de *Listeria*; en agar Palcam las colonias se observan redondas, con una pequeña depresión en el centro, con aproximadamente 1 ó 2mm de diámetro, de coloración verde grisáceo a negro, rodeadas de un halo negro debido a la hidrólisis de la esculina. La mezcla de los 3 antibióticos: Polimixina B sulfato, Ceftazimida y Acriflavina, inhibe en gran medida la flora acompañante en el cultivo selectivo de *Listeria* (10).

c. Identificación: Con la tinción de Gram de muestras clínicas y hemocultivos, el organismo puede aparecer como un bacilo Gram positivo regular o como un cocobacilo gordo corto. Si están presentes células polimorfonucleares o

mononucleares, los organismos son encontrados tanto intracelular como extracelularmente. Debido a las variaciones en la morfología en la tinción de Gram que se observan con este microorganismo, los morfotipos de *L. monocytogenes* pueden ser confundidos por difteroides o estreptococos, particularmente *S. pneumoniae*, enterococos y algunos estreptococos viridans (16).

Dentro de las pruebas bioquímicas el organismo es catalasa positivo, fermentan azúcares como glucosa, manosa y ramnosa, pero no manitol (a diferencia de otras especies no patógenas) son ácido tolerantes a sales; también hidrolizan la esculina. La movilidad se puede determinar en preparaciones en fresco, después de una incubación de 2 horas a temperatura ambiente. Cuando se siembran en medios semisólidos en tubo y se incuban a 25°C, muestran una movilidad característica en aspecto de “sombriilla”, la cual no se observa cuando se incuba a 37°C. El organismo es fermentativo, produciendo ácido de la glucosa, y produce acetoina, resultando positiva la reacción de Voges-Proskauer (7,17-19).

La prueba de CAMP también ha sido usada para identificar a *L. monocytogenes*. Con las especies de *Listeria*, la prueba de CAMP es realizado con una cepa de *Staphylococcus aureus* productora de  $\beta$ -lisina y con una cepa de *Rhodococcus equi*. La hemólisis sinérgica es observada entre *S. aureus* y la cepa putativa de *L. monocytogenes* y *L. seeligeri*, mientras que una hemólisis aumentada es vista entre *R. equi* y cepas putativas de *L. ivanovii*. Con *L. monocytogenes*, un test de CAMP positivo con *S. aureus* es indicado por hemólisis aumentada en la región entre las dos estrías de crecimiento no intersectadas en ángulo recto una de la otra, mientras que aquella vista entre *R. equi* y *L. ivanovii* aparece como un área de hemólisis aumentada con forma de pala. Esta prueba puede ser difícil de interpretar, pues algunos investigadores han reportado reacción sinérgica hemolítica entre *L. monocytogenes* y *R. equi*. No hidroliza estos compuestos (D,L-alanina- $\beta$ -naftilamida o D,L-alanina-p-

nitroanilida) por la ausencia de arilamidasa específicas, mientras todas las demás especies, incluyendo *L. innocua*, son alanil o glicil arilamidasa positivo (16).

También se han desarrollado enfoques moleculares para la identificación de especies de *Listeria*. Un ensayo de alta sensibilidad y ADN quimioluminiscente específico -el AccuProbe *Listeria*- y un ensayo de ADN espectrofotométrico -el GeneTrak *Listeria*- están disponibles para identificación rápida de *L. monocytogenes* de colonias crecidas de un medio de aislamiento primario (16).

### **8. Tratamiento de infecciones y susceptibilidad antimicrobiana**

*L. monocytogenes* es generalmente susceptible a penicilina, ampicilina, los aminoglicósidos, eritromicina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, e imipenem. Las cefalosporinas (primera, segunda y tercera generación) y las fluoroquinolonas no son activas contra *L. monocytogenes*. La ampicilina con o sin un aminoglicósido es considerada la terapia de elección para infecciones sistémicas. En pacientes alérgicos a la penicilina, se cree que el trimetoprim-sulfametoxazol con o sin rifampin es el mejor agente alternativo para tratar infecciones por *L. monocytogenes*, amoxicilina con trimetoprim-sulfametoxazol se encontró efectivo en un estudio retrospectivo. La vancomicina es apropiado para bacteriemia primaria sin embargo no cruza la barrera hematoencefálica eficientemente como para ser útil en tratamiento para meningitis. No se ha reportado resistencia de alto nivel a vancomicina que ocurra naturalmente. Para prueba de susceptibilidad antibiótica de *Listeria*, contra penicilina y ampicilina el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) recomienda utilizar método de microdilución en caldo Mueller Hinton suplementado con 2-5% de sangre de caballo (16,27).

### **9. Prevención**

Las medidas de prevención incluyen la limitación de la contaminación de los sitios de procesamiento. Dado que *L. monocytogenes* es sensible al calor y a la

radiación, los alimentos crudos y los utensilios que se emplean deben ser apropiadamente descontaminados. Sin embargo, el riesgo de contaminación no puede ser eliminado debido a la amplia distribución del patógeno. Individuos inmunocomprometidos deben evitar consumir productos lácteos no pasteurizados y poner especial atención en las fechas de caducidad cuando se ingieren productos procesados listos para el consumo (7).

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades ha promulgado guías para la prevención de listeriosis originada en alimentos. Las guías que se aplican a todos los individuos incluyen:

- Cocinar completamente la comida cruda proveniente de fuentes animales.
- Lavar rigurosamente los vegetales crudos antes de comerlos.
- Mantener la carne sin cocinar separada de los vegetales, comida cocinada y comida “lista para comer”.
- Evitar el consumo de leche sin procesar
- Lavar rigurosamente manos, cuchillos, tablas de picar, etc.

Para personas con alto riesgo a la infección:

- Evitar quesos suaves.
- Las sobras o la comida rápida debe ser calentada hasta hervir antes de comer.
- Evitar carnes frías o calentar antes de comer (16).

### **C. PLANTAS DEL ESTUDIO**

Actualmente existe una creciente preocupación entre los consumidores por el uso de aditivos sintéticos en los alimentos que pueden causar efectos negativos en la salud humana. Esto ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas naturales que tengan un sabor y olor agradable combinado con la capacidad de evitar deterioro de los alimentos (daño por microorganismos, oxidación, deterioro de lípidos) para evitar ETAs y proporcionarles elevada seguridad, calidad y vida útil (28-33).



Las especias se han usado tradicionalmente para preservar alimentos, así como para resaltar o mejorar el sabor y olor de los mismos. Muchos compuestos naturales (moléculas aromáticas sustituidas como carvacrol, timol, eugenol, cinamaldehído, etc.) que se encuentran en variedad de especias utilizadas comúnmente en la dieta y en remedios caseros; se han identificado en estudios de todo el mundo, como efectivos antibacteriales (28-33).

Estudios realizados demuestran la utilidad de extractos y aceites esenciales de plantas contra el crecimiento de *L. monocytogenes*. Un estudio realizado por Lin Y.T. *et al* en Estados Unidos, demostró la actividad inhibitoria de los extractos combinados del orégano y arándano contra *L. monocytogenes* (29).

### **1. *Eryngium foetidum* L.**

a. Familia: Apiaceae.

b. Sinonimia: No se encontró información en bibliografías consultadas.

c. Nombres comunes: Culantro, cilantro, zamat (34).

d. Distribución geográfica: Se encuentra en bosques húmedos subtropicales y en Guatemala en los departamentos de Baja Verapaz, Alta Verapaz, Petén e Izabal (34).

e. Descripción botánica: Hierba perenne, fuertemente aromática, de hasta 60cm de alto, tallo solitario o varios, simples o ramificados, con o sin hojas, sus hojas, generalmente todas basales (a veces algunas sobre el tallo), oblanceoladas, de hasta 30cm de largo y hasta 5cm de ancho (generalmente más chicas), angostándose hacia la base, con los márgenes dentados (los dienteillos con una corta espina amarillenta en el ápice). Su inflorescencia es terminal, generalmente muy ramificada, compuesta por numerosas cabezuelas cilíndricas, de aproximadamente 1cm de largo y hasta 5mm de ancho, de color verde amarillento, que en su base presentan 5 o 6 brácteas (el involucre) lanceoladas, de hasta 4cm de largo, puntiagudas, con los márgenes enteros o espinuloso-aserrados. Sus flores son pequeñas, blancas a azules o moradas; el

cáliz es un tubo (cubierto por grandes escamas) que hacia el ápice se divide en 5 lóbulos lanceolados a triangulares, de hasta 1mm de largo; la corola de 5 pétalos libres, caedizos, elíptico-oblongos, de menos de 1mm de largo, con el ápice largo y curvado hacia el centro de la flor; estambres 5; ovario ínfero. El fruto es globoso, lateralmente comprimido, de hasta 2mm de diámetro, cubierto por abundantes vesículas globosas amarillentas; en la madurez el fruto se separa en 2 frutillos (mericarpes), cada uno conteniendo una semilla. La raíz es carnosa (34).

f. Agrotecnología: No se encontró información en bibliografías consultadas.

g. Usos medicinales: Se utiliza contra infecciones respiratorias y fiebres. Se usa para eliminar toxinas y abscesos biliosos. Las hojas y las raíces son usadas en té para estimular el apetito, mejorar la digestión, combatir el cólico, calmar el dolor estomacal (34).

h. Otros usos: Su uso es común en el trópico, generalmente a nivel casero, en sustitución del culantro europeo (*Coriandrum sativum* L.), el cual no prospera bien en el trópico. Su uso puede ser fresco para ensaladas o cocido; en la cocina guatemalteca es utilizado también como condimento (35).

i. Farmacología: Antihipertensivo, febrífugo, aperitivo, afrodisíaco, abortivo (fuerte), emenagogo, laxante, antiescorbútico, bactericida, antiséptico, antirreumático, anticonvulsivante, antiemético, antidiarreico y carminativo (34).

j. Composición química: Las hojas contienen vitamina A, B1, B2 y C, riboflavina, carotenos, calcio y hierro. El aceite esencial de la hoja es rico en aldehídos alifáticos, la mayor parte son a,b-insaturados. El compuesto principal es E-2-dodecenal (60%), además 2,3,6-trimetilbenzaldehído (10%), dodecanal (7%) y E-2-tridecenal (5%) han sido identificados (34).

k. Farmacognosia: No se encontró información en bibliografías consultadas.

## **2. *Cornutia grandifolia* (Schlecht & Cham) Schauer**

a. Familia: *Verbenaceae*.

b. Sinonimia: No se encontró información en bibliografías consultadas.

- c. Nombres comunes: Joro'kté, jorobté, lirio tropical, lirio africano, lirio jamaicano (36,37).
- d. Distribución geográfica: Nativa de Centroamérica (36).
- e. Descripción botánica: Arbusto o árbol pequeño de hasta 3m de alto, con ramas densamente cubiertas por pelos esparcidos. Las hojas con peciolo gruesos, tienen forma ovada, ovado-elíptica u oblongo ovada. El ápice es acuminado y la base atenuada o decurrente. Por lo general son pubescentes o vellosas en ambas superficies. Miden de 7-30cm de largo y de 5-19cm de ancho. Las inflorescencias son panículas terminales, de 15-40cm de largo, con numerosas flores de color lila pálido ó púrpura. Miden aproximadamente de 1-1.5cm de largo, los frutos globosos, pubescentes, son muy pequeños de aproximadamente 5mm de diámetro. (36,38).
- f. Agrotecnología: No se encontró información en bibliografía consultada.
- g. Usos medicinales: Es utilizada como antirrábico, cura contra la erisipela y el asma (37).
- h. Otros usos: No se encontró información en bibliografías consultadas.
- i. Farmacología: No se encontró información en bibliografías consultadas.
- j. Composición química: No se encontró información en bibliografías consultadas.
- k. Farmacognosia: No se encontró información en bibliografías consultadas.

### **3. *Lippia alba* (Miller) N.E. Brown ex Brit. & Wils.**

- a. Familia: Verbenaceae.
- b. Sinonimia: *Lippia geminata* HBK, *L. geminata* var. *microphylla* Griseb, *L. lantonoides* Coult, *Lantana Alba* Mill, *Lippia germinata* HBK.
- c. Nombres comunes: Salvia sija, juanilamia, mastranto, salvia santa, pronto alivio, orégano albo, orégano silvestre, menta americana, anis de España, poleo (39).
- d. Distribución geográfica: Nativa de América crece en México, Sur América y el Caribe en laderas a la orilla de caminos y riveras de los ríos en alturas hasta de 1,800msnm. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Chimaltenango,

Chiquimula, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Sacatepéquez, Sololá y Suchitepéquez (39).

e. Descripción botánica: Arbusto aromático de 1-2m de alto, ramas largas, cayentes densamente puberulentas o estregosas. Hojas opuestas, oblongas de 2-8cm de largo, pecíolos 2-14mm de largo, arrugadas, festonadas, cubiertas con pelillos cortos venas prominentes en la cara externa; pedúnculos solitario. Flores tubulares 4-5mm de largo brácteas puberulentas, ovandas, acuminadas las inferiores micronadas; cabezas florales redondas u oblongas 8-12mm de largo, en pares en pequeños tallitos en las hojas axilares, cáliz viloso, corola lila, púrpura o blanca (39).

f. Agrotecnología: La planta se adapta a diferentes climas, aunque es de esperar que sus principios activos y calidad de aceite esencial varíen. De modo general, las temperaturas más altas tienden a favorecer un mayor desarrollo vegetativo de la planta. No soporta encharcamientos. Crece en suelos arcillosos, francos y arenosos. Bajo cultivo se desarrolla mejor en suelos franco y franco arenosos. Las temperaturas adecuadas de cultivo están entre 15 y 25°C (40).

g. Usos medicinales: Regularmente las hojas y flores han sido utilizadas popularmente por sus actividades antiespasmódica y sedativa, propiedades terapéuticas atribuidas a la composición de sus aceites esenciales, especialmente  $\beta$ -cariofileno y geraniol. El cocimiento de hojas y flores se usa por vía oral para el tratamiento de afecciones hepáticas, gastrointestinales (cólico, colitis, diarrea, dispepsia, estomatitis, indigestión, flatulencia, náuseas y vómitos) y respiratorias (asma, catarro, laringitis, resfrío, tos), diabetes, fiebre, insomnio, enfermedades venéreas, gota, artritis, dolores musculares y de muelas, hipertensión y atención del parto. Por vía tópica las hojas machacadas se inhalan para inducir el sueño, la infusión se aplica en afecciones dermatomucosas y flujo vaginal. Experimentalmente en el sistema de piel y mucosas se probó la acción antifúngica y antibacteriana (40-42).

h. Otros usos: Las hojas se utilizan para sazonar comidas (41).

i. Farmacología: La tintura de las hojas es activa contra *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Salmonella typhi*. El aceite esencial es activo contra *Candida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes* y el extracto etanólico contra *Neurospora crassa*. Las hojas han demostrado actividad contra hongos (fitopatógenos *Drechslera oryzae*, *Fusarium moniliforme*) y contra insectos en granos almacenados. El aceite volátil presente en hojas y tallos tiene un efecto pectoral. Se ha encontrado efecto antioxidante. Mostró cierta actividad antiviral y se ha reportado actividad citostática (40-43).

j. Composición química: En las hojas se han detectado esteroides, taninos, flavonoides, saponinas, aminoácidos, alcaloides desconocidos y aceite esencial, compuesto mayoritariamente por carvona, citral, geraniol, cymol, pineno, además flavonoides y ácidos fenólicos, entre otros (42).

k. Farmacognosia: La materia vegetal usada como medicina son hojas frescas o secas, que debe reunir las mismas características fisicoquímicas y sanitarias de la materia usada para la elaboración de productos fitofarmacéuticos. La actividad astringente y antiséptica justifica su uso efectivo en el tratamiento postparto. El aceite volátil (1.2%) está compuesto de geraniol (34%),  $\beta$ -aurofileno (6%), geranol (4.1%) boneol (2.6%), óxido de ceriofileno (2.5%) alloaromadendreo (2.4%) cis  $\alpha$ -bisaboleno (2.1%) germacreno D (2%), nerol (1.6%) linalool (1.1%) citronelal (0.7%) limoneno (0.4%), isobutirato de geranilo (0.4%), cubenol (0.3%) transocimeno (0.2%), butirato de geranilo (0.2%) eugenol (0.2%), 1-octen-3-ol (3%) y copaenol (0.1%) (41).

#### **4. *Lippia chiapasensis* Loes.**

a. Familia: Verbenaceae.

b. Sinonimia: No se encontró información en bibliografías consultadas.

c. Nombres comunes: Salvia santa, salviyá (36).

d. Distribución geográfica: Matorrales o bosques, húmedos o secos, a menudo rocosos, frecuentemente en bosques de pino de roble, prados. Se encuentra a una altura de 1,500-3,000msnm. En Guatemala se ha descrito en Baja Verapaz; Huehuetenango; San Marcos; Sololá y Totonicapán, México (36).

e. Descripción botánica: Arbustos o árboles débiles a 4m de altura, las ramas densamente pubescentes, hojas en pecíolo de 4-14mm de largo, las briznas ovadas u ovadas-elípticas, 2-6cm de largo, 1.5-4.5cm de ancho, generalmente agudo, a veces obtuso, generalmente con forma de cuña (raras veces redondeado) en la base, escabroso por encima, generalmente es densamente y suavemente pubescente por debajo, venación prominente, márgenes dentados a serrados; pedúnculos 2-4 en cada axil, densamente pubescentes, 1.5-2.5cm de largo, las espigas de las flores 8-9mm de ancho, en frutas a 13mm de ancho, denso y muy floreado; brácteas ovadas en anthesis, 4-5mm de largo, 3-6mm de ancho, reniforme al envejecer, 6-9 mm. venoso, ciliado; cáliz 2-3 mm, largo, hirsuto; corola amarilla, dos veces más largo que el cáliz, generalmente puberuloso en el ápex y sin cuello (36).

f. Agrotecnología: No se encontró información en bibliografías consultadas.

g. Usos medicinales: Esta planta es usada por el grupo étnico quiché, que vive en la región de Totonicapán, como aromática en el tratamiento de enfermedades respiratorias, dermatomucosas y nerviosas (44).

h. Otros usos: Preparación de atoles y alimentos propios del altiplano guatemalteco (45).

i. Farmacología: No se encontró información en bibliografías consultadas.

j. Composición química: De las hojas se obtienen monoterpenos (79.3%) que representan la mayor fracción del aceite, particularmente los oxigenados (62.7%) y sesquiterpenos en bajo porcentaje (12.6%), cuyo componente principal es el  $\beta$ -cariofileno (3.0%). Los principales monoterpenos son trans-dihidrocarvone (14.2%), geranial (10.1%), neral (7.3%) y 1,8-cineole (7.2%). También se obtiene limoneno (5.2%) y canfeno (2.8%) (44).

k. Farmacognosia: No se encontró información en bibliografías consultadas.

## **5. *Lippia graveolens* Kunth**

a. Familia: Verbenaceae.

b. Sinonimia: *Lantana oreganoides* Mar & Gal (1844); *L. berandieri* Schuer (1847); *Goniostachyum graveolens* Small (1903).

- c. Nombre común: Orégano, orégano de monte, orégano mexicano (39).
- d. Distribución geográfica: Es nativa de Guatemala, se encuentra en pendientes pedregosas muy secas, en planicies o matorrales húmedos o secos, es endémica en la aldea Casas de Pinto, Río Hondo, Zacapa y forma rodales densos en los cerros de la aldea Paso de los Jalapas, de El Jícaro, El Progreso. Se reporta también al sur de Texas, México y Nicaragua (39).
- e. Descripción botánica: Arbustos delgados de 2m de alto, las ramas con pubescencia cortamente pilosa. Hojas: el pecíolo usualmente de 5-10mm de largo, los limbos oblongos o elíptico y ovalado a ovalado-oblongo, de 2-4cm de largo, usualmente obtusos o redondeados en el ápice algunas veces agudos, redondeados o subcordados en la base, densamente pilulosos en el haz, suavemente al tacto, glandular y densamente tomentosos o pilosa en el envés, los márgenes finamente crenados. Flores: espigas subglobosas a oblongas de 4-12mm de largo, brácteas en 4 filas, ovaladas a lanceoladas agudas, glandular y densamente pilosas. Cáliz: de 1-2mm de largo, glanduloso y velludo. Corola blanca: el tubo estrigoso, de 3-6mm de largo (39).
- f. Agrotecnología: Se desarrolla en climas secos, en las zonas de vida bosque seco subtropical y monte espinoso subtropical. En condiciones naturales crece en suelos arcillosos pesados y pedregosos. Bajo condiciones de cultivo desarrolla bien en suelos franco y franco arenosos. Temperatura 20-25°C. Precipitación de 400-900mm anuales, distribuidos de mayo a octubre. Se produce follaje más rápidamente entre un corte y otro (46).
- g. Usos medicinales: La decocción de las hojas se toma como un eficaz antiespasmódico en cólicos estomacales, vómitos como expectorante y en forma de baños para la gripe. La planta en cocimiento con sal y aplicada en forma de lienzos es muy usada para los golpes. Se utiliza para afecciones gastrointestinales (amebiasis, cólico, diarrea, disentería, dispepsia, estreñimiento, indigestión) y respiratorias (asma, bronquitis, catarro, influenza, laringitis, pleuresía, resfrío, tos), hidropesía, amenorrea, dismenorrea, ictericia y reumatismo (la planta fresca macerada en aceite se aplica a los dolores

reumáticos). Tópicamente: cicatrización de heridas, llagas e inflamaciones de la garganta (47,48).

h. Otros usos: Por su sabor aroma y valor nutritivo las hojas secas se usan para sazonar carne, pescado, embutidos, ensaladas, guacamol, pozol, salsas y licores; se usa como planta de jardín aromática. Su aceite esencial es poco explotado en la industria (48).

i. Farmacología: *In vitro*, estudios antibacterianos demuestran que la tintura de hojas es activa contra *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. typhi*, *Shigella flexneri*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* pero inactiva contra *Haemophilus influenzae*; la infusión de hojas demostró actividad contra los mismos microorganismos. Estudios antifúngicos demuestran que los extractos con diclorometano y etanol son activos contra *C. albicans*, *Aspergillus flavus*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum* y *Trichophyton rubrum*, pero inactivos contra *Cryptococcus neoformans*. La concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto diclorometánico contra bacterias es 10mg/ml y del etanólico es 1.75mg/mL. La CIM de la actividad contra *M. gypseum* es 2.5mg/mL. Estudios antiparasitarios demuestran que la decocción de la planta es activa contra *Giardia lamblia* (49,50).

j. Composición química: El tamizaje fitoquímico de las hojas contiene: aceite esencial (1.8%), glicósidos saponícos, taninos y triterpenos, celulosa, pigmento y elementos minerales, la corteza y raíz contienen glicódios saponícos aceite esencial y taninos. Las hojas contienen además flavononas y lapachenol. El fraccionamiento bioguiado del extracto metanólico con actividades antimicrobianas demuestra en la fracción activa la presencia de flavanonas y glicósidos iridoideas, identificados como ácido carioptosídico y lippósido I Y II. El aceite esencial tienen densidad 0.890-0.922 índice de refracción 1.479-1.498 contiene timol (20-60%) p-cimeno (7.7-28%) 1,8 cineol (4-14%) carvacrol (3.1-25%),  $\gamma$ terpineo (3.1-3.9%), metiltimol (2.4-3.8%) mirceno (0.9-2.5%),  $\Delta^3$ -careno (0.9-1.5%) cariofileno (0.8-2.0%) linalool (0.7-1.3%) y al menos 34 elementos más en menores cantidades. Estudios realizados en Guatemala y México demuestran que existen varios quimiotipos (51).



k. Farmacognosia: No se encontró información en bibliografía consultada

## **6. *Litsea guatemalensis* Mez.**

a. Familia: Lauraceae.

b. Sinonimia: No se encontró información en bibliografías consultadas.

c. Nombre común: Laurel (52).

d. Distribución geográfica: *L. guatemalensis* es endémica de Guatemala crece en bosque abiertos de pino y matorrales de 1,500-3,150msnm. Se ha descrito en Chimaltenango, Guatemala, Jalapa, Sacatepéquez y Sololá (52).

e. Descripción botánica: Es un árbol pequeño hasta 6m de alto, ramas delgadas, café. Hojas coriáceas, peciolo 1.5cm de largo, elíptico-lanceoladas, 8cm de largo, agudas en la base, lustrosas glabras (52).

f. Agrotecnología: Se obtiene por recolección en los campos de crecimiento silvestre en las regiones frías y montañosas del altiplano del país. Si bien es una planta relativamente frecuente en el país, raramente se encuentra en forma abundante en una localidad determinada. Se propaga por semilla, no existen cultivos establecidos en el país; florea de febrero a junio (52).

g. Usos medicinales: El cocimiento de hojas por vía oral se usa para el tratamiento de afecciones respiratorias (amigdalitis, males de la garganta, tos, tos ferina) y gastrointestinales (diarrea, cólico, úlcera), carencia de leche en la madre e hinchazón. Tópicamente se usa en lavados y baños de cansancio, úlceras, piernas hinchadas y epilepsia. Se le atribuye propiedad aromática, antiséptica astringente, balsámica, carminativa, emenagoga, emoliente, estimulante espasmolítica, febrífuga y pectoral (52).

h. Otros usos: Las hojas aromáticas son muy empleadas como condimento en la preparación de platillos como sopas, guisos y repostería, se usa en forma similar a *Laurus nobilis*. De las hojas se extrae un aceite etéreo con aplicación en la industria de cerveza y salchichas (52).

i. Farmacología: Estudios antifúngicos demuestran que la tintura de hojas de *L. guatemalensis* tiene moderada actividad contra *C. albicans*, el extracto presenta actividad insecticida contra hormigas (52).

j. Composición química: Por su olor característico similar a *L. nobilis*, se asume que tiene un aceite esencial rico en derivados terpénicos y glicéridos de los ácidos láurico, oleico, palmítico y linoleico. El tamizaje fotoquímico de *L. guatemalensis* indica: alcaloides cuaternarios y no cuaternarios, saponinas, esteroides insaturados, cardenólicos, butadienólicos, quercitina, estilbina y taraxon, el aceite esencial contiene limoneno y citral (52).

k. Farmacognosia: El material médico son las hojas secas, las que deben tener las características botánicas, fisicoquímicas y organolépticas que caracterizan a la especie oficial. La presencia de limoneno en el aceite esencial reduce la dismenorrea por inhibición de la biosíntesis de prostaglandina (52).

### **7. *Ocimum micranthum* Willd.**

a. Familia: Lamiaceae.

b. Sinonimia: *Ocimum americanum* L.

c. Nombres comunes: Albahaca, albahaca cimarrona, albahaca de monte, albahaca blanca, basen, cacaltun (52).

d. Distribución geográfica: Es nativa de América tropical, se cultiva en jardines y huertos a casi todas las alturas del país (52).

e. Descripción botánica: Es una hierba anual, 50cm de alto, erecta, ramificada, tallos puberulentos o glabros. Hojas delgadas ampliamente, ovaladas 2-7cm de largo, agudas redondeadas a la base, aserradas, casi glabras, densa y finamente glandular, pálidas al envejecer. Inflorescencia con numerosos verticilios florales, separados, en alargada panícula, racimosas, pedicelos 4-7mm de largo, recurvado; cáliz de 7-8mm de largo, verdes, puberulentos o glabros, corola blanca (52).

f. Agrotecnología: Se obtiene por recolección en las regiones de crecimiento silvestre. Se recomienda iniciar actividades de manejo, domesticación y cultivo para garantizar su disponibilidad. Empíricamente se multiplica por esquejes que se enraízan en suelo cernido y se trasplanta a filas de 40cm. Las hojas se secan a la sombra (52).

g. Usos medicinales: El cocimiento en infusión se usa oralmente para tratar afecciones gastrointestinales (diarrea, disentería, gastralgia, parasitismo), respiratorias (bronquitis, catarro, fiebre, resfrío, tos) y nerviosas, dolor de oído y cabeza, halitosis, vértigo, infección renal y reumatismo. Tópicamente se usa en baños, cataplasmas para tratar afecciones dérmicas (llagas, pólipos, úlceras, verrugas), tumores y parásitos del ganado; la tintura se usa para hacer fricciones en gota y reumatismo; la hoja fresca machacada se aplica para eliminar miasis nasal del género *Lucilia*; el polvo de hojas secas se aspira para congestión nasal y el jugo de hojas frescas para lavado de ojos (52).

h. Otros usos: Las hojas frescas y secas se usan para sazonar comidas y ensaladas. El olor de las hojas frescas es repelente para larvas de insectos y mosquitos, razón por la que se cuelgan ramas frescas en las viviendas; tiene uso aromático, ornamental y cosmético. Por su actividad aperitiva, digestiva y espasmolítica está indicada por vía oral en el tratamiento de inapetencia, digestiones lentas, meteorismo, espasmo gastrointestinal, vómitos, dolor de estómago, tos convulsiva y jaqueca. Para la aplicación tópica están indicados las lociones, esencias y el polvo en el tratamiento de heridas, eczema y dolores musculares (52).

i. Farmacología: Estudios antimicrobianos demuestran que el extracto acuoso de hojas es activo contra bacterias, la tintura es poco activa contra bacterias Gram positivo y Gram negativo e inactiva contra *C. albicans*. El aceite esencial es activo contra patógenos humanos como bacterias (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. aureus*) y hongos (*A. flavus*, *C. albicans*, *C. neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Microsporium canis*, *M. gypseum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*), hongos fitopatógenos (*Alternaria* sp., *Diploplia natalensis*, *Lenzites trabea*, *Penicillium digitatum*, *Polyborus versicolor*) (52).

j. Composición química: La composición química varía según las condiciones climáticas y genéticas. *O. micranthum* contiene triterpenos y aceite esencial. El aceite está presente en toda la planta, los compuestos mayoritarios son: en hojas, eugenol (20%), 1,8-cineol (20%),  $\beta$ -cariofileno (19%),  $\gamma$ -elemeno (16%);

en flores,  $\gamma$ -elemeno (41%),  $\beta$ -cariofileno (19%),  $\beta$ -salineno; en tallos,  $\gamma$ -elemeno (32%),  $\beta$ -cariofileno (20%),  $\beta$ -salineno (11%) y 1,8-cineol (10%) (52).

k. Farmacognosia: La materia médica son las hojas secas. Microscópicamente son hojas quebradas, tallos delgados y algunas flores; olor fuerte, aromático, sabor ligeramente amargo. La actividad biológica se atribuye principalmente a su aceite esencial que le confiere propiedad aromática, antiséptica, (bacterias, micobacterias, parásitos), aperitiva, digestiva, carminativa, espasmolítica, insecticida y sedante (52).

## **8. *Pimenta dioica* (L.) Merrill**

a. Familia: Myrtaceae.

b. Sinonimia: *Pimenta officinalis* Lindl., *Myrtus dioica* L.

c. Nombres comunes: Pimienta, pimienta gorda, ixnabacuc (maya) (53).

d. Distribución geográfica: Bosque húmedo subtropical y en los departamentos del Petén, Belice, Quiché, Alta Verapaz, Izabal, desde el Sureste de México, Península de Yucatán, hasta Panamá y Antillas e Indias Occidentales (53,54).

e. Descripción botánica: Árbol de hasta con más de 20m de altura, 30-40cm de diámetro a la altura del pecho, tronco liso y recto con corteza de color café pálido desprendiéndose en escamas delgadas o grandes láminas, ramillas creciendo vigorosamente y 4 anguladas, los ángulos terminando distalmente en la posición de las estípulas, ramillas, inflorescencias y follaje joven cerradamente apresado-pubescente con pelos blanco-amarillentos o sórdidos; flores colocadas sobre panículas axilares de 6-12cm de largo, ramas cinosas finamente pubescentes con muchas flores, pétalos 4 de 2 a 2.5mm de largo, fruto aromático, generalmente subgloboso, una baya de 10mm de largo por 5mm de ancho, ápice aplanado, verrugosa, cáliz persistente, semillas suborbiculares, 1 a 2 pequeñas, lateralmente comprimidas, embrión formando una espiral doble (53,54).

f. Agrotecnología: No se encontró información en bibliografía consultada.

g. Usos medicinales: Tónico estimulante, astringente, mejora digestión y es odontológico, las hojas se fuman como tabaco. La semilla en decocción, con

sal y agua, por vía oral, se usa como vomitiva y para la diarrea y disentería. Las semillas machacadas y en infusión, para dolores de cabeza, estomáticas, antiinfluenza, carminativas y antidiabéticas. La decocción de la planta es apta para baños y lavados en caso de reumatismo. Se usa para cólicos e infecciones estomacales, para calmar dolores de todo tipo: dolores menstruales, dolores de parto, es abortivo; para dolor de músculos, dolor de cabeza, dolor de muelas y sofocación (53,55-58).

h. Otros usos: Es muy usado como condimento en los países americanos y europeos, y se vende generalmente en los mercados de Guatemala. La pimienta se usa molida o en aceite destilado, para varias preparaciones (carnes, repostería). Los frutos se recogen aún verdes y puestos a secar dan una especie apreciada que en inglés recibe el nombre de “all spice” porque su sabor recuerda a la vez la canela, el clavo y la nuez moscada. El fruto la Guayabita, también se usa como condimento, en postres y dulces, tales como plátanos y otros y en bebidas, en los llamados caratos, de arroz o de maíz y otros en ponches. La hoja se usa como condimento, principalmente en platos salados y se destila un aceite utilizado en la industria alimenticia y en perfumería (54,56,59).

i. Farmacología: Esta planta presenta una notable actividad antifúngica *in vitro*, en especial el aceite esencial extraído de la hojas y frutos contra *Lentinus lepideus*, *Lenzites trabea* y *Malassezia furfur* (55,60).

j. Composición química: El fruto seco recolectado antes de la madurez contiene 2-5% de aceite esencial, con alrededor de 35% de eugenol, 40-45% de eugenol-metil-éter, cariofileno y cineol, ácidos grasos, una resina, almidón, ácido málico, oxalato de calcio y taninos, flavonoides ramnósidos y xilósido de quercetín e isoquercetín. También se ha identificado el componente fenílico coniferaldehído (51, 54, 59). De las hojas se obtiene un aceite esencial en el que se han identificado los monoterpenos delta-cadineno, 1-8-cineol, para-cimeno, limoneno, linalol, cis- y trans-beta-ocimeno, alfa felandreno, alfa-pineno, saboneno, terpin-1-en-4-ol, gama-terpineno y terpinoleno; los sesquiterpenos beta-caricineno, alfa-copaeno, alfa-gurjeno, alfa-humuleno, alfa-muroleno y alfa-

selineno; y los componentes ferúlicos coniferaldehído, eugenol, su éter metílico e isoeugenol (53,56,61).

k. Farmacognosia: No se encontró información en bibliografía consultada.

### **9. *Piper auritum* Kunth.**

a. Familia: Piperaceae.

b. Sinonimia: No se encontró información en bibliografía consultada.

c. Nombres comunes: Santa María, hoja de Santa María, hoja de jute, juniapra, caña de oro, ocaya, hierba santa, hoja de la estrella, obet, xaclipur (61,62).

d. Distribución geográfica: Nativa del sur de México hasta Colombia, cultivada y naturalizada en Cuba y el sur de la Florida. En Guatemala se le puede encontrar en bosques húmedos, a menudo como una vegetación se encuentra en los departamentos del Petén, Alta Verapaz, Izabal, Zacapa, Santa Rosa y Escuintla, Guatemala, Sacatepéquez (probablemente introducida), Chimaltenango, Sololá, Suchitepéquez, Retalhuleu, Quetzaltenango y San Marcos (61).

e. Descripción botánica: Hierba suculenta, grande, gruesa, con ramas esparcidas o raramente leñosas y viniendo a ser árbol, comúnmente de 2m de alto, pero ocasionalmente puede medir 6m; las ramas firmes son esparcidamente pubercentos o glabras, las hojas son cortas o elongadas y firmes peciolos, usualmente de color verde-amarillento brillante; la inflorescencia es una espiga de color verde pálido, de 4mm de grosor, comúnmente de 20-25cm de longitud; el fruto es una baya muy pequeña ovoide o globosa; las semillas son pequeñas con una testa membranosa, el endospermo copioso y con el embrión pequeño (61).

f. Agrotecnología: No se encontró información en bibliografía consultada.

g. Usos medicinales: La infusión de las hojas puede usarse en malestares estomacales. Un extracto de las hojas se usa como anestésico local. Sus hojas son empleadas como emolientes analgésicos antiinflamatorios y combinadas con aceite son colocadas en el área del hígado en caso de cólicos. Se utiliza la decocción de las hojas por vía oral para la presión alta y dolor de ovario (61,62).

- h. Otros usos: En Guatemala las hojas se usan para condimentar las carnes y alimentos que contienen el caracol llamado "jute" (*Ampullaria* sp.) (61).
- i. Farmacología: No se encontró información en bibliografía consultada.
- j. Composición química: No se encontró información en bibliografía consultada.
- k. Farmacognosia: No se encontró información en bibliografía consultada.

#### **10. *Piper jacquemontianum* Kunth.**

- a. Familia: Piperaceae.
- b. Sinonimia: No se encontró información en bibliografía consultada.
- c. Nombres comunes: Cordoncillo, poozcuyaax (63).
- d. Distribución geográfica: Bosques o matorrales húmedos o lluviosos, algunas veces en bosque de pino o en pantanos de Mancaría, ubicado a unos 900 msnm. En Guatemala se ha descrito en los departamentos de Alta Verapaz, Petén e Izabal (58,59).
- e. Descripción botánica: Arbusto de aproximadamente 2m de altura, pecíolos mayormente de 1cm de largo o menos, algunas veces más largo en las hojas bajas, ápice abruptamente acuminado o largamente acuminado, muy desigual en la base y más o menos oblicua, usualmente redondeado o más o menos cordado en un lado y obtuso en el otro, un lado más decurrente que el otro, gruesas y firmes, muy lustrosas en el haz y con frecuencia lustrosas en el envés, un poco más pálidas en el envés, cuando se secan se tornan verde grisácea o algunas veces negruzca, con puntos pelúcidos finos, glabras en el haz, suaves al tacto, hispidulosas en el envés, especialmente en los nervios (63).
- f. Agrotecnología: No se encontró información en bibliografía consultada.
- g. Usos medicinales: En Guatemala se utiliza para bajar la fiebre, para granos, para la tos y para aliviar el dolor de cabeza y de cuerpo, para el dolor del corazón, para la presión (64).
- h. Otros usos: No se encontró información en bibliografía consultada.
- i. Farmacología: Estudios farmacológicos demuestran que el aceite esencial a 0.1 mg/mL tiene actividad contra *Mycobacterium smegmatis* y *Bacillus subtilis*,

actividad citotóxica contra *Artemia salina* a 0.5mg/mL y actividad insecticida contra *Anopheles albimanus* y *A. aegypti* hasta el tercer estadio (64).

j. Composición química: En el aceite esencial se identificaron los siguientes compuestos: alfa-pineno, beta-pineno, gamma-3-careno, bornileno, 1,5 ciclodecadieno, beta-cariofileno, D-germacrano (65).

k. Farmacognosia: No se encontró información en bibliografía consultada.

### **11. *Psidium guajava* L.**

a. Familia: Myrtaceae.

b. Sinonimia: *Psidium pyrifera* L., *P. pomiferum* L.

c. Nombres comunes: Guayaba, Cak, Ch'amxuy, Coloc, Eanandí, Ikiec, Guava, Patá, Pataj, Pichi, Posh (48).

d. Distribución geográfica: Nativo de América tropical, se encuentra en bosques húmedos y secos, pastos y bosquecillos puros del árbol. En Guatemala se ha descrito en todo el país, particularmente en: Baja Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Jutiapa, Santa Rosa y Suchitepéquez (48).

e. Descripción botánica: Árbol de 10m de alto, tronco 20-25cm de diámetro, corteza suave, pubescente, delgada, rojo-café, produce escamas que caen. Hojas verdes, opuestas, pecíolo corto, elípticas u oblongas, 5-15cm de largo, redondos en el ápice y en la base, múltiples venas horizontales, conspicuas, provistos de glándulas. Flores axilares, solitarias, blancas, 3-4cm de ancho, penacho de 275 estambres. Frutos aromáticos, ovales o piriformes, 2-10cm de largo, cáscara amarilla, carnaza rosada o amarilla, por fuera granular y firme, al centro suave, lleno de pulpa jugosa con muchas semillas color café claro, 3-5mm de largo, redondas y duras (48).

f. Agrotecnología: Se adapta a una gran variedad de clima, desde tropical húmedo hasta mediterráneo; necesita 1,000-4,500mm/año de lluvia, aunque resiste hasta 6 meses de sequía; se adapta del suelo arcilloso y compacto hasta arenoso, ligeramente ácido. La propagación puede hacerse por semillas, acodos, injerto, estacas e hijuelo. En la descendencia se observa mucha variación, lo que sugiere hibridación frecuente (48).



g. Usos medicinales: La decocción de hojas y corteza se usa por vía oral para tratar afecciones digestivas (amebiasis, diarrea, disentería, cólico, dolor de estómago, parasitismo intestinal, vómito), anemia, artritis, diabetes, hemorragia, hinchazón, uretritis, asma y resfrío. La decocción por vía tópica se recomienda en baños y lavados para tratar enfermedades dermatomucosas (fístulas, leucorrea, piodermia, raspones, tinea, úlcera) y enjuagues para lengua inflamada. Las hojas y corteza contienen resina llamada “guafín” que tiene una acción marcada contra las fiebres palúdicas. A las hojas y corteza se les atribuye propiedad antibacteriana, antiemética, antiinflamatoria, antihelmíntica, antiséptica, antitusiva, astringente, carminativa, espasmolítica y tónica (66).

h. Otros usos: La fruta madura se come fresca, cocida y en jalea; el mesocarpio es agrídulce. La corteza amarilla se utiliza para curtir pieles y teñir seda y algodón. El árbol se siembra como sombra del café, cerco vivo y ornamento. Con las frutas y hojas se prepara una bebida astringente, conocida en Venezuela como guarapo (67).

i. Farmacología: Estudios antibacterianos demuestran que la tintura de hojas es activa contra *E. coli*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. typhi*, *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri* y *P. aeruginosa*; es inactiva contra *Vibrio cholerae* y *Neisseria gonorrhoeae*. La tintura inhibe 80% de cepa de *E. coli*, *S. typhi*, *S. dysenteriae* y *S. pyogenes*; el mejor disolvente es etanol y la CIM 5mg/mL para *S. typhi* y *S. aureus*. Estudios antifúngicos demuestran que la tintura de hojas es activa contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. stellatoidea* con una CIM de 1-2mg/mL (67).

j. Composición química: La planta es rica en taninos (hojas 9-10%, corteza 12-30%). Las hojas contienen grasa (6%),  $\beta$ -sitosterol, ácido maslínico y elágico, aceite esencial (0.1-0.3%), triterpenoides ( $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -bisaboleno, aromadendreno, cadaleno, cineol, eugenol, limoneno, nerolidol,  $\beta$ -selineno, ácidos orgánicos (oleanólico, ursólico, cratególico y guayavólico), flavonoides derivados de quercitina como guayaverina (3- $\alpha$ -arabospiranósido) y avicularina (3-arabinósido). El análisis proximal de 100 g de hojas contiene: proteína (11.7 g), grasa (8.7 g), carbohidratos (71.9 g), fibra (16.1 g), ceniza (7.7 g), calcio

(1,320 mg) y fósforo (160 mg), vitamina A y ácido ascórbico (300-486 mg); 100g del fruto contienen; calorías (36-50), humedad (67,68).

k. Farmacognosia: La materia médica son las hojas y corteza secas. Las características macroscópicas y microscópicas indican que la corteza es no fibrosa, contiene una variedad de oxalatos de calcio, taninos y almidones; los lenticelos son pequeños y pronunciados en la superficie; los tricomas de la epidermis de la piel son unicelulares y vermiformes, se presentan cavidades mucilaginosas. Por su contenido de taninos y su actividad astrigente es efectiva en el tratamiento de diarrea, indigestión y espasmo abdominal. La actividad antidiarreica se atribuye a la quercetinas presentes en las hojas y corteza, que tienen una definitiva acción antsecretoria en la liberación de acetilcolina e inhibidora del peristaltismo intestinal, que no es reversible por naxalone; este efecto se debe al bloque de los canales de calcio o al inhibición del sistema enzimático responsable de la síntesis de prostaglandinas, que se relacionan con la liberación de acetilcolina; el extracto alcohólico muestra una actividad similar a la producida por morfina. La actividad antibacteriana se atribuye a los flavonoides (avicularina, guayaverina y quercetina). La actividad antiprotozoárica se atribuye al ácido psidiólico que además tiene actividad contra *Mycobacterium phlei* (48).

## **12. *Tagetes lucida* Cav.**

a. Familia: Asteraceae.

b. Sinonimia: *Tagetes florida* Sw.

c. Nombres comunes: Pericón, Iyá, Hierba de San Juan (69).

d. Distribución geográfica. Nativa de México a Honduras en bosques de Encino (*Quercus* sp.) y laderas de 1000 a 2000msnm. Abundante en la época de lluvia, desaparece en la época seca (69).

e. Descripción botánica: Hierba perenne muy aromática, glabra, erecta de 30-95cm de altura, hojas opuestas, sésiles, laminares u oblongas lanceoladas; 5-10mm de largo por 7-9mm de ancho, romas o puntiagudas, obtusas o agudas en el ápice, finamente dentadas, provistas de numerosas glándulas oleosas,

pequeñas, y esparcidas. Flores amarillas en pequeñas cabezuelas terminales o cimbras abiertas de 9-10mm de diámetro, involucro o cilíndrico, de 7-10mm de largo, de 2- 3mm de ancho en arreglos terminales (69).

f. Agrotecnología: La planta silvestre es abundante en bosques de encino y laderas de 1,000 a 2,000msnm. Su cultivo se hace principalmente por semilla, que germina a los 15 a 20 días y florece a los 5 a 6 meses. Es abundante en la época de lluvia, desaparece en época seca (48).

g. Usos medicinales: Dolor de estómago: hojas y flores aplicadas por vía oral. Gastritis, dolores musculares. Cólicos, fiebre, malaria y antídoto de picaduras de escorpión, fiebre y tos, acelerar el parto, ahuyentar mosquitos, úlceras, diarreas, retención urinaria, dolor de cabeza, indigestión y menstruación (70-75).

h. Otros usos: La planta completa tiene uso culinario (75).

i. Farmacología: Estudios antibacterianos *in vitro* demuestran que la maceración etanólica de hojas y flores es activa contra enterobacterias (*E. coli* enteropatógena -ECEP-, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. typhi*) y *S. pyogenes*. Poca actividad contra *N. gonorrhoeae*. El extracto acuoso es activo contra ECEP, *S. typhi*, *S. enteritidis*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*. El estudio del espectro de inhibición del extracto alcohólico demostró inhibición del 60% de cepas de *P. aeruginosa* y 15% de cepas de *S. typhi*. El tamizaje de la actividad vibriocida *in vitro* demostró que la maceración hidroalcohólica inhibe *V. cholerae*, la mayor actividad se extrajo con n-hexano con una concentración mínima inhibitoria (CIM) de 10µg/mL (76,77).

j. Composición química: Las hojas y flores contienen aceite esencial (limoneno, 16.5%; β-ocimeno, 14%; β-cariofileno, 28%; mirceno, 4.5%; tagetona, dihidrotagetona, tetrahidrotagetona, esdragol, éter metílico de eugenol, linalool, alilanisol). La planta contiene además alcaloides cuaternarios, flavonoides (quercetagetina, patuletina) saponinas, taninos, lucoantocianinas, ácidos gálicos, poliacetilenos, glucósidos, cumarinas, dimetilalil éter de 7-hidroxycumarinas, 7-metoxicumarinas, 6,7,8-trimetoxicumarina, además derivados de tiofeno, poliacetilenos (5-(3-buten-1-inil)-2,2'bitienol (78,79).

k. Farmacognosia: No se encontró información en bibliografía consultada.

## V. JUSTIFICACIÓN

*Listeria monocytogenes*, es un patógeno de humanos, que puede provocar gastroenteritis, listeriosis cutánea, abortos, partos prematuros, meningitis, sepsis y otras complicaciones, especialmente en personas inmunocomprometidas, ancianos y niños, provocando en muchos casos la muerte. La principal vía de adquisición de *L. monocytogenes* es la ingestión de alimentos contaminados (15, 26, 27).

Debido a la alta prevalencia de enfermedades transmitidas por alimentos, es necesario explorar nuevas alternativas para su control, siendo de interés el uso de antimicrobianos naturales como preservantes, ya que evitan enfermedades y proporcionan mayor calidad y vida útil en los alimentos. Muchos compuestos que se encuentran en variedad de plantas utilizadas comúnmente en la dieta y en remedios caseros, se han identificado en diferentes estudios como antibacteriales efectivos, encontrándose en algunos, efecto inhibitorio específico contra *L. monocytogenes* (26-30).

En Guatemala existen diferentes especies de plantas aromáticas, condimentarias y medicinales; de estas se eligieron para el presente estudio doce para la determinación de la actividad inhibitoria de aceites esenciales y extractos contra *L. monocytogenes*. A estas plantas se les ha mostrado efectos inhibitorios contra bacterias Gram positivo, sin embargo no se han probado bioensayos contra la bacteria referida y que de poseer efecto inhibitorio, tendrían importantes aplicaciones para la preservación de alimentos y de esta forma evitar infecciones asociadas a este microorganismo.

## VI. OBJETIVOS

### A. GENERAL

Determinar la actividad inhibitoria *in vitro* de aceites esenciales y los extractos metanólico y diclorometánico de doce especies condimentarias guatemaltecas sobre *Listeria monocytogenes*.

### B. ESPECÍFICOS

1. Obtener 24 extractos vegetales por medio de la técnica de extracción fraccionada y concentración con rotavapor y 12 aceites esenciales por medio de la técnica de hidrodestilación con Neoclevenger.
2. Determinar la actividad biológica de doce extractos de plantas y aceites esenciales sobre el crecimiento de una cepa ATCC de *L. monocytogenes*, aplicando un bioensayo de actividad antimicrobiana *in vitro* por el método de difusión en disco.
3. Determinar la concentración inhibitoria mínima de los extractos y/o aceites esenciales que resulten activos contra *L. monocytogenes*.

## VII. HIPÓTESIS

Al menos uno de los extractos o aceites esenciales de las plantas utilizadas tiene actividad antibacteriana contra *Listeria monocytogenes*.

## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Universo

Doce plantas de diferentes regiones guatemaltecas utilizadas popularmente para condimentar alimentos y para el tratamiento de diversas afecciones.

### B. Muestra

Doce extractos metanólicos, doce extractos diclorometánicos y doce aceites esenciales de plantas:

- *Cornutia grandifolia* (Schlecht & Cham) Schauer (lirio tropical)
- *Eryngium foetidum* L. (cilantro)
- *Lippia alba* Miller N. E. Broune ex Brit & Wils (salvia sija)
- *Lippia chiapasensis* Loes (salviyá)
- *Lippia graveolens* Kunth (óregano)
- *Litsea guatemalensis* Mez (laurel)
- *Ocimum micranthum* Willd (albahaca)
- *Pimenta dioica* L. Merrill (pimienta gorda)
- *Piper auritum* Kunth (Santa María)
- *Piper jacquemontianum* Kunth (cordoncillo)
- *Psidium guajava* L. (guayaba)
- *Tagetes lucida* Cav. (pericón)

### C. Recursos

#### 1. Humanos

- a. Seminaristas: Br. Rosa Alejandra Alvarez de León  
Br. Astrid Liseth García Higueros  
Br. Nidia Verónica Oliva Retana  
Br. Ana María Rojas Sazo
- b. Asesor: Lic. Armando Cáceres
- c. Revisor: Licda. Isabel Gaitán

## 2. Institucionales

- a. Laboratorio de Bioensayos Departamento de Citohistología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia USAC.
- b. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia USAC.
- c. Laboratorio de Productos Naturales Farmaya.

## **D. Materiales**

### 1. Equipo

- Autoclave
- Balanza analítica y semi analítica
- Balón de destilación de 1000mL
- Campana bacteriológica
- Cristalizadores
- Desecadora
- Embudos de vidrio
- Erlenmeyer de 500 y 1000mL
- Espátula
- Estufa
- Gradilla
- Horno
- Incubadora a 25 y 37°C
- Microscopio
- Rotavapor
- Destilador Neoclevenger
- Percoladora
- Pinzas
- Pipetas automáticas
- Probeta de 1000mL
- Quemadores



- Refrigerador 4°C
- Vaso de precipitar de 500mL
- Vórtex

## 2. Materiales y reactivos

- Agar base sangre (Merck)
- Agua destilada
- Algodón
- Asas en argolla
- Bandejas de plástico y aluminio
- Bolsas Ziploc
- Bulbos
- Cajas de Petrí
- Caldo tripticasa soya
- Cristal violeta
- Diclorometano
- Discos de Penicilina
- Penicilina G benzatínica liofilizada Unipharm®
- Discos estériles sin impregnar
- Etanol al 70%
- Frascos ámbar y viales
- Hisopos estériles
- Jeringas estériles de 10mL
- Láminas portaobjetos
- Metanol
- Papel aluminio
- Papel mayordomo
- Papel parafilm
- Pentano
- Peróxido de hidrógeno

- Pipetas Pasteur
- Safranina como colorante de contraste
- Sangre de carnero
- Silicone
- Solución de lugol
- Solución decolorante de Gram
- Solución salina
- Tips amarillo, azules y blancos para pipetas automáticas
- Tubos de ensayo
- Viales con tapadera de rosca

### 3. Microbiológicos

- Cepa ATCC® 19115 de *Listeria monocytogenes* y Cepa ATCC® 700402 de *Listeria innocua* donada amablemente por la Licenciada Leyla Dabroy del Laboratorio Nacional de Salud (LNS)
- Cepa de *Listeria monocytogenes* aislada de muestra clínica del Hospital Regional de Occidente (HRO 634)

## E. Metodología

### 1. Preparación de extractos vegetales (80)

- Se pesó 200g de material vegetal.
- Se colocó algodón en la parte inferior del percolador.
- Se dobló un pedazo de papel filtro para formar un cono que se colocó en el fondo del percolador y cubrió sus paredes internas.
- Se humedeció previamente el material vegetal con diclorometano.
- Se transfirió todo el material vegetal al percolador, quedando dentro del cono de papel filtro, y se agregó el disolvente hasta cubrirlo.
- Se dejó reposar por 24 horas.
- En un erlenmeyer se recolectó todo el disolvente y se colocó en un balón de destilación de 1000mL.

- Se verificó que todas las conexiones eléctricas estuvieran conectadas, el nivel del baño de calentamiento fuera el adecuado y la llave de alimentación del refrigerante estuviera cerrada.

- Se colocó el balón con el disolvente y sujetó con la llave correspondiente y se hizo girar con una rotación del 50% y se subió la temperatura (de 35-40°C cuando el disolvente era diclorometano y 55-60°C cuando el disolvente era metanol.

- Se inició la destilación del extracto y se continuó hasta que estaba semisólido.

- Se encendió la bomba de vacío varias veces para ayudar a la destilación cuando fue necesario.

- El disolvente recuperado se agregó de nuevo al percolador que contenía el material vegetal, se dejó reposando por 24 horas y se repitió el proceso de destilación.

- La operación anterior se repitió una vez más y en esta última se concentró el extracto hasta que éste tenía una consistencia semisólida y/o ya no era posible recuperar más disolvente por medio de destilación.

- Se agregó entonces metanol a la percoladora con el mismo material vegetal que previamente se utilizó con diclorometano, se dejó reposar por 24 horas y se repitió el mismo proceso anterior de destilación y concentración.

- Cada extracto concentrado se colocó en un recipiente de vidrio previamente tarado y rotulado y se colocó en una desecadora en un período de 7 a 15 días.

- Se verificó la consistencia sólida del extracto y se colocó en recipientes previamente tarados y rotulados para almacenarlos en refrigeración.

- Se calculó el porcentaje de recuperación de cada uno de los extractos.

## 2. Preparación de aceites esenciales (80)

- Se pesaron de 25 a 30g de material vegetal dentro del balón.

- Se agregó poco a poco 500mL de agua del grifo, tratando de que todo el material vegetal se impregnara, y evitando que quedara flotando en la superficie del agua.

- Se colocó el balón sobre una red de calentamiento y se conectó al sistema Neoclevenger, utilizando silicón en cada una de las uniones.

- Se verificó que la llave del sistema estuviera cerrada.

- Se agregó agua destilada en el sistema a través del dispositivo para este fin, hasta que llegó al nivel de la protuberancia superior.

- Se agregó aproximadamente 1mL de pentano dentro del sistema a través del orificio para este fin.

- Se encendió el dispositivo de enfriamiento y la red de calentamiento.

- Se esperó a que el agua dentro del balón iniciara a evaporarse y se observó cuando cayó la primera gota condensada sobre el pentano, a partir de ese momento se empezó a contar 2 horas para apagar el sistema.

- Se dejó enfriar el sistema.

- Se extrajo el agua que quedó dentro del sistema con la llave cuidando que el pentano se quedara dentro para que pudiera ser extraído en otro recipiente.

- Una vez extraído el pentano se verificó que no hubiera quedado agua en el mismo recipiente, cuando fue así, se extrajo con una pipeta Pasteur.

- Se dejó evaporar el pentano dentro de una campana de extracción por 24 horas.

- Se determinó el porcentaje de rendimiento del aceite esencial obtenido.

- Se guardó el aceite esencial en un vial y se refrigeró.

### 3. Mantenimiento de las cepas de *L. monocytogenes* (17).

- Se usaron las cepas ATCC® 19115 de *Listeria monocytogenes*, *Listeria monocytogenes* HRO 634 y una cepa ATCC® 700402 de *Listeria innocua*, mantenidas en agar tripticasa soya a 4°C.

- Se inoculó en caldo tripticasa soya e incubó a 37°C por 24 horas para promover el crecimiento de las cepas.

- Se tomó una asada del caldo e inoculó 5 tubos de agar tripticasa soya que se guardaron a 4°C.
- Se tomó otra asada del caldo e inoculó en agar sangre al 5%, que se incubó 24 horas a una temperatura de 37°C.
- Se observaron colonias grisáceas pequeñas con un diámetro de 2mm.
- Se realizaron pruebas de identificación bioquímica de la bacteria: catalasa (+), tinción de Gram (bacilos cortos Gram positivo), hidrólisis de esculina (+) y movilidad (positiva a 25°C, en forma de sombrilla).
- Se inoculó la cepa en tubos con slant de tripticasa soya y se dejó incubar a 36°C por 24 horas y luego se refrigeró la cepa.
- Se tomó una asada de la misma, se inoculó en caldo tripticasa soya que se incubó a 36°C por 24 horas luego se inoculó en una caja de agar sangre por 24 horas a 36°C.

#### 4. Validación del Método (81)

Se realizó una curva de relación dosis/efecto por el método de difusión en disco, utilizando discos impregnados con penicilina G benzatínica (Unipharm®) (antibiótico de elección contra *Listeria* sp.) en concentraciones de 1UI, 10UI y 100UI, contra las tres cepas del estudio por quintuplicado. Se observó que existe relación dosis/efecto, por lo que se escogió un disco conteniendo 10UI como referencia para el bioensayo.

Actividad de penicilina contra cepas de *Listeria* sp. empleando la técnica de difusión en disco

Cepa	Concentración		
	1UI	10UI	100UI
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC® 19115	14	24	28
<i>Listeria monocytogenes</i> HRO 634	12	22	26
<i>Listeria innocua</i> ATCC® 700402	20	29	33

Fuente: Datos Experimentales. Evaluado por quintuplicado. Resultados expresados en milímetros.

5. Ensayo de actividad antimicrobiana de *L. monocytogenes* de extractos y aceites esenciales de plantas (82).

El ensayo de actividad inhibitoria *in vitro* se realizó por el método de difusión en disco. Este consiste en enfrentar la bacteria, con los extractos y aceites esenciales de plantas, mediante discos impregnados por los mismos, utilizando el medio agar Müller Hinton-sangre.

- Preparación de dilución del extracto a concentración conocida (4µg/µL). Se pesó en un vial 0.0120g de los extractos a evaluar y se disolvió en 3mL de metanol; se agitó en un vórtex hasta que este se disolviera. Se utilizó un sonicador para terminar de disolver en los extractos que fue necesario.

- Se filtraron cada una de las soluciones de los extractos con filtros estériles de 0.20µm.

- Impregnación de discos de papel filtro.

- Se impregnaron discos estériles con 50µL de cada extracto a una concentración de 4µg/µL, lo que equivale a 200µg de extracto por disco seco (se impregnaron 10µL cada 30 minutos, para evitar sobresaturación del disco y favorecer la evaporación del disolvente) y 10µL de aceite esencial sin dilución.

- Preparación del inóculo de *L. monocytogenes*

- Se inocularon colonias de *L. monocytogenes* en un vial con 1ml de solución salina estéril.

- Se comprobó que la turbidez coincidiera con el estándar de McFarland 0.5.

- Se inocularon con un hisopo estéril la superficie de las placas de agar sangre, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo.

- La placa inoculada se dejó reposar durante 3-5 minutos a temperatura ambiente para que cualquier exceso de humedad superficial fuera absorbido.

- Dentro de los 15 minutos siguientes a la inoculación de la placa, se colocaron los discos impregnados sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril.

- Se colocaron un máximo de 6 discos con los extractos y aceites esenciales por caja, se incluyó por cada corrida 1 disco de penicilina de 10UI como control positivo y un disco impregnado con metanol, como control negativo.

- Se realizaron un total de cinco repeticiones para garantizar un error inferior al 10%.

- Interpretación de resultados

Negativo: ausencia de halo de inhibición, diámetro de 6mm.

Positivo: presencia de halo de inhibición, diámetro mayor o igual a 7mm.

6. Ensayo de actividad antimicrobiana para concentración inhibitoria mínima (CIM) por el método de difusión en disco (82,83)

- Preparación de dilución del extracto a concentración conocida (4 $\mu$ g/ $\mu$ L).

- A continuación se procedió a realizar diluciones para lograr concentraciones de 2, 1 y 0.5 $\mu$ g/ $\mu$ L del extracto.

- Se filtraron cada una de las soluciones de los extractos con filtros estériles de 0.20 $\mu$ m.

- Impregnación de discos de difusión.

- Se impregnaron discos estériles con 50 $\mu$ L de cada dilución de los extractos: 2, 1 y 0.5 $\mu$ g/ $\mu$ L equivalentes a 100, 50 y 25 $\mu$ g de extracto por disco seco respectivamente (se impregnaron 10 $\mu$ L cada 30 minutos, para evitar sobresaturación del disco y favorecer la evaporación del disolvente), y para el aceite esencial se realizaron impregnaciones de discos con 6 y 3 $\mu$ L de aceite esencial sin dilución.

- Interpretación de resultados:

Negativo: ausencia de halo de inhibición, diámetro de 6mm.

Positivo: presencia de halo de inhibición, diámetro mayor o igual a 7mm.

## F. Diseño estadístico

### 1. Tipo de estudio

Estudio experimental, diseño de bloques incompletos (el orden de colocación de los discos fue al azar en número parcial). La determinación de la actividad inhibitoria *in vitro* de los extractos vegetales y aceites esenciales sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* fue realizado por el método de difusión en disco.

Se consideró actividad inhibitoria a la formación de un halo de inhibición alrededor del disco impregnado con un diámetro mayor o igual de 7mm. Se realizaron 5 repeticiones para cada extracto y aceite esencial, para un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ , de acuerdo a la tabla de la distribución binomial. De los extractos que resultaron positivos, se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM).

### 2. Variables

- a. Independiente: Extractos diclorometánicos, metanólicos y aceites esenciales de 12 especies condimentarias, alimenticias y medicinales de uso popular en Guatemala.
- b. Variable dependiente: Actividad inhibitoria contra *L. monocytogenes*.

### 3. Análisis estadístico

El análisis de los datos estuvo basado en una prueba de hipótesis binomial, donde  $H_0: p \leq 0.5$  (no tiene efecto inhibitorio) y  $H_a: p > 0.5$  (si tiene efecto inhibitorio). Si 5 repeticiones dan éxito,  $H_0$  se rechazará para el nivel  $\alpha$  establecido, y se dirá que los extractos y aceites esenciales evaluados por el método de difusión de disco presentan actividad inhibitoria *in vitro* significativa frente a *L. monocytogenes* con un valor  $p = 0.0312$ .



## IX. RESULTADOS

En el presente trabajo se colectaron doce plantas de siete familias, las cuales son utilizadas por sus propiedades medicinales (la mayoría) y condimentarias; las cuales fueron recolectadas en áreas de cultivo controlado, con el fin de tener reproducibilidad en los resultados (Tabla 1).

**Tabla 1. Información general de las plantas del estudio**

Familia	Material Vegetal	No. De herbario	Lugar de colecta	Georeferencia	Altura msnm**	Propiedades
Apiaceae	<i>Eryngium foetidum</i>	1110 <sup>a</sup>	Ecoparcela El Kakawatal Samayac Suchitepéquez	N14° 33'05.8" W91° 27'59.6"	465	Condimento Medicinal
Asteraceae	<i>Tagetes lucida</i>	1127 <sup>a</sup>	Cuatro Caminos San Cristóbal Totonicapán	N14°55'05.70" W91°26'31.64"	2400	Medicinal
Lamiaceae	<i>Ocimum micranthum</i>	1064 <sup>a</sup>	Ecoparcela El Kakawatal Samayac Suchitepéquez	N14° 33'06.1" W91° 28'01.0"	465	Condimento Medicinal
Lauraceae	<i>Litsea guatemalensis</i>	1094 <sup>a</sup>	San Bartolomé Milpas Altas, Sacatepéquez	N14° 36'35.0" W90°40'22.4"	1941	Condimento Medicinal
Myrtaceae	<i>Pimenta dioica</i>	1171 <sup>a</sup>	Salamá, Baja Verapaz	N 14°33'7.9" W 91°28'2.6"	471	Condimento Medicinal
Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i>	1169 <sup>a</sup>	Ecoparcela El Kakawatal Samayac Suchitepéquez	N14° 36' 7.14" W91° 28' 2.22"	468	Medicinal
Piperaceae	<i>Piper auritum</i>	1170 <sup>a</sup>	Ecoparcela El Kakawatal Samayac Suchitepéquez	N14° 33'6.8" W91° 28'0.7"	470	Medicinal
Piperaceae	<i>Piper jacquemontianum</i>	1098 <sup>a</sup>	Ecoparcela El Kakawatal Samayac Suchitepéquez	N14° 33'05.4" W91°27'57.2"	462	Medicinal
Verbenaceae	<i>Cornutia grandifolia</i>		San Juan Chamelco Alta Verapaz	N15°25'26.05" W90°19'41.23"		Medicinal
Verbenaceae	<i>Lippia alba</i>	1131*	CEDA Facultad de Agronomía, USAC	N14° 34.811' W90° 33.220'	1465	Medicinal
Verbenaceae	<i>Lippia chiapasensis</i>	43411*	Paraje Juchanep Totonicapán	N14° 56.106' W91° 22.259'	2570	Medicinal
Verbenaceae	<i>Lippia graveolens</i>	1132*	CEDA Facultad de Agronomía, USAC	N14° 34.811' W90° 33.220'	1465	Condimento Medicinal

<sup>a</sup> Número de herbario: Herbario de Biología Guatemala (BIGU) de la Escuela de Biología, Facultad de CCCQQ y Farmacia, USAC.

<sup>b</sup> Número de herbario: Herbario de Farmaya, S.A.

\*\* msnm: metros sobre el nivel del mar

En la Tabla 2 se muestran los porcentajes de rendimiento de extractos diclorometánicos y metanólicos obtenidos mediante extracción fraccionada por percolación y concentración en rotaevaporador; y los aceites esenciales

obtenidos por hidrodestilación en Neoclevenger, de las plantas en estudio. En el caso de los extractos diclorometánicos, el mejor porcentaje de rendimiento fue obtenido con las hojas de *P. auritum* (20.4%), para los extractos metanólicos el mayor porcentaje de rendimiento fue extraído de la hoja de *L. chiapasensis* (15.9%), y para los aceites esenciales la hoja de *L. graveolens* proporcionó el mayor porcentaje de rendimiento (3.08%).

Las hojas de *C. grandifolia* y *E. foetidum*, proporcionaron un porcentaje de rendimiento tan bajo que fue imposible obtener suficiente cantidad por el método especificado, por lo tanto no se utilizaron para el bioensayo.

**Tabla 2. Porcentajes de rendimiento de extractos diclorometánicos y metanólicos y aceites esenciales obtenidos.**

Planta	Parte	% Rendimiento extracto en diclorometano	% Rendimiento Extracto en metanol	% de Rendimiento de aceites esenciales
<i>C. grandifolia</i>	Hoja	2.0	2.3	*NSO
<i>E. foetidum</i>	Hoja	3.0	12.6	*NSO
<i>L. alba</i>	Hoja	9.9	6.4	0.82 ± 0.05
<i>L. chiapasensis</i>	Hoja	14.7	15.9	0.91 ± 0.17
<i>L. graveolens</i>	Hoja	10.3	11.3	3.08 ± 0.11
<i>L. guatemalensis</i>	Hoja	8.9	10.8	0.85 ± 0.16
<i>O. micranthum</i>	Hoja	5.9	6.5	1.42 ± 0.11
<i>P. dioica</i>	Fruto	2.8	9.6	0.97 ± 0.42
<i>P. auritum</i>	Hoja	20.4	13.4	1.10 ± 0.23
<i>P. Jacquemontianum</i>	Hoja	7.4	6.6	0.44 ± 0.08
<i>P. guajava</i>	Hoja	4.7	13.5	0.20 ± 0.08
<i>T. lucida</i>	Parte aérea	3.8	14.3	0.26 ± 0.05

Fuente: Datos Experimentales.

\*NSO: No se obtuvo

Para evaluar la actividad biocida los extractos diclorometánicos y metanólicos contra las tres cepas de *Listeria* sp, se impregnaron 200µg de extracto en cada disco. Únicamente los extractos de diclorometano procedentes de la parte aérea de *T. lucida* y las hojas de *E. foetidum* presentaron actividad inhibitoria, como se observa en la Tabla 3. *T. lucida* presentó actividad antibacteriana (p=0.0312)

contra las tres cepas del estudio, mientras que *E. foetidum* mostró actividad solamente contra *L. monocytogenes* ATCC® 19115 y *L. innocua* ATCC® 700402.

**Tabla 3. Tamizaje de la actividad de los extractos diclorometánicos y metanólicos contra *Listeria* sp.**

Plantas	Extractos Diclorometánicos			Extractos Metanólicos		
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC® 19115	<i>L. monocytogenes</i> HRO 634	<i>L. innocua</i> ATCC® 700402	<i>L. monocytogenes</i> ATCC® 19115	<i>L. monocytogenes</i> HRO 634	<i>L. innocua</i> ATCC® 700402
<i>C. grandifolia</i>	-	-	-	-	-	-
<i>E. foetidum</i>	+	-	+	-	-	-
<i>L. alba</i>	-	-	-	-	-	-
<i>L. chiapasensis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>L. graveolens</i>	-	-	-	-	-	-
<i>L. guatemalensis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>O. micranthum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. dioica</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. auritum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. jacquemontianum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. guajava</i>	-	-	-	-	-	-
<i>T. lucida</i>	+	+	+	-	-	-

Fuente: Datos Experimentales. Evaluaciones por quintuplicado.

(+) = Actividad Inhibitoria, actividad significativa (p = 0.0312) con 200µg

(-) = Sin Actividad Inhibitoria con 200µg

En el caso de los aceites esenciales, los discos fueron impregnados con 10µL de aceite, para evaluar la actividad biocida contra las tres cepas (Tabla 4); los resultados obtenidos indican que *L. alba*, *L. graveolens* y *P. dioica* mostraron actividad antibacteriana contra las tres cepas del estudio.

**Tabla 4. Tamizaje de la actividad de aceites esenciales contra *Listeria* sp.**

Plantas	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>
	ATCC® 19115	HRO 634	ATCC® 700402
<i>L. alba</i>	+	+	+
<i>L. chiapasensis</i>	-	-	-
<i>L. graveolens</i>	+	+	+
<i>L. guatemalensis</i>	-	-	-
<i>O. micranthum</i>	-	-	-
<i>P. dioica</i>	+	+	+
<i>P. auritum</i>	-	-	-
<i>P. Jacquemontianum</i>	-	-	-
<i>P. guajava</i>	-	-	-
<i>T. lucida</i>	-	-	-

Fuente: Datos experimentales. Evaluación por quintuplicado.

(+) = Actividad Inhibitoria, actividad significativa (p = 0.0312) con 10µL

(-) = Sin Actividad Inhibitoria con 10µL

Se determinó la CIM de los extractos con actividad inhibitoria (*E. foetidum* y *T. lucida*) contra las cepas del estudio, observando que para las concentraciones de 100, 50 y 25µg. Los extractos no presentaron actividad inhibitoria en ninguna de las cepas, tal como se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5. Concentración inhibitoria mínima de extractos diclorometánicos que presentaron actividad en la fase del tamizaje**

Cepas	<i>E. foetidum</i>				<i>T. lucida</i>			
	200µg	100µg	50µg	25µg	200µg	100µg	50µg	25µg
<i>L. monocytogenes</i> ATCC® 19115	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> HRO 634	-	N/A	N/A	N/A	+	-	-	-
<i>L. innocua</i> ATCC® 700402	+	-	-	-	+	-	-	-

Fuente: Datos experimentales. Evaluado por quintuplicado.

(+) = Actividad Inhibitoria, actividad significativa (p = 0.0312)

(-) = Sin Actividad Inhibitoria

N/A = No Aplica

En el caso de los aceites (Tabla 6) *L. graveolens* presentó actividad antibacteriana contra las tres cepas del estudio a una concentración de 6µL; *L.*

*alba* y *P. dioica* presentaron actividad solamente contra *L. monocytogenes* ATCC® 19115 y *L. innocua* ATCC® 700402 a esta misma concentración. Sin embargo al utilizar 3µL de aceite esencial, ninguna de las tres cepas fue inhibida.

**Tabla 6. Concentración inhibitoria mínima de aceites esenciales que presentaron actividad en la fase del tamizaje**

Cepas	<i>L. alba</i>			<i>L. graveolens</i>			<i>P. dioica</i>		
	10µl	6µl	3µl	10µl	6µl	3µl	10µl	6µl	3µl
<i>L. monocytogenes</i> ATCC® 19115	+	+	-	+	+	-	+	+	-
<i>L. monocytogenes</i> HRO 634	+	-	-	+	+	-	+	-	-
<i>L. innocua</i> ATCC® 700402	+	+	-	+	+	-	+	+	-

Fuente: Datos experimentales. Evaluado por quintuplicado.

(+) = Actividad Inhibitoria, actividad significativa (p = 0.0312)

(-) = Sin Actividad Inhibitoria

## X. DISCUSIÓN

En los últimos años, los extractos vegetales se han hecho de suma importancia en la medida que se buscan nuevas alternativas para evitar la contaminación alimentaria por diferentes bacterias, entre ellas, *Listeria* sp. Es así como el presente estudio tuvo como objetivo principal determinar la actividad inhibitoria *in vitro* de extractos (diclorometánicos y metanólicos) y aceites esenciales de doce especies condimentaras y medicinales guatemaltecas contra especies del género *Listeria*.

Las plantas del estudio fueron elegidas por ser especies utilizadas como condimentos en alimentos o en la medicina tradicional guatemalteca; además que no había sido investigado previamente su uso como antibacterianos para las especies de *Listeria*. Estas plantas son de fácil obtención en Guatemala y su fuerte aroma es indicador de la presencia de aceite esencial, cuyo contenido es de interés, ya que éstos son los más estudiados como antibacterianos y es más fácil de incorporar en la conservación de alimentos (28-33). Las plantas seleccionadas corresponde a doce especies pertenecientes a siete familias: Apiaceae (*E. foetidum*), Astereaceae (*T. lucida*), Lamiaceae (*Ocimum micranthum*), Lauraceae (*Litsea guatemalensis*), Myrtaceae (*Pimenta dioica* y *Psidium guajava*), Piperaceae (*Piper auritum* y *Piper jacquemontianum*) y Verbenaceae (*Cornutia grandifolia*, *L. alba*, *Lippia chiapasensis* y *L. graveolens*). El órgano de elección fue la hoja excepto para *T. lucida* que se evaluó la parte aérea y en el caso de *P. dioica* el fruto (Tabla 1).

A cada especie vegetal del estudio, se les determinó su porcentaje de rendimiento en disolvente apolar (diclorometano) y disolvente polar (metanol). En el caso de los extractos diclorometánicos, el mejor porcentaje de rendimiento fue obtenido con las hojas de *P. auritum* 20.4%, para los extractos metanólicos el mayor porcentaje de rendimiento fue extraído de la hoja de *L. chiapasensis* 15.9% (Tabla 2). Es importante considerar el porcentaje de rendimiento de un

extracto debido a que en la evaluación de las diversas actividades biocidas, un buen rendimiento del extracto generalmente garantiza una mayor rentabilidad comercial (83). Al obtener un tamaño de partícula homogéneo se favorece la unión de las células vegetales con el disolvente ya que existe una mayor superficie de contacto entre éste y el material vegetal, aumentando así el porcentaje de rendimiento obtenido, por lo que el tamizaje de las plantas utilizadas en este estudio se procuró fuese de tamaño homogéneo (84).

Debido a la diferencia en la membrana celular y las interacciones de los componentes de los extractos y los aceites esenciales, las bacterias Gram positivo tienden a presentar mayor susceptibilidad, como es el caso de las bacterias del género *Listeria* (85,86). Es posible que algunos compuestos fenólicos presentes en los extractos y aceites, por su naturaleza parcialmente hidrofóbica, permitan su acumulación y adherencia en la membrana citoplasmática de la bacteria, interacción que favorecería la permeabilidad de la membrana permitiendo fugas del contenido celular y la entrada de los compuestos químicos presentes en los extractos y/o aceites, los cuales entrarían en contacto con sitios intracelulares alterando estructuras proteínicas y causando la muerte celular (87,88); sin embargo, la eficacia inhibitoria de los compuestos vegetales depende de sus propiedades lipofílicas, potencia de sus grupos funcionales y solubilidad en solución acuosa (84).

Al enfrentar las plantas del estudio contra las tres cepas, se obtuvo actividad inhibitoria positiva ( $p=0.0320$ ) a una concentración de  $200\mu\text{g}$  del extracto diclorometánico de la parte aérea de *T. lucida* contra las tres cepas del estudio, mientras que el extracto diclorometánico de las hojas *E. foetidum* mostró actividad solamente contra *L. monocytogenes* ATCC® 19115 y *L. innocua* ATCC® 700402 (Tabla 3). En el caso de los aceites esenciales a una concentración de  $6\mu\text{L}$ , la hoja de *L. graveolens* demostró actividad inhibitoria positiva ( $p=0.0320$ ) contra las tres cepas de estudio, mientras que la hoja de *L. alba* y el fruto de *P.*

*dioica* únicamente fue efectiva contra *L. monocytogenes* ATCC® 19115 y *L. innocua* ATCC® 700402 (Tabla 4).

A pesar que no hay actividad inhibitoria importante, sí se detecta una actividad moderada de *T. lucida* contra las tres cepas del estudio. En relación a *E. foetidum* que no presentó actividad antibacteriana contra *L. monocytogenes* HRO 634, esto se explica fácilmente debido a que ésta es una cepa que se encontraba en un ambiente nosocomial y que ha sido expuesta probablemente a períodos largos de tratamiento antibiótico produciendo cambios genéticos, influyendo así en la resistencia, en comparación *L. innocua* ATCC® 700402 la cual es considerada una bacteria no patógena para el ser humano y no ha sido expuesta previamente a antibióticos.

De los extractos que presentaron susceptibilidad (*E. foetidum* y *T. lucida*) al realizar el tamizaje, se probaron concentraciones seriadas de 100, 50 y 25µg para determinar la CIM. En ninguna de las concentraciones anteriores se observó inhibición por parte de la bacteria, por lo cual, en los extractos la CIM fue de 200µg (Tabla 5); en el caso de los aceites (*L. alba*, *L. graveolens* y *P. dioica*), se probaron concentraciones de 6 y 3µL. *L. graveolens* mostró actividad antibacteriana a una concentración de 6µL contra las tres cepas en estudio, no así *L. alba* y *P. dioica* que solo mostraron actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* ATCC® 19115 y *L. innocua* ATCC® 700402.

En el presente estudio no se buscó identificar los compuestos responsables de la actividad antibacteriana. Sin embargo, es de interés señalar las moléculas a las que podría atribuírsele tal inhibición, pues previamente han sido identificadas y relacionadas a actividad antibacteriana y se encuentran en las cinco plantas cuyo extracto diclorometánico o aceite esencial inhibió a las cepas del estudio.

En el caso de las plantas cuyo extracto diclorometánico tuvo actividad positiva, *T. lucida* contiene  $\alpha$ -tertienilo y herniarina (7-metoxicumarina), compuestos que



han sido identificados como los que le confieren actividad antibacteriana a esta planta (88,89). *E. foetidum* tiene como compuesto principal el E-2-dodecenal, al cual se le ha encontrado actividad bactericida (91).

En el caso de los aceites esenciales, las plantas del género *Lippia* (*L. alba* y *L. graveolens*) contienen timol y carvacrol, ambas moléculas conocidas por su potente actividad antibacteriana, incluyendo ensayos con bacterias del género *Listeria* (29,87,92). El aceite esencial de *P. dioica* por su parte, contiene eugenol en abundancia, el cual también es reconocido por su actividad antibacteriana, incluyendo ensayos con *L. monocytogenes* (30). Los tres aceites con actividad positiva contienen además limoneno, linalol y  $\alpha$ -pineno, lo cual podría indicar que alguno de estos compuestos también juega un papel en la inhibición de las bacterias.

Para fines de estudio se puede utilizar el extracto diclorometánico de *T. lucida* y *E. foetidum* y los aceites esenciales de *L. graveolens*, *L. alba* y *P. dioica*, los cuales pueden ser incorporados o utilizados como condimento en alimentos para evitar su contaminación y disminuir el riesgo de infección en el ser humano.

## XI. CONCLUSIONES

- De *L. chiapasensis* y *P. auritum* se obtuvieron los mejores porcentajes de rendimiento en los extractos diclorometánicos y metanólicos.
- El extracto diclorometánico de la parte aérea de *T. lucida* posee actividad contra las tres cepas del estudio con una concentración de 200µg, y el extracto diclorometánico de la hoja de *E. foetidum* presenta actividad antibacteriana para *L. monocytogenes* ATCC® 19115 y *L. innocua* ATCC® 700402 a esta misma concentración. Los extractos obtenidos por medio de metanol no presentaron ninguna actividad antimicrobiana contra las tres cepas del estudio.
- Las concentraciones inhibitorias mínimas encontradas para los extractos diclorometánicos de *T. lucida* y *E. foetidum* fueron de 200µg. El aceite esencial de *L. graveolens* posee actividad antibacteriana contra las tres cepas del estudio a una concentración inhibitoria mínima de 6µL; los aceites esenciales de *L. alba* y *P. dioica* solamente presentaron actividad antibacteriana frente a *L. monocytogenes* ATCC® 19115 y *L. innocua* ATCC® 700402 a una concentración de 6µL.

## **XII. RECOMENDACIONES**

- Evaluar los extractos y aceites que tuvieron actividad con la técnica de microdilución en placa para comparar con el método de difusión en disco.
- Identificar los diferentes compuestos de los extractos y aceites esenciales encargados de la inhibición de *Listeria* sp. mediante técnicas de fraccionamiento bioguiado.
- Hacer ensayos en alimentos utilizando las plantas del estudio que presentaron actividad para investigarlas como preservantes.

### XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Draughon FA. Bioconservadores botánicos en alimentos. Mundo láctico y cárnico. Agosto 2006. 18p.
2. Herrera FC., García-Rico RO. Evaluación in vitro del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario. Bistua 2006; 4:13-19.
3. WHO. 2002. Food safety and foodborne illness. Geneva, Switzerland: World Health Organization fact sheet 237.
4. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. Intern J Food Microbiol 2004; 94:223-253.
5. Hammer Ka, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J Applied Microbiol 1999; 86:985-990.
6. Muller G. Especies y condimentos en microbiología de los alimentos vegetales. 3a. ed. España: Editorial Acribia, 1989. (p. 150-153).
7. Mandigan M. et al. Brock: Microbiología de los microorganismos. 10a. ed. Madrid. Pearson Educación, 2004. p. 1096
8. JAY JM. Microbiología moderna de los alimentos. 2000. 4a. ed. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza. 457-480.
9. Trepati M. Incidencia y comportamiento de *Salmonella* sp. y *Listeria* sp. en pechugas de pavo curadas. España: Universidad Autónoma de Barcelona (tesis de graduación doctoral, Facultad de Veterinaria) 2002.
10. Centurión M., Takajara M. Determinación de la incidencia de *Listeria monocytogenes* en pollos frescos y verduras frescas obtenidos en mercados y centros de abastecimiento de Lima Metropolitana. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima (tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico, Facultad de Farmacia y Bioquímica) 2004.
11. SCHOBITZ, et al. Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda y quesos frescos artesanales. Agro sur, 2001;29:114-119.
12. Rocourt J., Bille J. Foodborne listeriosis. World Health Stat. 1997;67-73.

13. Swaminathan B. *Listeria monocytogenes*. en: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 1995. 2a Ed. Edit. ASM Press, Washington, DC, EE.UU., 383-409.
14. Capita R. et al. *Listeria monocytogenes* y carne de pollo. Aliment Equ y Tecno 2000;3(19):73-80.
15. Ramos I. Aislamiento e Identificación de *Listeria sp.* en productos hidrobiológicos frescos y procesados en nuestro litoral. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Informe de prácticas Pre-profesionales para optar el Título profesional de Biólogo con mención en Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas) 1991.
16. Winn, W. et al. Koneman's color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6.ed. United States: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. xxxi+1535 p.+color plate 23-2+color plate A-3+I-30.
17. Gini G. Manual de Procedimientos para la Identificación de las Bacterias con Importancia Clínica. 3ra. Ed. Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala. 2007. 217 páginas. 67-68.
18. Macedo M., Vola M. Principales grupos de bacilos Gram positivo aerobios. En: Temas de bacteriología y virología médica. 2a. ed. Editorial FEFMUR, Universidad de la República, Instituto de Higiene, Capítulo 20.
19. Seeliger H., Jones D. Genus *Listeria* Pire 1940. Baltimore, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1986;2(8):1235-1245.
20. Virella G. Microbiology and Infectious Diseases; Nacional Medical Series for Independent Study. 3a. ed. Estados Unidos: Williams & Wilkins. 1997. xxi+575p. (p.116-118)
21. Curtis G., Lee W. Culture media and methods for the isolation of *Listeria monocytogenes*. Internat J.Food Microbiol 1995;26:1-13
22. Lessing M., Curtis G., Bowler I. *Listeria. ivanovii* infection (letter). J Infect 1994;29:230-231
23. Mandell GL., Bennett JE., Dolin R. Enfermedades Infecciosas; Principios y Práctica. 5.ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana. Vols, 2, 2002, XXXII+3941p.+I112

24. Comi G, Frigerio R. *Listeria monocytogenes* serotypes in Italian meat products. 1992. Letters in Applied Microbiology. 15, 168-171.
25. Estrada O. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en Leche cruda obtenida en establos del departamento de Lima. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima (tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica) 2004.
26. Laciari A., Vaca L., De Centorbi O. *Listeria* spp., en alimentos de origen animal. Rev Argent Microbiol. 1999;31: 25-30.
27. Palavecino E, Recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards para el estudio de susceptibilidad de microorganismos fastidiosos y en microorganismos que presentan mecanismos de defensa resistencia difíciles de detectar. Rev Chil Infect 2002;19:129-134.
28. Apostolidis E., Kwon Y, Shetty K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by oregano, cranberry and sodium lactate combination in broth and cooked ground beef systems and likely mode of action through proline metabolism. Internat. J. of Food Microbiol. 2008;128:317-324
29. Lin YT., Labbe RG., Shetty K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat systems by use of oregano and cranberry phytochemical synergies. Appl. Environ. Microbiol. 2004;70:5672-5678
30. Gill AO., Holley RA. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of Eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. Appl. Environ. Microbiol. 2004;70:5750-5755
31. Nedorostova L. et al. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. Food Control 2009;20:157-160
32. Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods- A review. Intern. J. Food Microbiol. 2004;94:223-253
33. Sacchetti G. et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. Food Chemistry 2005;91: 621-632

34. Comisión del Codex Alimentarius, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Propuesta para la elaboración de una norma regional para el culantro coyote, septiembre 2008. 6pp.
35. Ramcharan C. "Culantro: A much utilized, little understood herb" perspectives on new crops and new uses. ASHS Press. 1999. 506-509pp.
36. Dieseldorff IP. Las plantas medicinales del departamento de Alta Verapaz. Tipografía Nacional, Guatemala.
37. Gibson DN. *Verbenaceae*. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany 24(9): 196-197, 1970.
38. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Centro de Estudios Conservacionistas CECON. Plantas comestibles y tóxicas de Guatemala. 2.ed. Guatemala: Universidad de San Carlos, 1984.
39. Gibson DN. Flora of Guatemala, Fieldiana Botany. 1970;24 (9):208
40. García H. Plantas Medicinales de Colombia. Santa Fe de Bogotá: Imprenta Nacional. Tomo III. 1975. 506-507pp
41. Pascual ME., et al. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. J. Ethnopharmacolo. 2001;76:201-214
42. Stashenko EE., Jaramillo BE., Martínez JR. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of Lippia alba (Mill) N.E. Brown, grown in Colombia, and Evaluation of its in vitro antioxidant activity. J. Chromatography A. 2004;1025:93-103
43. Pascual ME., et al. Antiulcerogenic activity of Lippia alba (Mill) N.E. Brown (Verbenaceae). Il Farmaco 2001;56:501-504
44. Hernández-Arteseros JA. et al. Composition of the Essential Oil of Lippia chiapasensis Loes. J. Essent. Oil Res. 2006;18:6-9.
45. Jayes, PG., et al. Estudio del aceite esencial y metabolitos secundarios de diferentes poblaciones de Lippia chiapasensis Loes. (Verbenaceae). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (Proyecto, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2008. 25p.
46. Martínez JV., Bernal Y., Cáceres A. Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas. Santa Fe de Bogotá: Convenio Andrés

- Bello (CAB) y Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). 2000. 536p.
47. Cáceres A., Girón L., Freire V. Plantas de uso medicinal en Guatemala I. Detección Etnobotánica y Bibliográfica. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. 1990;9:55-77
  48. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria (USAC). 1996. 287-289p.
  49. Dabroy LP. Confirmación de la actividad antibacteriana de algunas especies del género *Lippia* contra bacterias que causan enfermedades respiratorias. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1994. 44p.
  50. Mendoza JC. Confirmación de la actividad de tres especies del género *Lippia*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1995. 46p.
  51. Cáceres A., et al. Guatemala: VI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina. 1997. 15p.
  52. Cáceres A. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria, 1996. 402p.
  53. Germosén L. Farmacopea Vegetal Caribeña. 2a. ed. León, México: Editorial Universitaria UNAN-León, 2005. 486p. 336-337p.
  54. Aguilar, JM. Árboles de la Biósfera Maya Petén; Guía para las especies del Parque Nacional Tikal. Guatemala, 1992. 272p. 181p.
  55. Asociación Bioltas. Plantas Medicinales Utilizadas por los Itzaes San José Petén. Guatemala, 2001. 118p. 75p.
  56. Méndez LF. et al. Guauhitemala Lugar de Bosques. Guatemala: Asociación Becaria Guatemalteca-UWC. Vol. V, 1996. 172p.
  57. Aguilar A. et al. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social Información Etnobotánica. México: Redacta S. A., 1994. 253 p.
  58. Rodríguez H. La Utilidad de las Plantas Medicinales en Costa Rica. Costa Rica: Universidad Nacional EUNA, 2006. 213p. 38p



59. Vélez F., de Vélez G. Plantas Alimenticias de Venezuela. Venezuela: Fundación Brigott, Sociedad de Ciencias Naturales, La Salle, 1990. 277p.
60. Argueta A. Atlas de Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana II. México D.F: Instituto Nacional Indigenista, 1994.1154p.
61. Cohobón EJ. Actividad anti-*Neisseria gonorrhoeae* in Vitro de Agave Americana. Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1991. 75pp.
62. Vázquez TC. Estudio Farmacológico de la Actividad Analgésica de infusiones de las hojas de *Solanum nigrescens* (Macuy), *Piper auritum* (Santa María) y *Tridax procumbens* (Hierba Toro) utilizadas popularmente en Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1997. 84pp.
63. Cleaves C. Etnobotánica Participativa en 7 comunidades de la zona de influencia del parque Nacional Laguna Lachúa, Cobán, Alta Verapaz. Guatemala. (tesis ad gradum, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC) 2001. 179pp.
64. Lot A. Y Chieng F. Manual del Herbario. Consejo Nacional de la Flora de México. México. 1986. 142 p.
65. Cruz S. 2005. Caracterización de aceites esenciales y evaluación de la actividad biocida de 5 especies nativas de Piperaceas. Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de maestría MUPLAM). 51-52p..
66. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México, 1994.
67. Geo D. Ruehle. The common guajava, a neglected fruit with a promising futura. Economic Botany. 1948.
68. Martínez MJ. Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajaba* L. (Guayaba). Rev Cubana de Plant Med 1997; 2(1): 12-14
69. Nash DL, Williams LO. Flora of Guatemala. Field Mus. Nat. Hist. Chicago 1976;12(24):382-384
70. Girón LM, Freire V, Cáceres A, Alonzo A. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the caribs of Guatemala. J. Ethnopharmacol 1991;34:173-187
71. Morton JF. Atlas of Medicinal Plants of Middle America. Springfield: 1981.

72. Browner CH. Plant used for reproductive health in Oaxaca, México. *Econ Bot* 1985;39(4):482-504
73. Martínez M. Las plantas medicinales de México. México: Botas, 1969. 248-249p.
74. Orellana SL. Indian medicine in highland Guatemala. Albuquerque: University of New Mexico Press, 1987. 244-245p.
75. Figueroa H. Enfermedades de los conquistadores. Guatemala: Editorial Universitaria, 1983 115-116p.
76. Cáceres A. et al. Plant used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders, screening of 84 plant against enterobacteria. *J. Ethnopharmacol.* 1990;30:53-73
77. Cáceres A. et al. Actividad contra *Vibrio cholerae* de 5 plantas americanas usadas en el tratamiento de infecciones. Guatemala: Memorias IV Congreso Nacional de Microbiología, Guatemala.
78. Héthelyi E., Dános B., Tetényi P. GC/MS Analysis of essential of some Tagetes species. In: Brunke, EJ. Progress in essential oil research. Berlin, Walter de Gruyter. (p.131-137)
79. Rodríguez E, Mabry T. Tagetes sp. chemical review. *Biol. Chem. Compos.* London, Taylor & Francis. 1975, 314p.
80. Manual de Operaciones Laboratorio de Investigación de Productos Naturales. PEO extracción fraccionada, PEO concentración usando rotavapor, PEO extracción de aceites esenciales por Neoclevenger. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC. 2005. 1-3
81. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Sixteenth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute M100-S16. 2006
82. Donaldson J. et al. Assessment of Antimicrobial Activity of fourteen Essential Oils when using Dilution and Diffusion Methods. *Pharmaceutical Biology*, 2005;43:687-695
83. Alvarado CF. Búsqueda de actividad contra *Campylobacter jejuni* en cinco plantas de uso popular guatemalteco. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2007. 49p.

84. Solís PN, *et al.* Manual de Caracterización y Análisis de Drogas Vegetales y Productos Fitoterapéuticos. Proyecto Desarrollo de Tecnología de Cultivo de Plantas Medicinales y Producción de Fitoterápicos (OEA/AICD/AE 089/03). 2005. pp. 43-65.
85. Chifé, C. Garantía y control de calidad de materias primas vegetales para fines farmacéuticos. *Rev. LabCiencia* 2005;4:6-8, 24-26.
86. Lopez P. *et al.* Solid-and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *J of Agricultural and Food Chemistry* 2005;53:6939-6946.
87. Gutiérrez J., Barry-Ryan C., Bourke P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology* 2008;xxx:1-9
88. Liolios CC. *et al.* Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity. *Food Chemistry* 2009;112:77-89
89. Paparella A. *et al.* Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 2008;19:1174-1182
90. Flores WC. Evaluación de la estabilidad acelerada de una tintura vegetal comercializada con propiedad antibacteriana, preparada a partir de *Gnaphalium stramineum* (flores), *Plantago major* L. (hojas), *Psidium guajava* L. (hojas) y *Tagetes lucida* Cav. (hojas y flores), en solución alcohólica al 35%. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (tesis para optar al título de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2008.
91. De la Cruz BC. Caracterización de cinco extractos de plantas medicinales nativas de Guatemala, validadas científicamente. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (tesis para optar al título de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2005.
92. González-Palomares S., Rivera-Cambero LH. y Rosales-Reyes T. Análisis de compuestos volátiles en cilantro (*Coriandrum sativum* L.) *Acta Universitaria* 2010;20:19-24

93. Arcila-Lozano CC. et al El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. ALAN 2004;54:100-111

#### XIV. ANEXOS

##### Plantas del estudio

Figura 1. *Eryngium foetidum* L. (cilantro)



Figura 2: *Cornutia grandifolia* (Schlecht & Cham) Schauer (jorobté)



Figura 3: *Lippia alba* (Miller) (juanilamia)



Figura 4: *Lippia graveolens* HBK (Humbolt, Bonpland & Kuntn) (óregano)



Figura 5: *Ocimum micranthum* Willd (albahaca)



Figura 6: *Pimenta dioica* L. Merrill (pimienta gorda)





Figura 7: *Piper auritum* HBK (Santa María)



[Figura 8:](#) *Piper jacquemontianum* Kunth (cordoncillo)





Figura 9: *Psidium guajava* L. (guayaba)



Figura 10: *Tagetes lucida* Cav. (pericón)

