

Universidad de San Carlos de Guatemala  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

**ACTIVIDAD BIOCIDA DE HOJAS DE**  
***Cornutia grandifolia* Shauer in DC**

Keila Mariana Guerrero Gutiérrez

Maestría en Producción y Uso de Plantas  
Medicinales  
MUPLAM

Guatemala, noviembre de 2009

Universidad de San Carlos de Guatemala  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

**ACTIVIDAD BIOCIDA DE HOJAS DE**  
***Cornutia grandifolia* Shauer in DC**

Informe final

Presentado por

Keila Mariana Guerrero Gutiérrez

Maestría en Producción y Uso de Plantas

Medicinales

MUPLAM

Guatemala, noviembre de 2009

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

**JUNTA DIRECTIVA**

<b>ÓSCAR MANUEL CÓBAR PINTO, PH.D</b>	<b>DECANO</b>
<b>LIC. PABLO ERNESTO OLIVA SOTO</b>	<b>SECRETARIO</b>
<b>LICDA. LILLIAN RAQUEL IRVING ANTILLÓN, M.A.</b>	<b>VOCAL I</b>
<b>LICDA. LILIANA VIDES DE URÍZAR</b>	<b>VOCAL II</b>
<b>LIC. LUIS ANTONIO GÁLVEZ SANCHINELLI</b>	<b>VOCAL III</b>
<b>BR. MARÍA ESTUARDO GUERRA VALLE</b>	<b>VOCAL IV</b>
<b>BR. BERTA ALEJANDRA MORALES MÉRIDA</b>	<b>VOCAL V</b>

**CONSEJO ACADÉMICO  
ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**DR. OSCAR MANUEL COBAR PINTO, PH.D. DECANO**  
**LICDA. ANNE MARIE LIERE DE GODOY, MSc.**  
**DR. JORGE LUIOS DE LEÓN ARANA**  
**DR. JORGE EDWIN LÓPEZ GUTIÉRREZ**  
**LIC. FELIX RICARDO VELIZ FUENTES, MSc.**

*A mis padres, hermanos y amigos con mucho amor.*

---

## INDICE

<b>1.</b>	Resumen	1
<b>2.</b>	Introducción	2
<b>3.</b>	Definición del problema	3
<b>4.</b>	Justificación	4
<b>5.</b>	Marco teórico	
<b>5.1.</b>	Determinación de la actividad biocida <i>in silico</i>	5
5.1.1.	Prueba de difusión por disco	5
5.1.2.	Método de dilución en agar	5
5.1.3.	Macrodilución en caldo	5
5.1.4.	Microdilución	6
<b>5.2.</b>	Actividad biocida de la familia Verbenaceae	6
<b>5.3.</b>	<i>Cornutia</i> sp.	
5.3.1.	<i>Cornutia grandifolia</i> Shauer in DC.	7
5.3.2.	<i>Cornutia pyramidata</i> L.	8
<b>5.4.</b>	Fraccionamiento fitoquímico para análisis bioquímico	9
5.4.1.	Partición líquido-líquido	9
<b>6.</b>	Objetivos	
<b>6.1.</b>	General	10
<b>6.2.</b>	Específicos	10
<b>7.</b>	Hipótesis	11
<b>8.</b>	Áreas a investigar	12

<b>9. Materiales y métodos</b>	
<b>9.1. Universo y muestra</b>	13
9.1.1. Universo de trabajo	13
9.1.2. Muestra	13
<b>9.2. Recursos humanos</b>	13
9.2.1. Investigadora	13
9.2.2. Asesor	13
9.2.3. Revisora	13
<b>9.3. Recursos institucionales</b>	13
<b>9.4. Metodología</b>	13
9.4.1. Obtención de particiones líquido-líquido	13
9.4.2. Actividad citotóxica	14
9.4.3. Actividad antibacteriana y antilevadura <i>in silico</i>	14
9.4.4. Actividad antifúngica <i>in silico</i>	14
9.4.5. Concentración inhibitoria mínima	14
<b>9.5. Diseño estadístico</b>	
9.5.1. Tipo de estudio	15
9.5.2. Variables	15
9.5.3. Validez del método	15
<b>10. Resultados</b>	
<b>10.1.</b> Obtención de particiones líquido-líquido	16
<b>10.2.</b> Actividad citotóxica	17

<b>10.3.</b>	Actividad antibacteriana y antilevadura <i>in silico</i>	18
<b>10.4.</b>	Actividad antifúngica <i>in silico</i>	19
<b>10.5.</b>	Actividad biocida de las especies de <i>Cornutia</i> sp.	20
<b>11.</b>	Discusión de resultados	21
<b>12.</b>	Conclusiones	24
<b>13.</b>	Referencias	25
<b>14.</b>	Anexos	27
<b>14.1.</b>	Actividad citotóxica contra nauplios de <i>A. salina</i>	27
<b>14.2.</b>	Actividad antibacteriana y antilevadura <i>in silico</i>	28
<b>14.3.</b>	Actividad antifúngica <i>in silico</i>	29
<b>14.4.</b>	Concentración inhibitoria mínima	30

## 1. RESUMEN

*Cornutia grandifolia* Shauer in DC es una planta de la familia Verbenaceae utilizada popularmente en varias regiones de Guatemala para tratar infecciones de estómago y de garganta. En el presente estudio se evaluó la actividad que presentó el extracto etanólico de las hojas de esta planta y las particiones líquido-líquido (precipitado de la partición hexánica, hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y metanólica) obtenidas a partir del mismo contra nauplios de *Artemia salina*, bacterias y hongos utilizando la metodología de dilución en agar.

Se determinó que el extracto etanólico no tuvo actividad citotóxica contra los nauplios a 24 horas de incubación utilizando una concentración de 1 mg/mL. Al obtener las fracciones, el mejor porcentaje de rendimiento fue la primera fracción, la cual fue un precipitado formado al agregar el hexano (33.94%) con una actividad inhibitoria contra *Escherichia coli* a 1 mg/mL. El menor porcentaje (2.125%) fue con la fracción de acetato de etilo. Sin embargo, esta fue la fracción que presentó la mayor actividad antibacteriana, específicamente contra *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis* y *Bacillus subtilis* a una concentración de 0.5 mg/mL ( $p < 0.05$ ).

Ninguna fracción tuvo actividad contra los hongos filamentosos *Aspergillus flavus*, *A. niger* y *A. fumigatus* a una concentración de 1 mg/mL.

Al realizar una revisión y comparar los resultados de este estudio con otro publicado por Molina en el 2005, en el cual se evaluaron los mismos parámetros pero con extracto de hojas de *C. pyramidata*, se encontraron diferencias bioactivas entre las especies.

## 2. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la medicina alternativa ha ocupado un espacio importante dentro de la sociedad, especialmente con el uso de plantas medicinales para el tratamiento de varias afecciones del organismo. Esto va de la mano con el hecho que la medicina tradicional guatemalteca es un recurso invaluable que se posee desde nuestros antepasados y ha sido parte del patrimonio cultural (Del Cid, 2005).

Dentro de las plantas medicinales nativas que se han utilizado por tradición, se encuentra el uso de la especie *Cornutia grandifolia* Shauer in DC (Verbenaceae) para el tratamiento de la fiebre, dolor de riñones, infecciones de estómago y garganta (Gibson, 1970). Sin embargo, la actividad biocida de esta especie contra bacterias, hongos y levaduras patógenas al hombre aún no ha sido comprobada por procedimientos científicos y estandarizados, por lo que el presente estudio evaluará la actividad biocida del extracto etanólico crudo y de particiones líquido-líquido con disolventes de diferente polaridad de hojas de *C. grandifolia* colectada en San Juan Chamelco, Alta Verapaz, así como la concentración inhibitoria mínima de las particiones que posean actividad inhibitoria del crecimiento microbiano.

Para evaluar la actividad antimicrobiana se utilizó el modelo de dilución en agar con un diseño experimental y estadística binomial utilizando el criterio de positividad visual (crecimiento homogéneo indica actividad negativa y ausencia de crecimiento indica actividad positiva) (Mitcher *et al.* 1987). Para la elección del extracto se utilizó un diseño de elección no probabilístico por conveniencia. El tamizaje para la determinación de actividad biocida se realizó a una concentración de 1 mg/mL.

### 3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Guatemala es un país con una amplia diversidad de flora, en la cual el estudio de las plantas medicinales, en especial las nativas, han adquirido una gran importancia debido a las propiedades que éstas poseen de aliviar síntomas y mejorar el proceso de enfermedades, utilizándolas de una forma empírica de acuerdo a la cultura y creencias que nuestros antepasados nos han legado, en donde una de éstas son las especies del género *Cornutia*.

En nuestro país de acuerdo con la Flora de Guatemala (Gibson, 1970), existen dos especies distintas del género *Cornutia*; *C. grandifolia* y *C. pyramidata*, que muestran diferencias en su descripción botánica y las propiedades medicinales popularmente atribuidas. Sin embargo, según la Flora de Nicaragua (Stevens *et al.* 2001) corresponden a la misma especie.

En el proyecto de la Organización de Estados Americanos “Aprovechamiento de la flora regional como fuente de fármaco anticáncer, antiparasitario y antifúngico”, *C. pyramidata* obtuvo una gran importancia porque al realizarle los ensayos para evaluar la actividad anti-*Trypanosoma cruzi*, mostró resultados alentadores, siendo una de las plantas con resultados positivos por su actividad antiprotozo y atóxica dentro del conjunto evaluado. A partir de ese momento se han realizado varios bioensayos a extractos de esta planta.

Por ejemplo Molina (2005) estudió la actividad biocida de *C. pyramidata* realizando fracciones líquido-líquido del extracto etanólico, encontrando actividad biocida contra *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium smegmatis* a una concentración de 0.5 mg/mL; actividad contra *S. aureus*, *Salmonella typhi*, *M. smegmatis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* a una concentración de 0.5 mg/mL de la fracción de acetato de etilo y todas las particiones mostraron actividad contra el hongo saprófito *Aspergillus flavus* a una concentración de 1 mg/mL.

El presente estudio evaluó la actividad biocida a través del tamizaje y particiones del extracto etanólico al 95% de *C. grandifolia* para equiparar el conocimiento que existe entre las dos especies de *Cornutia*, ya que no hay estudios reportados en Guatemala de esta especie.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

En Guatemala no se encuentran datos reportados de estudios de *C. grandifolia*, por lo que el presente estudio pretende comparar el conocimiento de ambas especies de *Cornutia* para tener una base de datos más amplia y así establecer si existen diferencias bioactivas entre ambas y tener nuevas opciones terapéuticas o tratarlas en formas similares, lo cual podría ayudar a reforzar o descartar la similitud de estas especies.

En nuestro país las dos especies del género *Cornutia* registradas son *C. grandifolia* y *C. pyramidata*, ambas descritas en la Flora de Guatemala (Gibson, 1970) en donde se muestran diferencias botánicas y propiedades medicinales popularmente atribuidas a las mismas. *C. grandifolia* es un arbusto que crece en la región de Alta Verapaz, Guatemala e Izabal y se le atribuyen propiedades medicinales para el tratamiento de la rabia, fiebre, dolor de riñones, infecciones de estómago y de garganta. Asimismo, *C. pyramidata* es un arbusto de hasta 12 m de altura que crece en Alta Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, El Progreso, Escuintla, Guatemala, Izabal, Petén, Quetzaltenango, Sacatepéquez, San Marcos, Santa Rosa, Sololá, Suchitepéquez, Zacapa y es utilizado para el tratamiento contra la gastritis, fiebre, asma, dolores corporales y crisis nerviosa.

El aclaramiento de la actividad de ambas especies permitirá continuar las investigaciones sobre su actividad biocida y de existir diferencias, plantear una revisión de la taxonomía de ambas especies.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 Determinación de la actividad biocida *in silico*

5.1.1 Prueba de difusión por disco: La metodología utilizada en la actualidad es la descrita por Bauer y Kirby, la cual es un estudio de susceptibilidad en la cual un disco tiene una cantidad específica del antimicrobiano, el cual se aplica a la superficie de agar Mueller Hinton inoculado con un microorganismo. El antimicrobiano difunde, de acuerdo del coeficiente de difusión de la droga en el agar, desde el disco al medio de cultivo produciendo una zona de inhibición en la cual una concentración crítica de antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano. Utiliza el estándar 0.5 de McFarland (lo que corresponde a aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL) para realizar la suspensión de las bacterias (Coyle, 2006). Tiene la desventaja de ser útil solo para moléculas solubles en agua.

5.1.2 Método de dilución en agar: En esta metodología el extracto a evaluar se coloca en una cantidad y concentración definida con un volumen determinado de agar Mueller Hinton a 45°C, en cajas de Petri para que exista una difusión homogénea del extracto en el agar. Los microorganismos que se utilizarán en el ensayo se siembran sobre el agar el cual ya contiene el extracto y la interpretación se realiza cualitativamente como ausencia o presencia de crecimiento (Brancato; Golding, 1983). Su resultado es muy confiable con análisis no paramétrico pero su sensibilidad es intermedia. Tiene la ventaja de reconocer tanto moléculas solubles como insolubles en agua.

5.1.3 Macrodilución en caldo: Consiste en exponer las cepas a estudiar a diferentes concentraciones de un antimicrobiano, en diluciones a la mitad y observar el crecimiento de los microorganismos para luego definir la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM). Se emplea por cada combinación de microorganismo con antimicrobiano, un juego de tubos. Habitualmente se prepara el juego de tubos con 1ml de caldo Mueller Hinton suplementado con  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  estéril sin antimicrobiano. Para un pequeño número de pruebas se preparan diluciones al doble directamente en los tubos, colocando 2 ml de solución de antibiótico en el primer tubo de la serie de diluciones. En cada uno de los tubos restantes se añade 1 ml de caldo Mueller Hinton. Con una

pipeta estéril se transfiere 1 ml del primer tubo al segundo. Después de mezclar el contenido del segundo tubo, se transfiere 1 ml con una pipeta diferente (en esta transferencia y en todas las sucesivas) al tercer tubo. El proceso continúa hasta el penúltimo tubo, al que se le quita 1 ml, que se descarta. El último tubo no recibe solución de antibiótico y sirve de control de crecimiento. Las concentraciones finales de antibióticos en esta prueba son iguales a la mitad (Ferraro, 2000).

5.1.4 Microdilución: Esta metodología utiliza placas de 96 pozos con fondo en U a las cuales se les inocula una concentración determinada del extracto y de microorganismos a evaluar (levaduras, esporas de hongos o bacterias). Los resultados son de tipo cualitativo en los que se interpreta la presencia o ausencia de turbidez reportando actividad negativa o positiva respectivamente (Pfaller *et al.* 2002)

Cuadro 1. Métodos de evaluación antimicrobiana

<b>METODO</b>	<b>TECNICA</b>	<b>VALOR</b>
Cualitativo	Difusión (Kirby-Bauer)	Resistencia Valor intermedio Sensibilidad
Cuantitativo	1. Dilución en caldo: - Macrodilución en tubo - Microdilución en agar 2. Dilución en agar 3. Sistemas automatizados	Determinación de la Concentración inhibitoria mínima

## 5.2 Actividad biocida de la familia Verbenaceae

La familia Verbenaceae está compuesta por aproximadamente 90 géneros y 2000 especies de plantas a las cuales a algunas de ellas se les ha evaluado su actividad biocida. Un ensayo evaluó la actividad de triterpenos de *Lantana hispida* Kunth in H.B.K. contra la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, inhibiendo su crecimiento a una concentración de 25 µg/mL (Jiménez-

Arellanes *et al.* 2007). Al evaluar la actividad del aceite esencial de *Lippia origanoides* M. Martens & Galeotti mostraron fuerte actividad contra *C. albicans* seguido de *S. aureus* y *Escherichia coli* (Oliveira *et al.*, 2007). El aceite esencial de *Lippia multiflora* mostró actividad bactericida contra cepas de *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Listeria innocua*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica*, *Shigella dysenteriae*, *S. aureus* y *S. camorum*. Así mismo, el aceite esencial de *Lippia chevalieri* mostró actividad antibacteriana contra *B. cereus*, *E. faecalis*, *P. mirabilis*, *S. enterica*, *S. aureus* y *A. camorum*, lo que avala su uso tradicional reportado contra diarreas y como desinfectante bucal (Bassole, 2003). Al evaluar el aceite esencial de *Lippia sidoides* Cham. mostró actividad inhibitoria de *Microsporium canis* a una concentraciones de 4 a 70 mg/L, así como inhibición de *Candida* spp. a concentraciones de 620 a 2500 mg/L (Fontenelle, 2007).

### 5.3 *Cornutia* sp.

5.3.1 *Cornutia grandifolia* (Schlecht. & Cham.) Shauer in DC. (Gibson, 1970; Dieseldorff, 1977)

5.3.1.1 Familia: Verbenaceae

5.3.1.2 Nombre común: Jorobté, joro'kté, oromté, sak'i'ka, palo cuadrado

5.3.1.3 Distribución: Alta Verapaz, Guatemala, Izabal, Sacatepéquez. México, Honduras y Panamá.

5.3.1.4 Descripción botánica: Árbol o arbusto de 5 m de alto. Hojas con pecíolos de 1-5 cm de largo; láminas ovadas a elípticas de 7-30 cm de largo y 5-19 de ancho. Flores azules o púrpuras numerosas. Fruto en forma de cono aplanado a veces copular o globoso de 3-5 mm de largo.

5.3.1.5 Usos medicinales: Antirrábico, fiebre, dolor de riñones, infecciones de estómago y garganta.

5.3.1.6 Evidencia científica: Se han realizado varios ensayos evaluando la actividad biológica de distintos extractos de *C. grandifolia*. Se evaluó la actividad antifúngica contra *Cladosporium cucumerinum* y contra *Candida albicans* de extractos metanólicos, acuosos y clorofórmicos, reportándose inactividad o actividad débil (Rahalison *et al.*, 1993). Se evaluó la actividad de extractos acuosos contra *Biomphalaria glabrata*, reportando inactividad (Marston *et*

*al.*, 1996). Matsuse *et al.* (1999) utilizaron extractos acuosos para evaluar actividad citotóxica y capacidad de inhibición de células gigantes, reportándose una actividad débil en ambos casos. Guerrero (2009) demostró que el extracto etanólico de sus hojas produjeron un efecto inhibitor de la vía clásica del complemento a una concentración de 500 µg/mL y una actividad inhibitoria de la linfoproliferación a 1,000 µg/mL. Entre los componentes químicos aislados en otros estudios a partir de las hojas de *C. grandifolia* se encuentran las cornutinas, nombradas desde la C hasta la L las, cuales son diterpenoides a los que se les atribuyen propiedades medicinales y de ligera actividad contra las cepas poW y Dd2 de *Plasmodium falciparum* (Jenett-Siems *et al.*, 2003). Esta planta también es utilizada como cerco vivo por la presencia de las cornutinas A y B que en ensayos *in silico* demostraron actividad repelente contra las hormigas *Acromyrmex octospinosus*, creando una nueva estrategia para aumentar la productividad de los cultivos (Chen; Galinis; Wiemer, 1992).

### 5.3.2 *Cornutia pyramidata* L. (Gibson, 1970; Dieseldorff, 1977)

#### 5.3.2.1 Familia: Verbenaceae

5.3.2.2 Nombre común: Flor lila, cucaracha, hoja de zope, lat-ché (Guatemala), tzultesnuk, matasano (Honduras), Bwa kasav (República Dominicana)

5.3.2.3 Distribución: Alta Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, El Progreso, Escuintla, Guatemala, Izabal, Petén, Quetzaltenango, Sacatepéquez, San Marcos, Santa Rosa, Sololá, Suchitepéquez, Zacapa. México, Honduras, El Salvador, Nicaragua y la cuenca del Caribe.

5.3.2.4 Descripción botánica: Arbusto alto de hasta 12 m. El tronco llega a medir 15 cm de diámetro. Hojas pubescentes, ovaladas o elípticas, de 4-20 cm de largo y 4-14 cm de ancho, margen entero. Panículas piramidales, terminales, de 10 a 40 cm de largo; flores azules o púrpuras terminales o subterminales, numerosas de 10 a 12 cm de largo. Drupa azulada o negra, esférica y puberulenta de 3 a 6 mm de diámetro.

5.3.2.5 Usos medicinales: Gastritis, fiebre, asma, dolores corporales y crisis nerviosa.

5.3.2.6 Evidencia científica: En el proyecto de la OEA “Aprovechamiento de la flora regional como fuente de fármaco anticáncer, antiparasitario y antifúngico”, *C. pyramidata* obtuvo una gran importancia porque al realizarle los ensayos para evaluar la actividad anti-

*Trypanosoma cruzi*, mostró resultados alentadores, siendo una de las plantas con resultados positivos dentro del conjunto evaluado. Molina (2005) estudió la actividad biocida de *C. pyramidata* realizando fracciones líquido-líquido del extracto etanólico, encontrando actividad biocida contra *S. aureus* y *M. smegmatis* a una concentración de 500 µg/mL; actividad contra *S. aureus*, *S. typhi*, *M. smegmatis*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* a una concentración de 500 µg/mL de la fracción de acetato de etilo y todas las particiones mostraron actividad contra el hongo saprófito *A. flavus* a una concentración de 1,000 µg/mL. Guerrero (2009) estudió la actividad del extracto etanólico de las hojas encontrando una actividad inhibitoria de la vía clásica del complemento a una concentración de 166.67 µg/mL y sobre la vía alterna a 55.56 µg/mL.

#### **5.4 Fraccionamiento fitoquímico para análisis bioguiado**

Se refiere a la separación de metabolitos de mezclas de naturaleza química compleja para obtener fracciones de compuestos afines, con características y propiedades similares. Estos métodos aprovechan la naturaleza química de los compuestos a separar, específicamente las diferencias en polaridad y acidez-alcalinidad, los métodos de fraccionamiento grueso se realizan preliminarmente a los métodos especializados con el propósito de optimizar recursos y técnicas y aumentar la eficacia de las metodologías (Wrigley *et al.* 1999).

5.4.1 Partición líquido-líquido: Es un método convencional de análisis el cual se fundamenta en las diferencias de los coeficientes de reparto de los metabolitos extraídos entre dos líquidos inmiscibles (uno polar y otro apolar). Constituye un método de fraccionamiento grueso, que permite obtener extractos selectivamente caracterizables y con una mayor especificidad en lo que a grupos funcionales se refiere. Estas particiones luego son separadas por cromatografía en columna para fraccionar y aislar los posibles componentes bioactivos.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 General

6.1.1 Contribuir a la equiparación del conocimiento entre las dos especies de *Cornutia* presentes en Guatemala.

### 6.2 Específicos

6.2.1 Evaluar la actividad biocida del extracto etanólico crudo de las hojas de *C. grandifolia*.

6.2.2 Obtener las particiones líquido-líquido con disolventes de distinta polaridad a partir del extracto etanólico de hojas de *C. grandifolia* para evaluar su actividad biocida.

6.2.3 Comparar la actividad biocida de *C. grandifolia* con resultados de estudios previos realizados en Guatemala en extractos de *C. pyramidata*.

## 7. HIPÓTESIS

Al menos una de las particiones obtenidas a partir del extracto etanólico de hojas de *C. grandifolia*, posee actividad biocida *in silico*.

## **8. AREAS A INVESTIGAR**

Estudio farmacológico y microbiológico de la actividad biocida contra nauplios, bacterias, levaduras y hongos *in silico* de *C. grandifolia*.

## 9. MATERIALES Y MÉTODOS

### 9.1 Universo y muestra

9.1.1 Universo de trabajo: Plantas del género *Cornutia*.

9.1.2 Muestra: Extracto etanólico de hojas de *C. grandifolia* colectadas en San Juan Chamelco, Alta Verapaz obtenido de la colección de extractos del Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

### 9.2 Recursos humanos

9.2.1 Investigadora: Licda. Keila Mariana Guerrero Gutiérrez

9.2.2 Asesor: Lic. Armando Cáceres

9.2.3 Revisora: MA. Margarita Paz de Ramírez

### 9.3 Recursos institucionales

9.3.1 Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Departamento de Citohistología, Universidad de San Carlos de Guatemala.

9.3.2 Laboratorio de Bioensayos, Departamento de Citohistología, Universidad de San Carlos de Guatemala.

9.3.3 Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT).

### 9.4 Metodología

9.4.1 Obtención de particiones líquido-líquido: Se realizó una partición líquido-líquido del extracto etanólico al 95% de hojas de *C. grandifolia* con los siguientes disolventes: hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol, utilizados en orden creciente de acuerdo a su polaridad.

Cada partición se concentró a sequedad en rotavapor, recuperando cada uno de los disolventes utilizados y obteniendo el porcentaje de rendimiento de los mismos.

9.4.2 Actividad citotóxica: Se evaluó la actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina*, el cual es un camarón salino cuyas larvas (nauplios) son sensibles a una gran variedad de sustancias. Los nauplios de *A. salina* son utilizados como organismos blanco para detectar la citotoxicidad de compuestos extraídos de plantas. Este tamizaje consistió en poner de manifiesto la tolerancia de los nauplios a la concentración de 1 mg/mL del extracto etanólico crudo *C. grandifolia* según metodología escrita por Solis y colaboradores (1993) y adaptada a nuestro laboratorio por Cáceres y colaboradores (1998) (Ver anexo 14.1)

9.4.3 Actividad antibacteriana y antilevadura *in silico*: Las bacterias son organismos de vida libre que tienen curvas de crecimiento máximo de 24 a 48 horas y a diferencia de las bacterias, las levaduras tiene un crecimiento máximo de 48 a 72 horas de incubación. El tamizaje de la actividad antibacteriana y antilevadura consistió en poner de manifiesto la inhibición del crecimiento de bacterias y levadura a una concentración de 1 mg/mL del extracto etanólico y de las particiones del mismo. Las bacterias a evaluar fueron: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Salmonella typhi* ATCC 14028. Las levaduras evaluadas fueron *Candida albicans* ATCC 10231 y *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. Se utilizó la metodología de dilución en agar utilizando agar planta, ensayo descrito por Mitscher y colaboradores (1972; 1987) (Ver anexo 14.2)

9.4.4 Actividad antifúngica *in silico*: Los hongos son organismos de vida libre que tienen curvas de crecimiento de 7 a 21 días de incubación en medio Sabouraud. El tamizaje de la actividad antimicótica consistió en evidenciar *in silico* la inhibición del crecimiento micelial de los hongos a una concentración de 1 mg/mL de extracto etanólico y de las fracciones obtenidas midiendo los diámetros de crecimiento y obteniendo el porcentaje de inhibición de los mismos respecto al control negativo. Se realizó la metodología de dilución en agar utilizando agar planta, descrita por Brancato y Golding modificado por MacRae (1983). Los hongos evaluados fueron *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* ATCC 26934 y *A. niger* ATCC 9029 (Ver anexo 14.3)

9.4.5 Concentración inhibitoria mínima (CIM): Consistió en determinar la concentración inhibitoria mínima del extracto etanólico y de las fracciones que demostraron

actividad positiva en el tamizaje. Para su realización se emplearon concentraciones de 1, 0.5 y 0.25 mg/mL en placas cuadruplicate contra concentraciones constantes del microorganismo, en donde se evaluó el crecimiento del mismo tomando como CIM la concentración menor en la cual ya no hubo crecimiento visible (Ver anexo 14.4).

## 9.5 Diseño estadístico

9.5.1 Tipo de estudio: Diseño experimental con estadística binomial y criterio de positividad visual no paramétrica (crecimiento homogéneo indicó actividad negativa y ausencia de crecimiento, actividad positiva), con un diseño de elección del extracto no probabilístico por conveniencia. El tamizaje para la determinación de actividad biocida se realizó a una concentración de 1 mg/mL. En los casos positivos, se realizaron diluciones de 0.5 y 0.25 mg/mL para determinar la CIM.

### 9.5.2 Variables

9.5.2.1 Variable independiente: extracto etanólico de hojas de *C. grandifolia*.

9.5.2.2 Variable dependiente: actividad biocida.

9.5.3 Validez del método: Para la validez del ensayo citotóxico se utilizó como control negativo agua de mar sin extracto y para los ensayos antibacterianos, antilevadura y antifúngicos, se utilizó agar con etanol al 50% como control negativo, el cual presentó un crecimiento óptimo de los microorganismos. Se realizaron 4 repeticiones de cada ensayo.

- Actividad antibacteriana y antilevadura positiva: ausencia visual de crecimiento de los microorganismos a lo largo del inóculo.

- Actividad antifúngica positiva: inhibición del crecimiento del hongo en un 75% o más respecto al control negativo.

Análisis de datos: Para la evaluación de la actividad citotóxica se utilizó el programa de computadora Finney (DOS). Se utilizó una estadística binomial con un nivel de confianza del 95% ( $p < 0.05$ ) y con 4 réplicas para cada ensayo (actividad antibacteriana, antilevadura y antifúngica).

## 10. RESULTADOS

### 10.1 Obtención de particiones líquido-líquido

En la Tabla 1 se muestra el % de rendimiento del extracto etanólico al 95% de las hojas de *C. grandifolia*, en base a peso seco de hojas recolectadas en San Juan Chamelco, Alta Verapaz. El extracto fue obtenido por percolación y reconcentración por rotavaporación en un estudio previo (Guerrero, 2009). También se muestran los rendimientos de las 5 particiones obtenidas a partir de 19.997 g del mismo. Para obtener las particiones se utilizaron disolventes de distinta polaridad, iniciado con el disolvente de menor polaridad (hexano) hasta llegar al de mayor polaridad (metanol), obteniendo el mayor porcentaje con la primera fracción (33.94%), la cual fue un precipitado formado al agregar el hexano. La fracción con acetato de etilo fue la que presentó menor porcentaje de rendimiento (2.12%).

Tabla 1. Rendimiento del extracto etanólico de las hojas de *C. grandifolia* y sus particiones.

	Peso (g)	% rendimiento
Extracto etanólico	32.46	14.75
Particiones		
Precipitado en hexano	6.7868	33.94
Hexánica	5.3813	26.91
Clorofórmica	0.7808	3.90
Acetato de etilo	0.4250	2.12
Metanólica	0.5772	2.89

Fuente: datos experimentales

## 10.2 Actividad citotóxica

Se evaluó la actividad citotóxica del extracto etanólico crudo de *C. grandifolia*, observándose en la Tabla 2 que no existió muerte de los nauplios de 48 horas de crecimiento en ninguna de las concentraciones evaluadas ( $p < 0.05$ ), ya que se considera una actividad positiva si el extracto es capaz de matar el 50% o más de la población total.

Tabla 2. Actividad citotóxica de extracto etanólico crudo de *C. grandifolia* contra nauplios de *A. salina*

REPETICIÓN	CONTROL NEGATIVO	1 mg/mL	0.5 mg/mL	0.25 mg/mL	0.125 mg/mL
1	1/12	0/10	0/11	0/10	0/10
2	0/15	0/10	0/10	0/12	0/14
3	0/12	0/10	0/10	0/10	0/13
4	0/14	1/12	0/15	0/11	0/11

\*Nauplios muertos/totales todos sin actividad con 0% de muerte

Fuente: datos experimentales

### 10.3 Actividad antibacteriana y antilevadura *in silico*

Al realizar el tamizaje para evaluar la actividad antimicrobiana y antilevadura del extracto etanólico crudo, se encontró actividad inhibitoria contra *E. coli*, *S. aureus*, *M. smegmatis* y *B. subtilis*, por lo que procedió a realizar el tamizaje con todas las particiones obtenidas, encontrándose actividad inhibitoria del precipitado contra *E. coli* y la fracción obtenida con acetato de etilo presentó actividad contra *S. aureus*, *M. smegmatis* y *B. subtilis*, por lo que se procedió a realizar la CIM del extracto etanólico y de estas fracciones (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria (mg/mL) de la actividad antimicrobiana y antilevadura de *C. grandifolia*

	<i>S.</i> <i>aureus</i>	<i>S.</i> <i>typhi</i>	<i>M.</i> <i>smegmatis</i>	<i>B.</i> <i>subtilis</i>	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	<i>C.</i> <i>albicans</i>	<i>S.</i> <i>cereviciae</i>	<i>E.</i> <i>coli</i>
CONTROL								
NEGATIVO	-	-	-	-	-	-	-	-
Extracto etanólico	0.5	-	1	1	-	-	-	1
Precipitado	-	-	-	-	-	-	-	1
Hexánica	-	-	-	-	-	-	-	-
Clorofórmica	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetato de etilo	0.5	-	0.5	0.5	-	-	-	-
Metanólica	-	-	-	-	-	-	-	-

(-): Actividad > 1 mg/mL; crecimiento visible

Fuente: datos experimentales

#### 10.4 Actividad antifúngica *in silico*

En la Tabla 4 se observan los resultados de las medias y su respectiva desviación estándar (SD) de los halos de crecimiento miceliar al evaluar la actividad antifúngica al extracto etanólico al 95% y a las fracciones obtenidas, encontrándose que ninguno de ellos inhibió más del 75% respecto al control negativo, a *A. flavus*, *A. fumigatus* y *A. niger* a la concentración de 1 mg/mL, Sin embargo, se observó que el crecimiento de los hongos en las particiones obtenidas con disolventes apolares (precipitado, hexánica, clorofórmica) fue de color blanco y en las particiones obtenidas con disolventes polares (acetato de etilo, metanol) junto con el extracto etanólico crudo y el control negativo presentaron la pigmentación característica de cada uno de los mismos (Ver anexo Figuras 7-10).

Tabla 4. Actividad antifúngica de particiones de extracto etanólico de *C. grandifolia*

	<i>A. flavus</i>		<i>A. fumigatus</i>		<i>A. niger</i>	
	Media $\pm$ SD*	Actividad**	Media $\pm$ SD	Actividad	Media $\pm$ SD	Actividad
CONTROL NEGATIVO	43 $\pm$ 1.8	-	40 $\pm$ 0.5	-	35 $\pm$ 0.9	-
Extracto etanólico	38 $\pm$ 1.4	-	38 $\pm$ 0.8	-	42 $\pm$ 2.1	-
Precipitado	42 $\pm$ 1.7	-	42 $\pm$ 1.8	-	40 $\pm$ 0	-
Hexánica	33 $\pm$ 0.8	-	37 $\pm$ 2.1	-	42 $\pm$ 1.9	-
Clorofórmica	34 $\pm$ 2.2	-	38 $\pm$ 1.4	-	37 $\pm$ 2.1	-
Acetato de etilo	35 $\pm$ 0.5	-	38 $\pm$ 1.7	-	41 $\pm$ 2.6	-
Metanólica	40 $\pm$ 0.5	-	40 $\pm$ 0.4	-	40 $\pm$ 0	-

\*Diámetro en milímetros

\*\*(-): Actividad > 1 mg/mL con 0% de inhibición

Fuente: datos experimentales

## 10.5 Actividad biocida de las especies de *Cornutia* sp.

En la tabla 5 se comparan los resultados obtenidos de la actividad biocida (citotóxica, antibacteriana, antilevadura y antifúngica) de *C. grandifolia* y *C. pyramidata*, así como el % de rendimiento de cada una de sus particiones.

Tabla 5. Comparación de la actividad biocida entre *C. grandifolia* y *C. pyramidata*

Particiones	<i>C. grandifolia</i>				<i>C. pyramidata</i> *			
	% rendimiento	Actividad citotóxica DL <sub>50</sub> (mg/mL)	Actividad antibacteriana y antilevadura (CIM mg/mL)	Actividad antifúngica (CIM mg/mL)	% rendimiento	Actividad citotóxica DL <sub>50</sub> (mg/mL)	Actividad antibacteriana y antilevadura (CIM mg/mL)	Actividad antifúngica (CIM mg/mL)
Extracto etanol 95%	14.75	-	<i>E. coli</i> (1) <i>S. aureus</i> (0.5) <i>M. smegmatis</i> (1) <i>B. subtilis</i> (1)	-	13.78	0.91	<i>S. aureus</i> (0.5) <i>M. smegmatis</i> (0.5)	<i>A. flavus</i> (1)
Precipitado	33.94	ND	<i>E. coli</i> (1)	-	-	-	-	-
Hexánica	26.91	ND	-	-	16.77	-	-	<i>A. flavus</i> (1)
Clorofórmica	3.90	ND	-	-	26.71	-	<i>S. aureus</i> (1)	<i>A. flavus</i> (1)
Acetato de etilo	2.12	ND	<i>S. aureus</i> (0.5) <i>M. smegmatis</i> (0.5) <i>B. subtilis</i> (0.5)	-	3.27	0.91	<i>S. aureus</i> (0.5) <i>S. typhi</i> (1) <i>M. smegmatis</i> (1) <i>P. aeruginosa</i> (1) <i>C. albicans</i> (1)	<i>A. flavus</i> (1)
Metanol	2.89	ND	-	-	ND	ND	ND	ND
Acuoso	ND	ND	ND	ND	32.84	0.79	<i>S. aureus</i> (1)	<i>A. flavus</i> (1)

\* Molina (2005). Determinación de la actividad biocida del extracto etanólico y sus particiones (hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa) de hojas de *C. pyramidata* L. (jorobté). Licda. en Química Farmacéutica. Guatemala, GT. Facultad de CCQQ y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.  
(-) Sin actividad  
ND = No determinado

## 11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio se evaluó la actividad biocida del extracto etanólico de hojas de *C. grandifolia* y sus particiones contra nauplios de *A. salina*, bacterias Gram positivo y negativo, levaduras y hongos filamentosos oportunistas.

En la realización de la partición líquido-líquido del extracto etanólico al 95% de *C. grandifolia*, se utilizaron disolventes con distinta polaridad utilizados en orden creciente de acuerdo a la misma, obteniéndose 5 particiones: precipitado de la partición hexánica, hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y metanólica, con el mayor porcentaje de rendimiento de la partición del precipitado en hexano (33.94%) y el menor con la de acetato de etilo (2.125%) (Tabla 1). Esto demuestra que la mayoría de los compuestos presentes en esta planta son apolares ya que hubo mayor extracción con disolventes apolares.

Como puede observarse en la Tabla 2, para la evaluación de la actividad citotóxica se realizó el tamizaje con extracto etanólico de *C. grandifolia*, observándose que a concentraciones de 1, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/mL no hubo muerte de los nauplios de *A. salina* ( $p < 0.05$ ), por lo que no se realizó este procedimiento con las particiones del extracto.

Al realizar el tamizaje de la actividad antibacteriana y antilevadura (Tabla 3) con el extracto etanólico de *C. grandifolia*, se encontró una actividad inhibitoria contra *S. aureus* a 0.5 mg/mL, *M. smegmatis* y *B. subtilis* a 1 mg/mL y contra *E. coli* a 1 mg/mL, por lo que se procedió a evaluar la actividad de las fracciones obtenidas a partir de dicho extracto para identificar las fracciones en donde se encuentren los compuestos responsables. Como se esperaba, se obtuvo inhibición de las mismas bacterias y a pesar que la fracción de acetato de etilo fue la de menor rendimiento, se encontró que esta fracción fue la que presentó la mayor actividad antibacteriana, siendo ésta contra *S. aureus*, *M. smegmatis* y *B. subtilis* a concentración de la fracción de 0.5 mg/mL. Se puede observar que hubo una mejoría de la CIM contra *M. smegmatis* y *B. subtilis*, disminuyendo de 1 mg/mL a 0.5 mg/mL. La fracción de precipitado fue la responsable de la actividad inhibitoria del crecimiento de *E. coli* a 1 mg/mL. Las demás fracciones no presentaron actividad alguna contra las bacterias y levaduras evaluadas. Se recomienda la realización de esta

actividad por micrométodo para confirmar los resultados utilizando una metodología más sensible.

En la Tabla 4 se observan las medias y desviaciones estándar de los halos de crecimiento de los hongos *A. flavus*, *A. fumigatus* y *A. niger*, encontrándose que ninguno de ellos fue inhibido en un 75% o más al evaluarse la actividad del extracto etanólico y sus fracciones.

La actividad encontrada tanto contra bacterias Gram negativo como Gram positivo, avala su uso popular contra distintas afecciones ya que se conoce que la infusión de las hojas de esta planta se utiliza para tratar fiebre, enfermedades inflamatorias e infecciones del estómago y garganta.

Al realizar la comparación entre los resultados de la actividad biocida de este estudio con otro estudio realizado en nuestra Facultad anteriormente (Molina, 2005) en el cual se evalúa la actividad de *C. pyramidata*, se encuentran varias diferencias. Cabe señalar que se utilizó la misma metodología para las evaluaciones biocidas:

- La actividad citotóxica es diferente ya que este estudio no reporta citotoxicidad contra nauplios de *A. salina*, sin embargo, el extracto etanólico al 95%, la fracción de acetato de etilo y acuosa de *C. pyramidata* mostraron una  $DL_{50}$  de 0.91, 0.91 y 0.79 mg/mL, respectivamente.

- La actividad antibacteriana también muestra diferencias en cuanto a las bacterias inhibidas y la CIM de cada una de ellas. Según Molina (2005), el extracto etanólico de *C. pyramidata* muestra inhibición de *S. aureus* (0.5 mg/mL) y *M. smegmatis* (0.5 mg/mL); la fracción de acetato de etilo inhibió a *S. aureus* (0.5 mg/mL), *S. typhi* (1 mg/ml), *M. smegmatis* (1 mg/mL), *P. aeruginosa* (1 mg/mL) y *C. albicans* (1 mg/mL); la fracción acuosa presentó actividad contra *S. aureus* (1 mg/mL). Este estudio reporta actividad antibacteriana en común contra *S. aureus* (0.5 mg/mL) y *M. smegmatis* (0.5 mg/mL) solamente que a una CIM menor. En la tabla 5 puede observarse que en ambas especies, la fracción de acetato de etilo fue la que presentó la mayor actividad antibacteriana.

- Al comparar los resultados de las distintas fracciones obtenidas de cada planta, este estudio reporta la formación de un precipitado formado al agregar el hexano, lo que no se reporta con *C. pyramidata*. Así mismo, en el presente estudio no se obtuvo una fracción acuosa, por lo

que no se puede realizar una comparación de la actividad de la fracción acuosa de *C. pyramidata*. En ambas especies, se observa que el menor porcentaje de rendimiento se presentó en la partición con acetato de etilo, pero es la partición con mayor actividad.

- También existen diferencias en cuanto a la actividad contra *A. flavus* (1 mg/mL) ya que este estudio no reporta dicha actividad. Sin embargo, se pudo observar que en las fracciones apolares de *C. grandifolia* a una concentración de 1 mg/mL, el crecimiento miceliar de todos los hongos fue color blanco, lo que puede indicar una disminución en la esporulación de los mismos, ya que se ha visto que en cepas clínicas de *Aspergillus* sp. el crecimiento es más floco y blanquecino debido a una menor esporulación (Abarca, 2000). Por esta razón, se deben realizar pruebas que confirmen este fenómeno.

A pesar de estos resultados, persiste la duda si se trata de variedades o especies diferentes ya que existen características botánicas que las distinguen entre sí en las cuales clasifican a *C. grandifolia* como un árbol o arbusto de 5 m de alto y con láminas ovadas a elípticas de 7-30 cm de largo y a *C. pyramidata* como un arbusto de hasta 12 m de alto y hojas ovaladas de 4-20 cm de largo. Si bien las características no son conclusivas, apuntan a que existen diferencias entre sí, por lo que se recomienda estudiar a ambas especies cultivadas en las mismas condiciones y un análisis molecular que nos pueden indicar si se tratan de variedades o especies diferentes.

## 12. CONCLUSIONES

**12.1** La partición que presentó un mayor porcentaje de rendimiento fue el precipitado obtenido (33.94%) y el menor porcentaje se obtuvo con acetato de etilo (2.12%).

**12.2** El extracto etanólico crudo al 95% de *C. grandifolia* no presentó actividad citotóxica contra nauplios de *Artemia salina*, utilizando una concentración de 1 mg/mL.

**12.3** El precipitado de la partición hexánica presentó una CIM de 1 mg/mL contra *E. coli* y la partición de acetato de etilo posee una CIM contra *S. aureus*, *M. smegmatis* y *B. subtilis* a 0.5 mg/mL.

**12.4** Ninguna partición presentó actividad contra los hongos *A. flavus*, *A. fumigatus* y *A. niger* a la concentración de 1 mg/mL.

**12.5** La demostración de la actividad inhibitoria del extracto etanólico al 95% y del precipitado de la fracción hexánica y la partición de acetato de etilo sobre el crecimiento de bacterias, comprueba la hipótesis de este estudio y avala su uso popular para distintas afecciones bacterianas.

**12.6** Existen diferencias respecto a la bioactividad entre las dos especies del género *Cornutia* en cuanto a su actividad citotóxica, antibacteriana y antifúngica.

**12.7** Se presentan evidencias que permiten pensar que existe diferencia entre ambas especies, o por lo menos, que se trata de variedades de la misma especie.

### **13. RECOMENDACIONES**

- 13.1.** Realizar análisis de biología molecular y micrografías a plantas cultivadas bajo las mismas condiciones ambientales
- 13.2.** Evaluar la actividad antibacteriana utilizando el método de microdilución en placa.
- 13.3.** Realizar el tamizaje fitoquímico a las particiones que presentaron actividad antimicrobiana para llegar a la identificación de los metabolitos responsables de dicha actividad.

## 14. REFERENCIAS

- Abarca, M. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*. 17: S79-S84.
- Bassole I *et al.* 2003. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry* 62 : 209–212.
- Brancato, F; Golding N. 1983. The diameter of the mould colony as a reliable measure of growth. *Journal of Mycology*. 45: 848-863.
- Cáceres, A *et al.* 1998. Plants used in Guatemala for the threatment of protozoal infections. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 62: 195-202.
- Chen, T; Galinis, D; Wiemer, D; 1992. Cornutin A and B : Novel diterpenoid repellents of leafcutter ants from *Cornutia grandifolia*. *Journal of Organic Chemistry*. 57: 862-866.
- Coyle, M. 2006. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. American Society for Microbiology. Organización Panamericana de la Salud.
- Del Cid, N. 2005. Actividad de diecisiete extractos de doce plantas nativas guatemaltecas contra *Fonsecaea pedrosoi*. Licda. En *Química Biológica*. Guatemala, GT. Facultad de CCQQ y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. 52 p.
- Dieseldorff, I. 1977. Las plantas medicinales del departamento de Alta Verapaz. Guatemala: Tipografía Nacional.
- Ferraro, M. 2000. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Fifth Edition. Vol 20, N° 2, M7-A5 NCCLS.
- Fontenelle R *et al.* 2007. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 59: 934–940
- Gibson, D. 1970. Verbanaceae. *Flora of Guatemala*. Fieldiana Botany. 24: 196-197.
- Guerrero, K. 2009. Actividad inmunomoduladora de hojas de *Cornutia pyramidata* y *Cornutia grandifolia*. Lic. en *Química Biológica*. Guatemala, GT. Facultad de CCQQ y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. 49 p.

- Jenett-Siems, K *et al.* 2003. Cornutin C-L, neo-clerodane-type diterpenoids from *Cornutia grandifolia* var. *intermedia*. *Phytochemistry*. 64: 797-804.
- Jiménez-Arellanes A *et al.* 2007. Antimycobacterial triterpenoids from *Lantana hispida* (Verbenaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 111: 202–205.
- Marston, A *et al.* 1996. screening of Panamanian plants for molluscicidal activity. *International Journal of Pharmacognosy*. 31: 68-76
- Matsuse, I *et al.* 1999. A search for antiviral properties in Panamanian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 64: 15-22.
- Mitscher, L *et al.* 1972. Antimicrobial agents from higher plants. 1. Introduction, rationale and methodology. *Lloydia* 35: 157-166.
- Mitscher, L; Darker, S; Gollapudi, A. 1987. A modern look at folkloric use a anti-infective agents. *Journal of Natural Products*. 5: 1025-1041.
- Molina, R. 2005. Determinación de la actividad biocida del extracto etanólico y sus particiones (hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa) de hojas de *Cornutia pyramidata* (Jorobté). Licda. en Química Farmacéutica. Guatemala, GT. Facultad de CCQQ y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. 63 p.
- Oliveira, R *et al.* 2007. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. *Food Chemistry* 101; 236–240.
- Pfaller, M *et al.* 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approver standard. NCCLS Documento M38-A. Vol. 22.
- Proyecto de la Organización Estados Americanos (OEA). 2001-2004. Aprovechamiento de la flora regional como fuente de fármaco anticáncer, antiparasitario y antifúngico.
- Rahalison, L *et al.* 1993. Screening for antifungal activity of Panamanian plants. *International Journal of Pharmacognosy*. 31: 68-76.
- Stevens, W *et al.* 2001. Flora de Nicaragua. Angiospermas (*Pandanaceae-Zygophyllaceae*). Missouri Botanical Garden Press. Tomo III.
- Solis, P *et al.* 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Médica*. 59: 250-252.
- Verbenaceae. Disponible en [www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com). Fecha de consulta 20 de julio 2009.
- Wrigley, S *et al.* 1999. *Phytochemical Diversity*. Cambridge, Royal Society Chemistry. 254 p.

## 15. ANEXOS

### 14.1 Actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina*

14.1.1 Preparación del agua de mar: En un vaso de precipitar, disolver 35 g de la sal de mar en un litro de agua destilada. Hacer una marca en el vaso para indicar el volumen de agua. Hervir por 30 minutos y completar el volumen que se evaporó según la marca. Filtrar y refrigerar hasta el momento de usar, la solución es estable por un mes a temperatura de 6-8°C.

14.1.2 Cultivo de *Artemia salina*: Forrar la mitad de una pecera con plástico oscuro. Colocar en un vaso de precipitar 200 mL del agua de mar y airear por 30 minutos. Colocar el agua en la pecera y agregar aproximadamente 40 mg de huevecillos en el área cerrada (lado oscuro). Incubar por 48 horas a temperatura ambiente y con luz artificial. Al eclosionar, los nauplios (larvas) pasan al área abierta de la pecera (lado con luz). No mover la pecera después de agregados los huevos, ya que pasarían del área cerrada y esto no permite el conteo de nauplios.

14.1.3 Determinación de la citotoxicidad: Pesar 40 mg del extracto a ensayar y disolver con 2 mL de agua de mar. Disolver con un vortex. Agregar por triplicado en una microplaca: 100 µL del extracto disuelto + 100 µL de agua de mar con 10-15 nauplios. Control negativo: 100 µL de agua de mar, 100 µL de agua de mar con 10-15 nauplios. Incubar a temperatura ambiente con luz artificial por 24 horas. Contar en el estereoscopio el número de nauplios muertos. Agregar metanol a los pozos, esperar 15 minutos y contar de nuevo todos los nauplios. Si se observan nauplios muertos en el control negativo la prueba no es válida y hay que repetirla de nuevo.

14.1.4 Interpretación: Calcular el % de camarones muertos:

- Sumar el número de camarones muertos en los tres pozos (X)
- Sumar el número total de camarones en los tres pozos (Y)
- Dividir X dentro de Y y multiplicarlos por 100.

Si el % de camarones muertos es mayor del 50%, repetir la prueba utilizando dosis de 1.0, 0.5 y 0.25 mg/mL. Obtener los valores de X y Y en cada dosis y determinar el valor de DL<sub>50</sub> con el programa de computadora Finney (DOS). Si el % de camarones muertos es menor del 50% la citotoxicidad es mayor de 1 mg/mL.

## 14.2 Actividad antibacteriana y antilevadura *in silico*

14.2.1 Disolución del extracto: En la balanza analítica pesar 30 mg de extracto a ensayar y disolverlo en 3 mL de etanol al 50% (hacer cálculos para determinar el volumen de extracto necesario para realizar el ensayo). Agitar en un vortex hasta que este bien disuelto. Si no se disuelve utilizar un sonicador. En el caso de extractos con disolventes apolares agregar 25  $\mu$ L de dimetilsulfoxido (DMSO). Filtrar el extracto

14.2.2 Filtración de extracto: Trabajar la filtración en la campana de flujo laminar. Aspirar el extracto utilizando una jeringa estéril de 5 mL. Desenroscar la aguja y enroscar en la jeringa el filtro de 0.45  $\mu$ m de diámetro. En un frasco estéril recibir el filtrado haciendo pasar la disolución del extracto por el filtro lentamente.

14.2.3 Preparación de Agar-Planta: Preparar tubos con 9.0 mL de agar Mueller Hinton (dos tubos por cada extracto o compuesto a trabajar). Esterilizar a 121°C durante 15 min, dejar enfriar a 50°C. En una caja de Petri simple agregar 1.0 mL de la solución del extracto filtrado (este debe tener una concentración de 10 mg/mL) y los 9 mL de agar Mueller Hinton. Tapar la caja y homogenizar con movimientos circulares. La concentración final que se obtiene es de 1 mg/mL. Dejar solidificar e incubar a 37°C por 24 h, para comprobar esterilidad. Guardar en refrigeración hasta el momento de usar.

14.2.4 Preparación del inóculo: Purificar el microorganismo a ensayar inoculándolo en una caja de Petri con agar Trypticase Soya o Sabouraud (levaduras), incubar 37°C durante 24 h para bacterias y 48 h para levaduras. Inocular una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5.0 mL de caldo Trypticase Soya, incubar a 37°C durante 24 h. Diluir 0.05 mL de la suspensión anterior en 4.95 mL de solución salina estéril al 0.85% (dilución 1:100).

14.2.5 Demostración de la actividad antibacteriana y antilevadura: Inocular en las cajas con agar-planta una asada de cada uno de los microorganismos siguiendo el patrón de la plantilla. Hacer cuatro repeticiones por microorganismo. Dejar reposar durante 5-10 minutos e incubar a 37°C durante 24 h para bacterias y 48 h para levaduras. Utilizar como control negativo 9 mL de agar Mueller Hinton mezclándole 1 mL de etanol al 50%.

14.2.6 Interpretación de resultados: actividad negativa: Crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo. Actividad positiva: no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo. Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación.

### 14.3 Actividad antifúngica *in silico*

14.3.1 Preparación de medio de cultivo: Preparar tubos con 13.5 mL de agar Sabouraud. Esterilizar durante 15 minutos a 121°C, dejar enfriar a 50°C y agregar 1.5 mL del extracto de la planta a probar (Dilución 1:10). Agitar. La concentración final que se tiene es de 1 mg/mL. Verter en cajas de Petri estériles, dejar solidificar e incubar a 37°C durante 24 horas para verificar esterilidad. Guardar en refrigeración hasta el momento de su uso.

14.3.2 Preparación de inóculo: Preparar medio de Takashio (Sabouraud modificado para producción de esporas) con los siguientes ingredientes:

- Dextrosa	0.6 g
- NaSO <sub>4</sub>	0.3 g
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3 g
- Peptona	0.3 g
- Agar-agar	6.0 g

Agregarlo a 300 mL de agua, disolver, verter 6 mL en tubos con tapón de rosca, esterilizar en autoclave y dejar solidificar con el mayor declive posible. Incubar 48 horas a 25°C para descartar contaminación. Sembrar en este medio los hongos a ensayar e incubar a 27°C durante 21 días hasta obtener un crecimiento homogéneo (aproximadamente 15 días). Agregar a cada tubo 2 mL de agua destilada estéril y desprender el hongo con ayuda de una varilla. Trasvasar el material obtenido a viales con tapa de rosca. Agitar 1 minuto en agitador y hacer un conteo de esporas en cámara de Neubauer. Llevar la suspensión a 100 esporas/μL =  $1 \times 10^5$  esporas/mL (aproximadamente 10 esporas/cuadrante) y almacenar en viales estériles en refrigeración.

14.3.3 Inoculación de hongos filamentosos en placa: Abrir cuatro agujeros en las cajas con agar-planta, con campanillas de Durham de 5 mm de diámetro en forma equidistante. Tomar 30 μL de la suspensión de esporas y depositar en los agujeros. Incubar a 27°C por 14 días. Hacer un total de 4 repeticiones en la misma forma, usar una caja con agar Sabouraud como control negativo. Las cajas control constituyen cajas de agar Sabouraud (13.5 ml) con 1.5 ml de etanol al 70%. Es decir que llevan el mismo procedimiento que se emplea para realizar cajas de agar-planta solamente que en lugar de llevar la suspensión con el extracto, llevan etanol al 70%.

14.3.4 Lectura e interpretación de los resultados: Medir el diámetro de la colonia del hongo en milímetros. Calcular el porcentaje de inhibición, comparando el diámetro contra el de las colonias en las cajas control. Tomar como positivos los extractos que reducen el diámetro de la colonia en un 75%.

#### **14.4 Concentración inhibitoria mínima (CIM)**

14.4.1 Preparación de Agar-Planta: Preparar tubos con 3.6, 3.8, 3.9, 4 mL de agar Mueller Hinton. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos, dejar enfriar a 50°C y agregar la solución del extracto disuelto (concentración de 10 mg/mL) en una caja cuadrilate de la siguiente manera:

- 3.6 mL de agar + 0.4 mL de la solución de extracto = 1.0 mg/mL
- 3.8 mL de agar + 0.2 mL de la solución de extracto = 0.5 mg/mL
- 3.9 mL de agar + 0.1 mL de la solución de extracto = 0.25 mg/mL
- Un cuadrante con 4.0 mL de agar como control negativo.

Dejar solidificar e incubar a 37°C por 24 horas, para comprobar esterilidad. Guardar en refrigeración hasta el momento de usar.

14.4.2 Preparación del inóculo: Purificar el microorganismo a ensayar inoculándolo en un tubo con 8 mL de agar Mueller Hinton inclinado, incubar 37°C durante 24 horas. Inocular una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5.0 mL de caldo Tripticasa Soya, incubar a 37°C durante 24 h si son bacterias y 48 h si son levaduras. Diluir 0.05 mL de la suspensión anterior en 4.95 mL de agua solución salina estéril (dilución 1: 100).

14.4.3 Demostración de la concentración inhibitoria mínima: Inocular tres estrías en cada uno de los cuadrantes de la caja e incubar a 37°C por 24 h o 48 h si son bacterias o levaduras, respectivamente.

14.4.4 Interpretación de resultados: Actividad negativa: crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo. Actividad positiva: no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo. Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación.



Figura 1. Inflorescencias y hojas de *Cornutia grandifolia*  
Fuente: Foto de la autora



Figura 2. Inflorescencias y hojas de *Cornutia pyramidata*  
Fuente: Foto de la autora

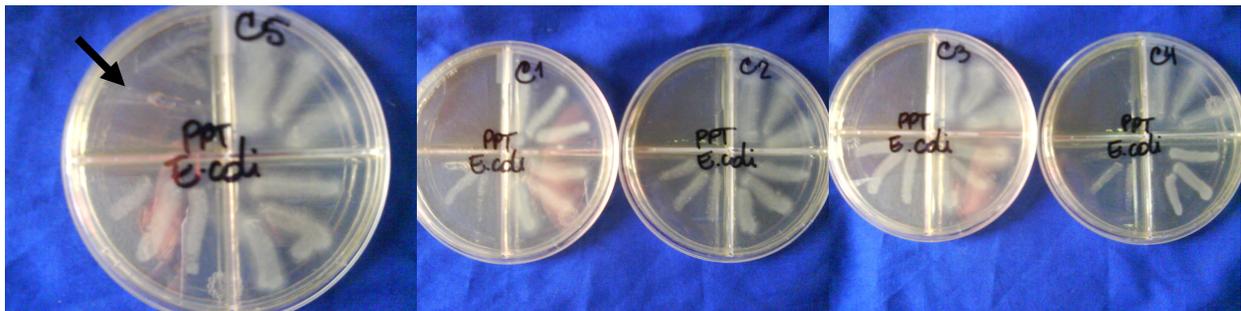


Figura 3. CIM 1 mg/mL (flecha) de la partición de precipitado contra *E. coli*  
Fuente: Foto de la autora



Figura 4. CIM de 0.5 mg/mL (flecha) de la partición de acetato de etilo contra *S. aureus*  
Fuente: Foto de la autora

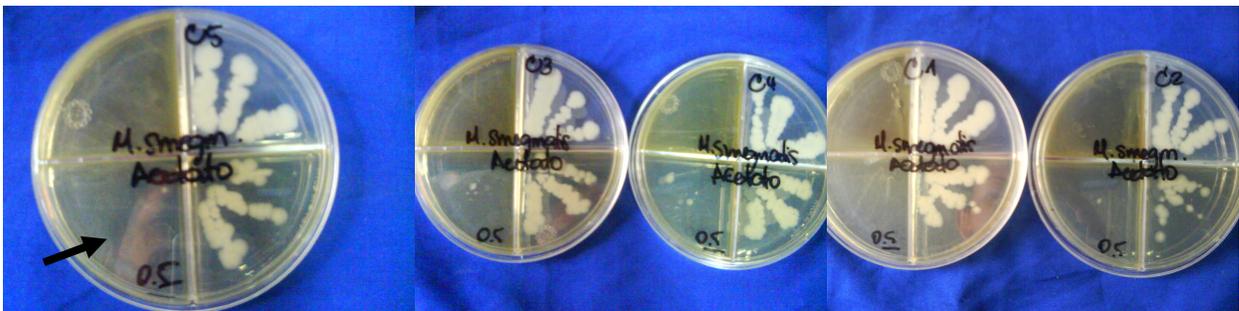


Figura 5. CIM de 0.5 mg/mL (flecha) de la partición de acetato de etilo contra *M. smegmatis*  
Fuente: Foto de la autora

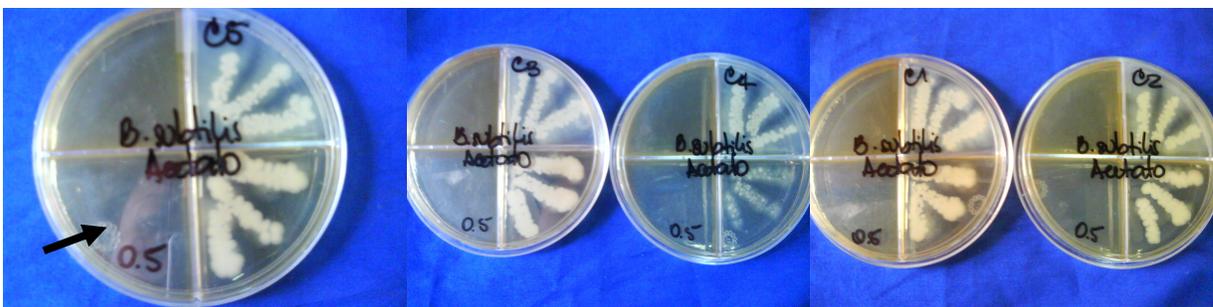


Figura 6. CIM de 0.5 mg/mL (flecha) de la partición de acetato de etilo contra *B. subtilis*  
Fuente: Foto de la autora

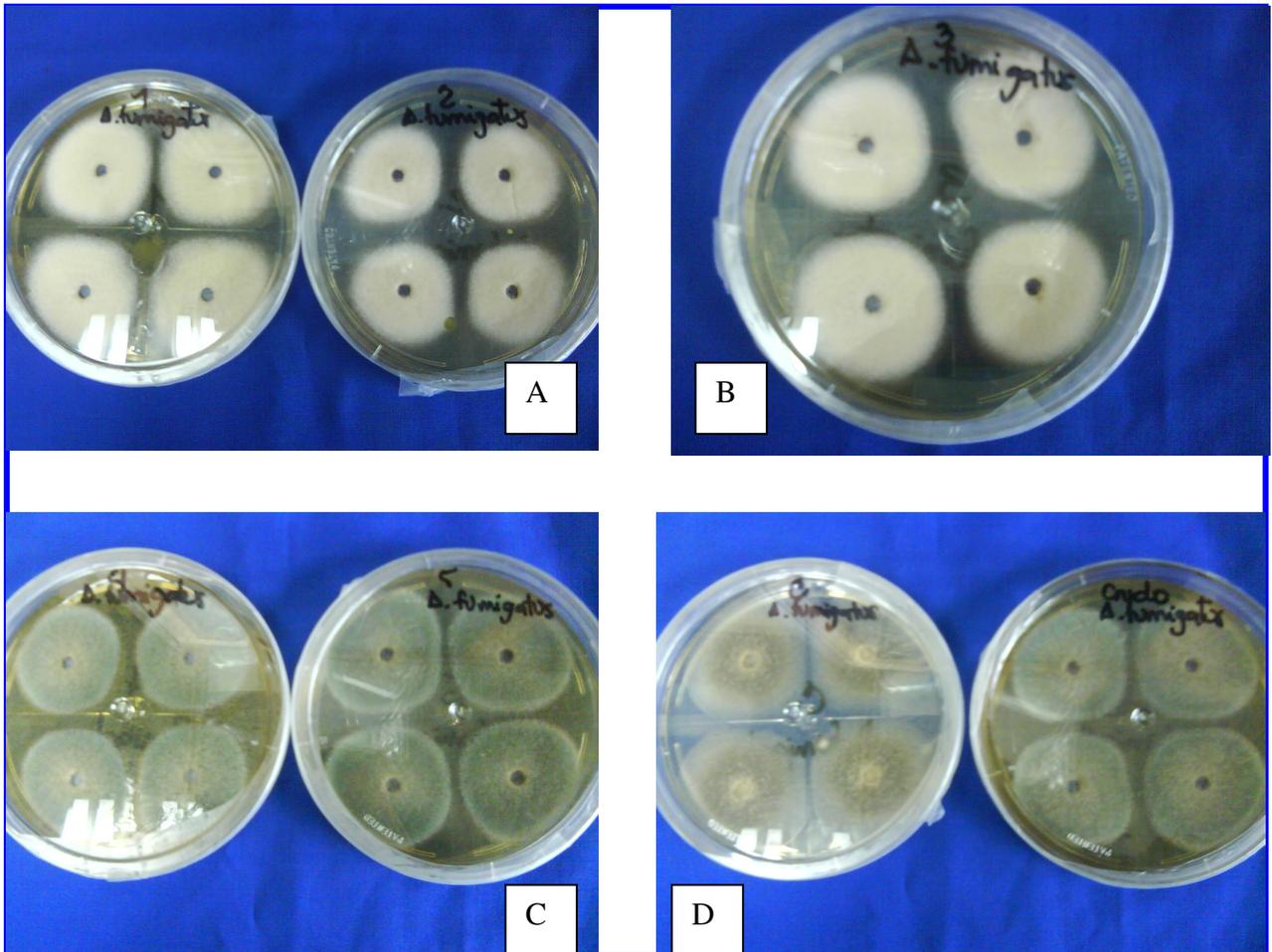


Figura 7. Crecimiento de *A. fumigatus* en particiones de precipitado y hexánica (A); clorofórmico (B); acetato de etilo y metanólico (C); control negativo y extracto crudo (D). Obsérvese la despigmentación del hongo en las particiones apolares (A y B)

Fuente: Foto de la autora

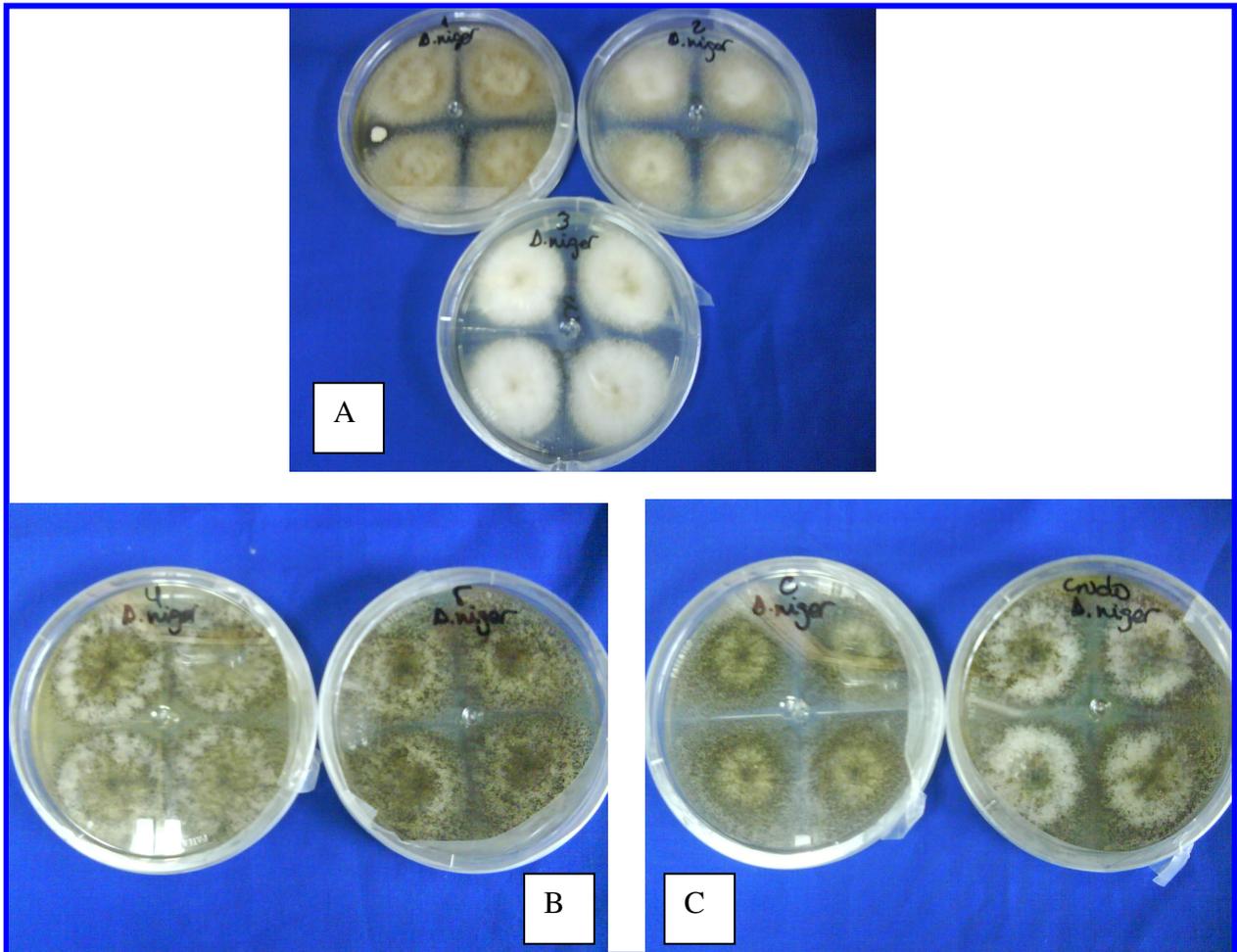


Figura 8. Crecimiento de *A. niger* en particiones de precipitado, hexánica y clorofórmica (A); acetato de etilo y metanólico (B); control negativo y extracto crudo (C). Obsérvese la despigmentación del hongo en las particiones apolares (A).

Fuente: Foto de la autora

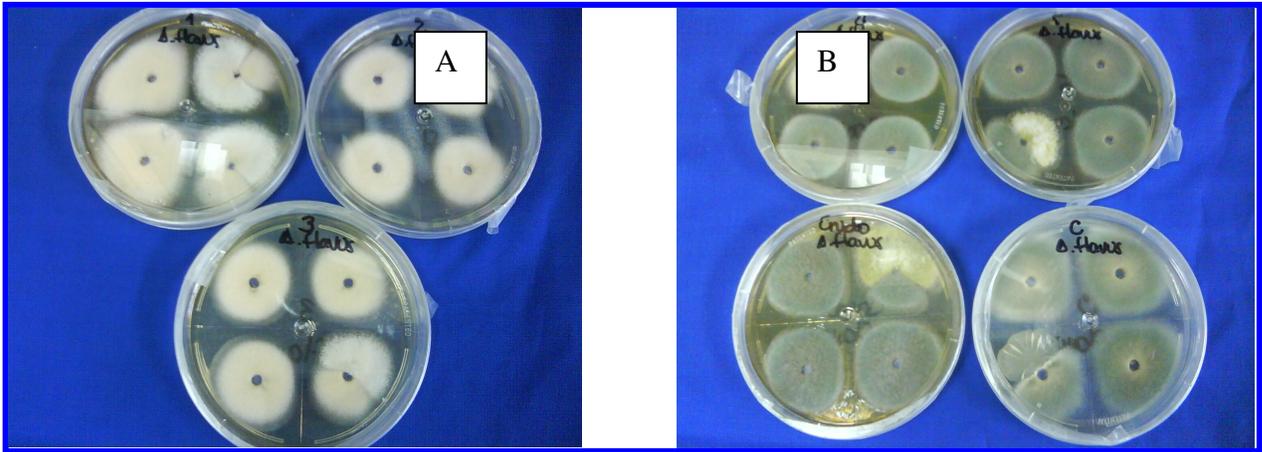


Figura 9. Crecimiento de *A. flavus* en particiones de precipitado, hexánica y clorofórmica (A); acetato de etilo, metanólico, control negativo y extracto crudo (B). Obsérvese la despigmentación del hongo en las particiones apolares (A).

Fuente: Foto de la autora

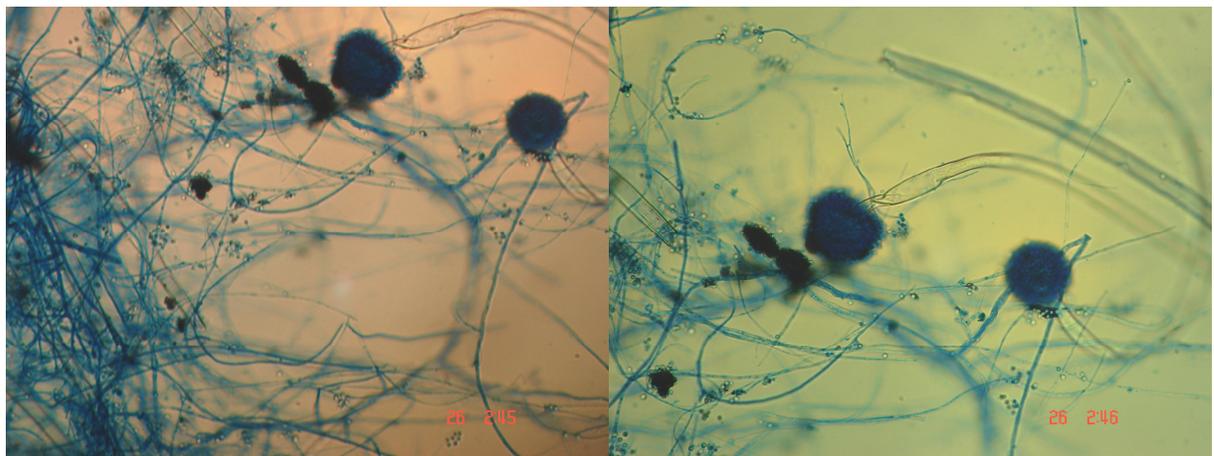


Figura 10. Cabezuelas de *A. niger* obtenidas de crecimiento micelar en agar planta realizado con fracciones apolares (precipitado, hexano, cloroformo) teñidas con azul de lactofenol. Nótese la coloración azul de las mismas.

Fuente: Foto de la autora

Licda. Keila Mariana Guerrero Gutiérrez  
Autora

Lic. Armando Cáceres  
Asesor

M.A. Ana Margarita Paz de Ramírez  
Revisora

MSc. Anne Marie Liere de Godoy  
Directora

Oscar Manuel Cobar Pinto, Ph.D  
Decano