



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA

“Calidad, Pertinencia y Calidez”

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

TRABAJO DE TITULACIÓN

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

TEMA:

EVALUACIÓN COMPARATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS,
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y LETALIDAD DE EXTRACTOS ORGÁNICOS
DE *Cymbopogon citratus* (HIERBA LUISA) Y *Melissa officinalis* (TORONJIL).

ASPIRANTE:

Ruth Elizabeth Vélez Rodríguez

TUTOR:

Haydelba D'Armas, MSc., PhD


MACHALA – EL ORO – ECUADOR

2015

CERTIFICACIÓN

Dra. Haydelba D'Armas, MSc., PhD, Prometeo de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud, tutora del presente Trabajo de Titulación cuyo tema es: **“EVALUACIÓN COMPARATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS, ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y LETALIDAD DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE *Cymbopogon citratus* (HIERBA LUISA) Y *Melissa officinalis* (TORONJIL)”**, desarrollada por: RUTH ELIZABETH VÉLEZ RODRÍGUEZ, certifico que el presente trabajo investigativo fue desarrollado por el autor en forma sistemática y de acuerdo con las normas establecidas para proyectos de investigación y que luego de revisar su contenido y forma autorizo su presentación.

Machala, 21 de Mayo del 2015



.....
Dra. Haydelba D'Armas, MSc., PhD

TUTORA

RESPONSABILIDAD

Yo, **RUTH ELIZABETH VÉLEZ RODRÍGUEZ**, autor del presente trabajo de titulación con tema: **“EVALUACIÓN COMPARATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS, ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y LETALIDAD DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE *Cymbopogon citratus* (HIERBA LUISA) Y *Melissa officinalis* (TORONJIL)”**, declaro que la investigación, resultados y conclusiones expuestas en el presente trabajo, son de mi absoluta responsabilidad.

.....
RUTH ELIZABETH VÉLEZ RODRÍGUEZ
AUTOR

CESIÓN DE DERECHO DE AUTORÍA

Yo, **RUTH ELIZABETH VÉLEZ RODRÍGUEZ**, con cedula de identidad **0705850006**, egresada de la escuela de Bioquímica y Farmacia, de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud, de la Universidad Técnica de Machala, responsable del presente trabajo de titulación con tema “**EVALUACIÓN COMPARATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS, ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y LETALIDAD DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE *Cymbopogon citratus* (HIERBA LUISA) Y *Melissa officinalis* (TORONJIL)**”, Durante los meses de SEPTIEMBRE del 2014 hasta ABRIL del 2015, certifico que la responsabilidad de la investigación, resultados y conclusiones del presente trabajo pertenecen exclusivamente a mi autoría, una vez que ha sido aprobado por mi tribunal de sustentación del trabajo de titulación autorizando su presentación.

Deslindo a la Universidad Técnica de Machala de cualquier delito de plagio y cedo mis derechos de autor a la Universidad Técnica de Machala para que ella proceda a darle el uso que crea conveniente.

.....
RUTH ELIZABETH VÉLEZ RODRÍGUEZ

C.I. 0705850006

DEDICATORIA

Al concluir mi carrera profesional, con la presentación de éste trabajo, considero oportuno dedicar mi esfuerzo a mi hija, quien es mi mayor motivo de superación y de lucha, para poder junto a ella y a toda mi familia gozar de un buen porvenir. Este trabajo es para ti:

Génesis Alexandra

AGRADECIMIENTO

Al concluir mi trabajo de titulación, me permito agradecer primeramente a Dios, quien me ha permitido llegar hasta donde estoy y gozar de buena salud brindándome sabiduría e inteligencia. A mis padres, quienes han sido de gran apoyo en todo momento de mi vida. A mi esposo que a más de su ayuda incondicional, me ha sabido comprender y amar a lo largo de esta dura jornada estudiantil.

A mi tutora la Dra. Haydelba D'Armas, MSC., PhD. quien junto a mi cotutora la Dra. Carmita Jaramillo nos han brindado su orientación, ayuda y su tiempo en la realización de este trabajo de investigación.

Ruth Elizabeth Vélez Rodríguez

LA AUTORA

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se basó en un análisis comparativo de metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana y letal de diferentes extractos de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Melissa officinalis* (toronjil). Se partió de una cantidad de hojas previamente tratadas y procesadas para preparar cada extracto utilizando diferentes solventes y realizar el tamizaje fitoquímico, donde se comprobó la presencia de esteroides, triterpenos y mucilagos en el extracto de hexano y cumarinas, metilencetonas, esteroides, triterpenos, fenilpropanoides, catequinas y mucilagos en el extracto de metanol de *C. citratus*. En el extracto de hexano de *M. officinalis* se detectó la presencia de glicósidos cardiotónicos, cumarinas, metilencetonas, esteroides, triterpenos y mucilagos y el de metanol contiene esteroides, triterpenos, fenilpropanoides, catequinas y mucilagos. En la actividad letal contra larvas de *Artemia salina* el resultado final de las concentraciones letales medias (CL 50) de cada extracto fueron de hexano de hierba luisa, 168,77 µg/ml; de hexano de toronjil, 233,56 µg/ml; de metanol de hierba luisa, 358,03 µg/ml y de metanol de toronjil, 72,25 µg/ml. En la actividad antimicrobiana, a 20 mg/ml el extracto de metanol de hierba luisa posee mayor efecto antibacteriano y el de metanol de toronjil un menor efecto antibacteriano; a 40 mg/ml el extracto con mayor actividad antibacteriana es el hexano de hierba luisa, y con menor el de metanol. Para la actividad antifúngica, el extracto con mayor acción inhibitoria fue el metanólico de hierba luisa, seguido del metanólico de toronjil, y los extractos hexánicos de hierba luisa y toronjil no presentaron actividad antifúngica.

Palabras Claves: *Melissa officinalis*, *Cymbopogon citratus*, Extractos, Tamizaje Fitoquímico, Actividad Letal, *Artemia salina*, Actividad Antimicrobiana.

ABSTRACT

This research was based on a comparative analysis of secondary metabolites, antimicrobial and lethal activity of different extracts of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) and *Melissa officinalis* (lemon balm). It began with a number of previously treated leaves and processed to prepare each extract using different solvents and perform the phytochemical screening, where the presence of sterols, triterpenes and mucilage was found in the hexane extract and coumarins, metilencetonas, sterols, triterpenes, phenylpropanoids, catechins and mucilage in the methanol extract of *C. citratus*. In the hexane extract of *M. officinalis* the presence of cardiac glycosides, coumarins, metilencetonas, sterols, triterpenoids and mucilages detected and methanol contains sterols, triterpene, phenylpropanoids, catechins and mucilages. In the lethal activity against larvae of *Artemia salina* the outcome of the median lethal concentration (LC 50) of each hexane extract were verbena, 168.77 ug / ml; hexane balm, 233.56 ug / ml; methanol verbena, 358.03 ug / ml and methanol balm, 72.25 mg / ml. In the antimicrobial activity, a 20 mg / ml of methanol extract of verbena has greater antibacterial effect and methanol *Melissa* lower antibacterial effect; 40 mg / ml extract more antibacterial activity is hexane verbena, and less that of methanol. For the antifungal activity, the extract was more inhibitory action was the methanol verbena, lemon balm followed by methanol, and hexane extracts of verbena and lemon balm herb showed no antifungal activity.

Keywords: *Melissa officinalis*, *Cymbopogon citratus*, Extracts, Screening Phytochemical, Lethal Activity, *Artemia salina*, Antimicrobial Activity.

ÍNDICE

RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
INTRODUCCIÓN	XVI
PROBLEMA	XVIII
JUSTIFICACIÓN	XX
OBJETIVOS	XXI
OBJETIVO GENERAL	XXI
OBJETIVOS ESPECIFICOS	XXI
1. MARCO REFERENCIAL	22
1.1. HIERBA LUISA (<i>Cymbopogon citratus</i>)	22
1.1.1. Descripción	22
1.1.2. Composición Química	22
1.1.3. Propiedades y Aplicación	22
1.2. TORONJIL (<i>Melissa officinalis</i>)	23
1.2.1. Descripción	23
1.2.2. Composición Química	23
1.2.3. Propiedades y Aplicación	24
1.3. EXTRACTOS VEGETALES	24
1.3.1. Definición	24
1.3.2. Características	24
1.3.3. Clasificación	25
1.3.3.1. Extractos blandos	26

1.3.3.2.	Extractos firmes _____	26
1.3.3.3	Extractos secos _____	26
1.3.3.4	Extractos fluidos _____	26
1.3.4	Extracción _____	26
1.3.5	Conservación _____	27
1.4	TAMIZAJE FITOQUÍMICO _____	28
1.4.1	Definición _____	28
1.4.2	Metabolitos Secundarios _____	29
1.4.2.1	Terpenos _____	29
1.4.2.2	Saponinas _____	31
1.4.2.3	Alcaloides _____	31
1.4.2.4	Cumarinas _____	31
1.4.2.5	Flavonoides _____	32
1.4.2.6	Quinonas _____	33
1.4.2.7	Taninos _____	33
1.4.3	Importancia de los metabolitos secundarios _____	34
1.5.	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA _____	34
1.5.1.	Definición _____	34
1.5.2.	Sustancia antimicrobiana _____	35
1.5.3.	Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana _____	36
1.5.4.	Método de difusión en agar _____	36
1.5.5.	Método de dilución en caldo o agar _____	37
1.5.6.	Factores que influyen en la actividad antimicrobiana _____	37
1.5.6.1.	Profundidad del agar _____	37
1.5.6.2.	Concentración del inóculo _____	38
1.5.6.3.	Temperatura de incubación _____	38

1.5.6.4.	Naturaleza del borde del halo de inhibición _____	39
1.5.6.5.	Composición química del medio de agar _____	39
1.5.6.6.	Tiempo de incubación _____	40
1.5.6.7.	Volumen de la concentración del antibiótico a servir _____	40
1.5.7.	Medios de Cultivo _____	41
1.5.7.1.	Mueller Hinton _____	41
1.5.7.2.	Papa dextrosa _____	41
1.5.8.	Cepas Bacterianas _____	41
1.5.8.1.	<i>Staphylococcus aureus</i> _____	41
1.5.8.2.	<i>Escherichia coli</i> _____	42
1.5.8.3.	<i>Pseudomona aeruginosa</i> _____	43
1.5.9.	Cepas Fúngicas _____	43
1.5.9.1.	<i>Candida albicans</i> _____	43
1.6.	ACTIVIDAD LETAL _____	44
1.6.1.	Definición _____	44
1.6.2.	Bioensayo de <i>Artemia salina</i> _____	44
1.6.3.	<i>Artemia Salina</i> _____	44
1.6.4.	Importancia del Bioensayo de <i>Artemia salina</i> _____	45
2.	DISEÑO METODOLÓGICO _____	47
2.1.	Localización de la Investigación. _____	47
2.2.	Universo de trabajo. _____	47
2.3.	Tipo de muestra. _____	47
2.4.	Materiales. _____	47
2.4.1.	Materiales de laboratorio _____	47
2.4.2.	Otros materiales _____	48
2.4.3.	Equipos _____	48

2.4.4.	Sustancias	49
2.5.	MÉTODOS	50
2.5.1.	Tipo de Investigación	50
2.5.2.	Selección de las muestras	50
2.5.3.	Procesamiento del material vegetal	50
2.5.4.	Preparación de extractos orgánicos	51
2.5.5.	Tamizaje fitoquímico	51
2.5.6.	Actividad Biológica antimicrobiana	57
2.5.7.	Actividad tóxica o letal	58
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
3.1.	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS	60
3.2.	TAMIZAJE FITOQUÍMICO	61
3.3.	ACTIVIDAD LETAL	65
3.4.	ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	71
3.5.	ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	74
4.	CONCLUSIONES	766
5.	RECOMENDACIONES	77
6.	BIBLIOGRAFÍA	787
	ANEXOS	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Rendimiento porcentual (%) de los extractos hexánicos y metanólicos de las plantas en estudio _____	60
Tabla 2.- Familia de metabolitos secundarios presentes en los diferentes extractos de las plantas en estudio _____	61
Tabla 3.- Metabolitos detectados por Cromatografía en Capa Fina. _____	63
Tabla 4.- Citotoxicidad del extracto de hexano de <i>C. citratus</i> frente a <i>A. salina</i> ____	65
Tabla 5.- Concentración letal media (CL ₅₀) del extracto de hexano de <i>C. citratus</i> ____	65
Tabla 6.- Citotoxicidad del extracto de hexano de <i>M. officinalis</i> frente a <i>A. salina</i> ____	66
Tabla 7.- Concentración letal media (CL ₅₀) del extracto de hexano de <i>M. officinalis</i> _	66
Tabla 8.- Citotoxicidad del extracto de metanol de <i>C. citratus</i> frente a <i>A. salina</i> ____	67
Tabla 9.- Concentración letal media (CL ₅₀) del extracto de metanol de <i>C. citratus</i> ____	67
Tabla 10.- Citotoxicidad del extracto de metanol de <i>M. officinalis</i> frente a <i>A. salina</i>	68
Tabla 11.- Concentración letal media (CL ₅₀) del extracto de metanol de <i>M. officinalis</i>	68
Tabla 12.- Valores del % de mortalidad correspondientes al ensayo de <i>A. salina</i> en los diferentes extractos _____	69

Tabla 13.- Valores de CL_{50} correspondientes al ensayo de *A. salina* _____ 70

Tabla 14.- Actividad antibacteriana de una solución de 20 mg/ml de los extractos __ 71

Tabla 15.- Actividad antibacteriana de una solución de 40 mg/ml de los extractos.__ 72

Tabla 16.- Actividad antifúngica de los extractos estudiados. _____ 74

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.-** Variación de los valores de la masa y rendimiento porcentual (%) de extracción de las plantas en estudio. _____ 60
- Figura 2.-** Representación de los porcentajes de los diferentes metabolitos en los extractos en estudio _____ 62
- Figura 3.-** Variación del % de mortalidad en los extractos ensayados. _____ 69
- Figura 4.-** Representación de los valores de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana de una solución de 20 mg/ml de los extractos en estudio. _____ 71
- Figura 5.-** Representación de los valores de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana de una solución de 40 mg/ml de los extractos en estudio. _____ 73
- Figura 6.-** Representación de los valores de los halos de inhibición de la actividad antifúngica de una solución de 20 mg/ml y 40 mg/ml de los extractos en estudio. __ 74

INTRODUCCIÓN

El aprovechamiento por el hombre de las plantas aromático-medicinales hay que buscarla en la más remota antigüedad, según consta en diversos testimonios históricos pertenecientes a distintas civilizaciones y culturas. El hombre las usó inicialmente, a imitación de los animales, guiado por su instinto, después empíricamente, y más tarde de forma más racional, conociendo sus propiedades terapéuticas de forma progresiva, con los avances tecnológicos (Muñoz, 1996).

Todas las culturas han adquirido un conocimiento de las plantas o de los órganos vegetales usados en medicina. Los más antiguos documentos escritos, con aproximadamente 6000 años de antigüedad, incluyen descripciones de plantas utilizadas como medicinales en esa época. Se creía que existían personas superdotadas para reconocer las plantas medicinales, las venenosas o ambas. Poco a poco se fueron transmitiendo los conocimientos terapéuticos de las plantas y consecuentemente surgieron las drogas medicinales y el desarrollo de la farmacognosia (encargada del estudio de las plantas medicinales, su historia, comercio, recolección, selección, identificación, y de la conservación de drogas elaboradas a partir de estas y de las materias primas que las producen).

Hasta el siglo XVIII se conocían las propiedades curativas de las plantas, su efecto sobre el organismo y su modo de aplicación, pero se desconocían sus principios activos. Con el desarrollo de las teorías de la evolución y herencia genética, el uso del microscopio y el nacimiento de ciencias como la fitoquímica y de técnicas como el análisis instrumental, fue posible el reconocimiento y el aislamiento de los principios activos de muchas plantas medicinales (Fonnegra *et al.*, 2007)

Las plantas medicinales son aquellos vegetales que elaboran unos productos llamados principios activos, que son sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo. Su utilidad primordial, a veces específica, es servir como droga o medicamento que alivie la enfermedad o restablezca la salud perdida; es decir, que tienden a disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico que es la enfermedad.

Los principios activos son los que definen y sirven para clasificar a estas plantas y el principal criterio para su selección y mejora, el control del rendimiento y calidad de productos del cultivo y procesado industrial, así como los que dotan a la planta de sus propiedades y usos terapéuticos.

Las hojas de las plantas constituyen uno de sus órganos más interesantes, pues en ellas tienen lugar la mayoría de los procesos metabólicos de la planta; parte de estas hojas, que reciben la savia bruta a través del tallo, mediante la acción de unos complejos enzimáticos o fermentos que contienen, elaboran dos clases de compuestos nitrogenados: las proteínas (nutrientes imprescindibles para la vida) y los alcaloides (principios activos de acción fisiológica específica y energética). Las hojas que además del agua del suelo reciben la energía solar, absorben el anhídrido carbónico del aire (CO₂) y realizan la fotosíntesis de compuestos orgánicos, los glúcidos, que se producen en los cloroplastos de las hojas que contienen clorofila.

Una parte de los glúcidos formados en la fotosíntesis constituyen los elementos de reserva de la planta, que ésta almacena en sus diferentes órganos y forman nuevas células vegetales. Otra parte se transforman en compuestos secundarios: los lípidos y sus aceites; los terpenos y componentes aromáticos, de cuyo conjunto se forman las esencias y resinas; los heterósidos, combinaciones de azúcares y sustancias activas; los ácidos orgánicos.

Las plantas también elaboran en su metabolismo los taninos, vitaminas, sustancias antibióticas y concentran los elementos minerales (Muñoz, 1996).

La utilización de compuestos orgánicos en el tratamiento de la infección se conoce desde la antigüedad, tan solo los aztecas tuvieron el conocimiento; de cuya utilización se logran rescatar una gran cantidad de plantas que hoy en día son procesadas para obtener una gran variedad de antibióticos, aunque no hay que olvidar a los extractos de ciertas plantas medicinales que se han utilizado durante siglos (Cruz, 2001).

PROBLEMA

Muchas de las plantas medicinales, entre ellas hierbaluisa y toronjil, son empleadas por los beneficios que brindan, siendo algunos de estos y los más principales y conocidos por los pobladores el alivio contra los dolores estomacales al prepararlos en infusiones, por sus aromas se emplean en la aromaterapia, en la reanimación de desmayados, como calmante natural, como repelente de mosquitos, entre otros.

Gracias a la tradición oral y escrita sobre la medicina popular se sabe que el hombre desde tiempos remotos ha conocido y aprovechado la actividad curativa de un sin número de hierbas. A pesar de los avances en la producción de la medicina “moderna”, las plantas medicinales han perdido su importancia. Por el contrario, el desarrollo de los medicamentos modernos ha sido resultado de formas cada vez más complejas de aprovechar las plantas medicinales, y su producción sigue dependiendo en gran parte del uso de estas plantas como materia prima (Hoogesteger, 1994).

Ecuador cuenta con centenares de plantas aromáticas y medicinales. Por lo tanto, en el país el uso de plantas medicinales está inmerso en la cotidianidad de sus habitantes. La medicina popular se practica principalmente por habitantes de zonas rurales, pero también por ciudadanos de toda clase social. Se pueden encontrar gran variedad de plantas con usos medicinales que se expenden en mercados de la Sierra, Costa y Amazonía (De La Torre *et al.*, 2008).

Sin embargo, estas prácticas se basan solamente en el conocimiento empírico y en la experiencia de los pueblos puesto que las características antimicrobianas de las plantas no han sido validadas científicamente, hecho comprobado mediante una exhaustiva búsqueda de información la investigación sobre actividad antimicrobiana y letal de plantas medicinales.

Se han utilizado diversas técnicas microbiológicas para demostrar la actividad antimicrobiana de plantas frente a microorganismos patógenos para el hombre. Entre ellas la utilización de extractos. El extracto de plantas es una mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenible por procesos físicos y/o químicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología; en general, los extractos son soluciones diluidas de metabolitos secundarios (Ortuño, 2006).

Estos antimicrobianos de origen vegetal tienen un potencial terapéutico enorme. Son eficaces en el tratamiento de enfermedades infecciosas y al mismo tiempo pueden mitigar muchos de los efectos secundarios que se asocian a menudo con antimicrobianos sintéticos (Joshi *et al.*, 2009).

Es bien conocido que muchas plantas pueden ocasionar reacciones tóxicas a quienes las utilizan y que poseen actividades biológicas diversas; por esta razón, se llevará a cabo una investigación en las plantas hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) y toronjil (*Melissa officinalis*), con el propósito de determinar la composición química y acción farmacológica, de las plantas medicinales mencionadas previamente.

JUSTIFICACIÓN

El aumento de la confianza en el uso de plantas medicinales y productos derivados se ve reflejado por su empleo mayoritario tanto en países en vías de desarrollo (80%), como en los países desarrollados (50-60%). Esta realidad se puede potenciar aún más en un país como el Ecuador, poseedor de una enorme biodiversidad y de un importante bagaje de conocimientos ancestrales sobre el empleo de plantas como alternativa curativa (Oliveira *et al*, 2005).

En Ecuador se usa ampliamente en las comunidades rurales un sin número de plantas medicinales, sin que todas estas tengan un estudio científico de sus propiedades. Tal es el caso de la hierba luisa y el toronjil, que son usadas por la población rural con la creencia de que posee grandes propiedades medicinales para aliviar diferentes afecciones, siendo utilizada como calmante, antiinflamatorio, contra el dolor de estómago y afecciones cutáneas en general (Cabrera y otros, 2005).

Por esta razón, este trabajo de investigación se enfocó en un análisis comparativo de las plantas *C. citratus* (hierba luisa) y *M. officinalis* (toronjil) para conocer que metabolitos secundarios se encuentran presentes en cada una de estas especies, debido a que son aquellos las que brindan una acción terapéutica o toxica a las plantas. Así mismo conocer si poseen actividad antimicrobiana frente a varios microorganismos y actividad letal contra *A. salina* (indicador de actividad antitumoral). Estudio que nos servirá para obtener y brindar un amplio conocimiento a la población que emplea estas especies sobre la composición química y el porqué de sus propiedades medicinales, de tal manera que se pueda emplear como principios activos en la elaboración de fitofármacos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar comparativamente metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana y letalidad de extractos orgánicos de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Melissa officinalis* (toronjil).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Procesar las hojas de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) y toronjil (*Melissa officinalis*).
- Obtener los distintos extractos orgánicos de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) y toronjil (*Melissa officinalis*).
- Detectar la presencia de los tipos de metabolitos secundarios presentes en los extractos.
- Comprobar la actividad antibacteriana y antifúngica de las hojas de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) y toronjil (*Melissa officinalis*).
- Determinar la actividad letal de los extractos de las plantas en estudio contra *Artemia salina*.

1. MARCO REFERENCIAL

1.1. HIERBA LUISA (*Cymbopogon citratus*)

1.1.1. Descripción

Cymbopogon citratus es una hierba perenne, robusta, de tallos muy ramificados de 1-2m de altura, con nudos ceríferos. Sus ramas son alargadas y un tanto penduladas, con hojas aromáticas amontonadas cerca de la base, glaucas, de 60-100cm de largo. Presenta inflorescencia amarilla en espiga. No florece o lo hace muy rara vez en el trópico. El periodo de brotación, al realizar la plantación, es de 10-15 días, comenzando el ahijamiento a los 20-30 días y alcanzando maduración fisiológica a los 180 días, siempre que la plantación haya recibido fertilización, control de malezas, riego y control fitosanitario (Soto *et al.*,1984).

1.1.2. Composición Química

Las hojas y sumidades contienen del 0,20 al 0,25% de aceite esencial, cuyos componentes mayoritarios son: limoneno, citral, geraniol, 40-45% de sesquiterpenos, verbenona, aldehído y cetonas (Muñoz, 1996).

1.1.3. Propiedades y Aplicación

Es un excelente estimulante digestivo, estomacal y antiespasmódico, y útil en todo tipo de trastornos digestivos. Es un ingrediente de varios licores famosos por sus valiosas propiedades digestivas.

Es un buen febrífugo, tomado como tisana o infusión hecha de las hojas secas o frescas. Esta constituye una deliciosa y refrescante bebida de verano. Es también moderadamente sedante, el igual que lo es su aceite esencial, así que puede considerarse como otro de los diversos aceites esenciales útiles para combatir el insomnio. Si se

utiliza por la noche en forma de baños con este fin, ser extremadamente cuidadosos, pues más de dos o tres gotas para un baño de tamaño corriente ocasionara picores y ampollas en la piel (Muñoz, 1996).

La infusión de hojas es un tónico, estomacal, sedante, carminativo (previene y elimina gases) y antineurálgico. La maceración es empleada para vértigos (mareos), neuralgias y trastornos digestivos. Las compresas y trituración (masticación) a base de hojas, ayuda a calmar el dolor dental. El vapor del cocimiento, empleado en baños terapéuticos, sirve para calmar la excitación nerviosa (Reto *et al.*, 2002).

1.2. TORONJIL (*Melissa officinalis*)

1.2.1. Descripción

Es una planta perenne, arbustiva, que crecen en ramilletes y que suelen alcanzar entre los 40 y 70 cm de altura. Sus hojas son opuestas, dentadas, rugosas o desprenden un intenso aroma a limón. Las flores son irregulares, blancas o ligeramente rosadas. La flora europea dos subespecies de esta planta y solo una de ellas es cultivable: *M. officinalis ssp.* (Muñoz *et al.*, 1999).

1.2.2. Composición Química

Desde el punto de vista de la acción farmacológica, el aceite esencial (0,05%) es el que ha sido objeto de mayor atención. Se caracteriza por la presencia de aldehídos monoterpénicos: citral (20-30%, citronelal (30-40%), metilheptenona, geranil acetato, β -cariofileno, oxido de β -cariofileno y una docena de otros compuestos, principalmente terpenoides (Muñoz *et al.*, 1999).

1.2.3. Propiedades y Aplicación

Es una planta utilizada como sedante en el tratamiento del insomnio de origen nervioso. Recomendada en disturbios funcionales gastrointestinales; antiespasmódica. Desde mucho tiempo se conoce el “agua de las carmelitas”, de cuya composición forma parte la melissa junto a otros aceites esenciales. Se administra como carminativo en dispepsias, meteorismo y otros malestares gástricos. Se dice eficaz en el alivio del tratamiento del herpes (Muñoz *et al.*, 1999).

La infusión de hojas y flores de toronjil se utiliza en la histeria, ansiedad, nerviosismo, pues actúa como un buen sedante. A nivel del sistema digestivo es capaz de eliminar gases debido a su propiedad antiflatulenta. Tomando la infusión caliente y acostándose a la cama es un buen sudorífico debido a su propiedad diaforética (Reto *et al.*, 2002).

1.3. EXTRACTOS VEGETALES

1.3.1. Definición

Se han definido como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol o éter, de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca (Ruíz y Susunaga, 2000).

1.3.2. Características

Estudios realizados permitieron fundamentar las siguientes características específicas de los extractos (Corpas y Barreto, 1988):

- Los extractos bien preparados son de color más o menos oscuros, cuando han sido preparados al vacío, son ligeramente más claros.

- Algunos son de color café amarillento, otros rojizos, los extractos provenientes de hojas son verdosos debido a la clorofila.
- Su aspecto debe ser liso, fino y homogéneo.
- Su olor y sabor son propiedades características de la materia prima que les ha dado su origen. Cuando son mal preparados, adquieren olor a caramelo o confitura poco conocida.
- La solubilidad de los extractos es variable y está en relación directa con el tipo de preparación al cual fueron sometidos.
- Los extractos acuosos son completamente solubles en agua y producen una solución transparente, algunas veces ligeramente, algunos veces ligeramente turbia, debido a que han sido preparados con mucha anterioridad.
- Los extractos alcohólicos son parcialmente solubles en agua y algunas veces son totalmente insolubles, especialmente los extractos que han sido preparados con alcohol fuerte tienen un excelente índice de disolución, en el mismo título alcohométrico del alcohol con el cual han sido preparados.
- Los extractos alcohólicos preparados con hojas, dan soluciones coloreadas de verde, pues la eliminación de la clorofila no puede ser total. Cordell (1995) propuso ensayos generales para someter a los extractos a pruebas específicas para observar su calidad y composición final. Estos trabajos fueron remontados por Copas, quien propuso realizar ensayos de identidad a los extractos obtenidos (Barreto, 1997).

1.3.3. Clasificación

De acuerdo con este aspecto comúnmente los extractos se clasifican en cuatro grupos: blandos, firmes, secos y fluidos (Barreto, 1997).

1.3.3.1. Extractos blandos

Tienen la consistencia de la miel espesa, algunas veces, debido a la absorción de la humedad atmosférica, presentan una consistencia menos densa (Barreto, 1997).

1.3.3.2. Extractos firmes

Como su nombre lo indica deben tener una estrecha semejanza con la masa con al cual se fabrican o manufacturan las píldoras, deben tener la característica especial de no adherirse a los dedos (Barreto, 1997).

1.3.3.3 Extractos secos

Anteriormente se les conocía con la denominación de “sales esenciales”. Son los extractos en los cuales el disolvente ha sido casi completamente eliminado. Contiene tan solo del 5 al 8% de agua. Se reducen fácilmente a polvo y facilitan su manipulación y dosificación. La forma farmacéutica de extractos secos aparece en varias farmacopeas (Belga, Norteamericana, Noruega y Mexicana), pero no indican un método exacto para la preparación de este tipo de extractos (Barreto, 1997).

1.3.3.4 Extractos fluidos

Son preparados en una forma tal que el peso del extracto corresponde exactamente al peso de la sustancia empleada como medicamento, desecada al aire y pulverizada (Barreto, 1997).

1.3.4 Extracción

Deben obedecer a la información de la naturaleza química de las sustancias presentes en la planta y al propósito de la investigación. En el caso de búsqueda de sustancias para la comprobación de actividad biológica, la extracción del material vegetal debe hacerse en

agua o con solución disotónica (0,9% NaCl). Frecuentemente se usa la extracción con solventes orgánicos de bajo punto de ebullición (alcohol, acetato de etilo) y de baja reactividad. Los extractos son evaporados bajo presión reducida o liofilizados, en el caso de extracción con agua (Arévalo, 1996).

Los métodos de extracción se basan en las diferentes solubilidades de los diversos compuestos encontrados en el material vegetal, así, para sustancias de baja polaridad (lípidos) se utilizan como solventes el éter de petróleo y cloroformo; para sustancias de mediana y alta polaridad el acetato de etilo, el etanol y la acetona. Las extracciones pueden hacerse por “extracción continua en soxhlet”, en la cual el material seco se sitúa en una cámara central y el solvente se hace evaporar en caliente, en un recipiente inferior, el vapor del solvente asciende al condensador y gotea sobre el material vegetal. Por “reflujo”, el material vegetal y el solvente se colocan en un balón el cual tiene acoplado un refrigerante, se calienta, el solvente evaporado se condensa y vuelve a mezclarse con el material vegetal. Y por “maceración en frío”, el material se mezcla con el solvente triturado continuamente en frío (Arévalo, 1996).

1.3.5 Conservación

Los extractos son medicamentos en donde la alteración modifica y varía notoriamente la naturaleza del producto. Algunos extractos se descomponen al aire, otros absorben humedad atmosférica. Algunos se recubren de hongos y permiten el desarrollo de gérmenes bacterianos. Por otra parte las alteraciones más frecuentes consisten en modificaciones químicas no aparentes como sucede con los extractos de flores verdes que por la oxidación de la clorofila pierden su color. Los extractos a base de alcaloides, bajan de título. Esta disminución, es especialmente sensible a los extractos blandos y firmes y bastante menos notorio en los extractos secos (Barreto, 1997).

Según (Corpas Y Barriga, 1993), la conservación de los extractos es indispensable y deben cumplir las siguientes condiciones:

- a. Se deben conservar protegiéndolos de la luz.

- b. Los envases deben estar bien tapados.
- c. Se deben conservar en un medio ambiente seco.

Desde luego, son numerosos los métodos que se han indicado para la conservación de los extractos. Se pueden clasificar en dos categorías (Barreto, 1997).

En el primer grupo tenemos aquellos a los cuales no se les ha adicionado ninguna materia extraña. Al segundo grupo, por el contrario, pertenecen aquellos extractos que han sido objeto de la adición de productos extraños, de naturaleza físico-química definida (Barreto, 1997).

1.4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

1.4.1 Definición

El tamizaje fotoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. Permite la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo.

Así, cuando una planta revela acción sobre el sistema nervioso central durante el tamizaje farmacológico y presencia de alcaloides en el tamizaje fitoquímico, es bastante probable que la acción farmacológica se deba a la fracción alcaloidal. De la misma manera, el hecho de evidenciarse acción anti-inflamatoria en el tamizaje farmacológico y la presencia de flavonoides en el tamizaje fitoquímico, puede dar lugar a procesos de aislamiento y sometimiento a pruebas más específicas de estos compuestos. Efectos catárticos pueden ser asociados a las antraquinonas. La presencia de glicósidos

cianogénicos durante la marcha fitoquímica puede dar lugar a la descartación de la planta por su alta toxicidad (Sharapin, 2000).

1.4.2 Metabolitos Secundarios

Son sustancias que tienen una estructura compleja, que pueden presentarse en una especie o en especies afines. Su función en la planta es poco conocida. Estos metabolitos secundarios están presentes en concentraciones muy bajas, los que ejercen un efecto fisiológico y farmacológico sobre el hombre. También estos metabolitos son usados comercialmente como compuestos activos para la elaboración de productos farmacéuticos, sabores, fragancias y pesticidas (Vega, 2001).

Los metabolitos secundarios son biosintetizados a partir de los metabolitos primarios, mediante un metabolismo especial o secundario y, con una distribución restringida a ciertos grupos de plantas. A diferencia de los primarios, en la mayoría de los casos se desconoce la función que desempeñan en los organismos que les contienen. Como ejemplos podemos citar: alcaloides, flavonoides, terpenoides, etc. (Montiel, 1978).

1.4.2.1 Terpenos

Los terpenos son compuestos que resultan de la polimerización de unidades isoprenicas (isopentenil pirofosfato [IPP] y su isómero dimetilal pirofosfato [DMAPP]), moléculas de 3 átomos de carbono que proceden del ácido mevalónico. Se clasifican según el número de átomos de carbonos (siempre múltiplos de 3) que los constituyen (Castillo y Martínez, 2007).

- Monoterpenos.- son compuestos de 10 carbonos que derivan del geranilpirofosfato. Esta molécula puede ciclar por acción de monoterpenos acíclicos, monocíclicos y bicíclicos. Los Monoterpenos junto con los sesquiterpenos, los compuestos aromáticos y las moléculas no volátiles, constituyen los aceites esenciales de las plantas.

- Iridoides.- son monoterpenos que derivan del geranilpírofosfato y se caracterizan por presentar un esqueleto bicíclico, denominado iridano, en el cual uno de los ciclos es ciclopentano. Si el ciclopentano no está abierto, dando como resultado una función aldehído, se denominan secoiridoides, estos suelen aparecer en forma de heterósidos y tienen un papel fundamental como precursores en la síntesis de alcaloides, sobre todo los de tipo indólico. La estructura hemiacetálica de la genina parece estar relacionada con una actividad antitumoral y antimicrobiana, aunque también se utilizan como tónicos amargos o como antiinflamatorios.

- Sesquiterpenos.- Son terpenos con 15 átomos de carbono que derivan del farnesilpírofosfato. Los sesquiterpenos pueden ser moléculas acíclicas, mono, bi, tricíclicas e incluso unos pocos tetracíclicas. Los sesquiterpenos e poco o ningún grado de funcionalidad se pueden obtener por destilación como componentes de los aceites esenciales. Presentan actividad antifúngica, antibiótica, antiinflamatoria o espasmolítica, según casos.

- Diterpenos.- Son terpenos con 20 átomos de carbono, formados a partir del geranilgeraniol pírofosfato que deriva de la adición de un IPP al farnesilpírofosfato. Algunos diterpenos tienen actividad anticancerígena y/o citotóxica, también se les atribuyen otras actividades terapéuticas, entre las que destacan la antibacteriana, la antifúngica, la antirretroviral y la antioxidante de algunos diterpenos fenólicos.

- Triterpenos.- Son compuestos con 30 átomos de carbono, que resultan de la ciclación del epoxiscualeno la mayoría con estructura tetra o pentacíclica. Dentro de este grupo se incluyen los esteroides (moléculas con estructura perhidrociclopentano-fenantreno). Por su actividad farmacológica destacan las saponinas y los heterósidos cardiotónicos.

1.4.2.2 Saponinas

Son heterósidas cuya genina (llamada sapogenina) puede ser triterpénica o esteroídica, las sapogeninas triterpénicas pueden tener una estructura pentacíclica. Los saponósidos en general son espumantes en soluciones acuosas y hemolíticos. Modifican la permeabilidad de la membrana celular, por lo que en ocasiones se suministran con otros fármacos para mejorar la entrada de estos en la célula. Algunas saponinas triterpénicas tienen actividad espermicida, citotóxica, expectorante y/o antitusiva, cicatrizantes, venoprotectoras, antifúngicas o antiinflamatorias (Castillo y Martínez, 2007).

1.4.2.3 Alcaloides

Desde tiempos inmemoriales se conocen ciertas plantas que producen efectos fisiológicos muy intensos sobre el sistema nervioso central de los animales (incluyendo el hombre), cuyos extractos se usaron para envenenar flechas o para obtener pociones que se utilizaban en ritos religiosos o para curar múltiples dolencias. Estas plantas contienen alcaloides que son bases orgánicas nitrogenadas, generalmente con un anillo heterocíclico de algún tipo y derivan biogénicamente de aminoácidos. Presentan estructuras muy diversas por lo que no constituyen un grupo homogéneo en términos de su estructura, propiedades y fuentes de obtención. Se han clasificado de acuerdo con las fuentes de donde se han aislado (por ejemplo, alcaloides de la Ipecacuana), de acuerdo con la actividad fisiológica (por ejemplo, alcaloides midriáticos) o con base en la estructura química (por ejemplo, alcaloides indólicos). Al utilizarse con propósitos taxonómicos debe considerarse su biogénesis o biosíntesis en las plantas que las producen (Montiel, 1978).

1.4.2.4 Cumarinas

Son los metabolitos C_6C_3 , más característicos. Son lactonas aromáticas cuya biosíntesis suele producirse a partir de ácidos cinámicos, generalmente del ácido p-hidroxicinámico. Se pueden clasificar en 3 grupos: hidroxicumarinas, furanocumarinas y piranocumarinas (Castillo y Martínez, 2007).

Las cumarinas son compuestos ampliamente distribuidos en las plantas, principalmente en las familias Umbeliferae y Rutaceae; se encuentran en todas las partes de la planta desde la raíz a flores y frutos siendo más abundante en estos últimos; se presentan a menudo como mezclas, en forma libre o como glicósidos.

Los desarrollos en los procesos de aislamiento y análisis estructural en estos últimos años han conducido a un marcado incremento en el número de cumarinas aisladas de plantas; ello unido al interés despertado por el amplio rango de actividad biológica que muchas cumarinas han mostrado, como por ejemplo la acción anticoagulante y antibacterial del dicumarol, la acción antibiótica de la novobiacina, la aguda hepatotoxicidad y carcinogenicidad de ciertas aflatoxinas, la actividad astrogénica del cumestrol, la acción fotosensibilizadora de furanocumarinas como el bergapteno y la xantotoxina, entre otros; cabe destacar también las aplicaciones de las cumarinas como saborizantes y en perfumería (Lock, 2001).

1.4.2.5 Flavonoides

Los pigmentos flavonoides, son uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos de constituyentes naturales. Se conoce como diez clases de flavonoides, todos contienen quince átomos de carbono en su núcleo básico y están arreglados bajo un sistema C₆-C₃-C₆, en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C.

Los flavonoides se encuentran generalmente en mezclas como Agliconas y/o glicósidos, aun de las diferentes clases siendo este último más común, en muchos casos debido a la complejidad de la mezcla es más frecuente el estudio de estos compuestos en forma de Agliconas en extractos de plantas previamente hidrolizadas. Se hallan presentes en todas las partes de las plantas, algunas se encuentran más ampliamente distribuidas que otras, siendo más comunes las flavonas y flavonoles, y más restringidas en su ocurrencia las isoflavonas, las chalconas y auronas.

Los flavonoides se emplean desde hace mucho tiempo como colorantes de lana, y actualmente se usan en la conservación de grasas o jugos de frutas debido a las

propiedades antioxidantes de algunas polihidroxi flavonas. Entre otras aplicaciones mencionaremos la de los glucósidos de hidrochalconas como edulcorante, de la rotenona como insecticida, etc (Lock, 2001).

1.4.2.6 Quinonas

Las quinonas naturales son un grupo de compuestos cuya coloración puede ser desde el amarillo pálido hasta casi negro. Se encuentran frecuentemente en la corteza, en el corazón de la madera o de la raíz, y en algunos casos en las hojas, donde su color esta enmascarado por otros pigmentos. En general, están ampliamente distribuidas pero contribuyen en muy pequeña extensión a la coloración de las plantas superiores, a diferencia por ejemplo de los carotenoides y antocianinas; en cambio hacen mayor contribución en las bacterias, hongos y líquenes. Para su mejor estudio las quinonas se subdividen en benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas, quinonas isopropenoides. Pueden además contener diversos grupos funcionales, anillos de furanos o pirano, encontrarse como dímeros, ser parcialmente reducidos como los antranoles y antronas, etc.

Las quinonas han sido reconocidas desde la antigüedad por sus propiedades tintóreas; algunos presentan además otras propiedades como la emodina que es catártica; shikonina, antimicótica, plumbagina, activa para la leishmaniasis, lapachol, cilostatica, bacteriostática, etc (Lock, 2001).

1.4.2.7 Taninos

Son compuestos fenólicos con un peso molecular comprendido entre 500 y 3000 uma. Sus principales características son su capacidad antioxidante –debido al elevado número de grupos hidroxilo- y la capacidad de unirse a proteínas. También pueden ligarse a alcaloides, gelatinas y otros materiales, aunque parece que las interacciones tanino-proteína son la base de sus actividades biológicas. Por su capacidad astringente las plantas con taninos se utilizan frecuentemente como antidiarreicos y en el tratamiento de heridas y quemaduras, favoreciendo la cicatrización de las mismas.

Químicamente hay dos tipos principales de taninos: hidrolizables y no hidrolizables. Presentan una distribución desigual en las plantas; los no hidrolizables están presentes de forma general en los helechos y las gimnospermas, mientras que los hidrolizables solo están presentes en las dicotiledóneas (Castillo y Martínez, 2007).

1.4.3 Importancia de los metabolitos secundarios

A lo largo de la historia, los metabolitos secundarios de las plantas han sido utilizados por la humanidad convirtiéndose en una fuente inagotable de compuestos químicos y complejas sustancias activas, que desde hace muchos años han sido explotadas por el hombre.

Así mismo es importante destacar que a pesar de todos los esfuerzos de naciones, instituciones gubernamentales y no gubernamentales e investigadores en aumentar el nivel y el caudal de conocimientos adquiridos sobre las metodologías de transformación secundaria (de frutos, flores, semillas, hojas y tallos) y de la identificación y caracterización de los metabolitos secundarios de especies vegetales priorizadas, en la actualidad solo unos pocos metabolitos se utilizan de forma industrial, por lo que se ha creado la necesidad de generar opciones y alternativas de producción enfocadas al uso sostenible de todos aquellos recursos vegetales disponibles en el entorno trabajando activamente en la detección y caracterización de sustancias producidas por diferentes especies promisorias que pueden tener aplicación en la industria (cosmética, farmacéutica, textilera y agroalimentaria) (Torres, 2004).

1.5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

1.5.1. Definición

La actividad de una sustancia antimicrobiana se define como: la habilidad específica o capacidad de un producto de lograr su efecto planeado” y se basa en la medición de algún atributo del producto, por ejemplo su efecto inhibitorio frente a un determinado

microorganismo (halo de inhibición) se determina por el método analítico más adecuado, normalmente métodos de análisis microbiológicos.

La potencia debe ser una propiedad o atributo definible y medible para un producto biológico o semisintético, y debe estar presente en los estudios de estabilidad, con el ánimo de verificar la conformidad del producto en lo que respecta su calidad (Martínez, 2005)

Es común el empleo de partes vegetales con la finalidad de obtener varios efectos terapéuticos y que han sido respaldados por estudios científicos. Entre las variadas aplicaciones terapéuticas de los vegetales se incluye la acción antibacteriana. Los hallazgos obtenidos del estudio de vegetales con potencial terapéutico podrán servir como instrumento de apoyo médico-social para un mayor grupo poblacional, principalmente el más carente, estando también la industria farmacéutica más interesada en los conocimientos de esta área (De Paula Y Martínez, 2000).

1.5.2. Sustancia antimicrobiana

Un antibiótico se define como aquella sustancia producida natural o sintéticamente, para inhibir la supervivencia de microorganismos.

Dentro de los grandes grupos de antibióticos, se destaca el grupo de los beta-lactámicos, quienes actúan inhibiendo la última etapa de síntesis de pared celular bacteriana y constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y es la más utilizada a nivel clínico. Son compuestos de acción bactericida lenta, independiente de la concentración plasmática, presenta baja toxicidad y un amplio margen terapéutico, su espectro se ha ampliado a través de los años al incorporar moléculas para ampliar su actividad bactericida; pero la aparición de resistencias adquiridas ha limitado su eficacia en determinadas situaciones (Marín, 2003).

1.5.3. Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana

Bajo las condiciones adecuadas, la actividad potencia de los antibióticos puede demostrarse por su efecto inhibitorio sobre los microorganismos. La reducción en la actividad antimicrobiana también revela cambios sutiles no comprobables mediante métodos químicos.

Las bacterias tienen diferente sensibilidad a distintos agentes antibacterianos, por ello es de gran importancia realizar este tipo de pruebas, las cuales se basan en el enfrentamiento *in vitro* de la bacteria con distintas concentraciones del agente. La evaluación de esta sensibilidad nos servirá para la selección del compuesto más adecuado en el tratamiento de una infección bacteriana (Gamazo, 2000).

Los métodos más utilizados para determinar la sensibilidad de una bacteria a agentes microbianos son la difusión en agar y la dilución en caldo o agar.

1.5.4. Método de difusión en agar

Se caracteriza por ser fácilmente estandarizable y estar indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. Consiste en depositar en la superficie de una placa de agar previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel filtro impregnados con los diferentes antibióticos (Taroco *et al.*, s.f.).

Esta técnica se fundamenta en lo siguiente:

El medio de cultivo se siembra con la correspondiente cepa microbiana de ensayo mediante vertido en cajas, sobre el medio de cultivo, en puntos adecuadamente distanciados entre sí, se colocan cantidades definidas del antibiótico a ensayar y del antibiótico estándar como patrón de comparación.

Para la aplicación de estos antibióticos se utilizan pequeños cilindros, pocillos o perforaciones practicadas en el medio de cultivo. Durante la incubación se proceden alrededor de los puntos de aplicación del antibiótico, unos halos de inhibición exentos

de crecimiento microbiano y cuyo diámetro constituye una medida relativa de la actividad del antibiótico en cuestión. Comparando el diámetro de los halos de inhibición del patrón de antibióticos con el del antibiótico sometido a ensayo, puede calcularse la actividad de este último (Merck, 1994).

1.5.5. Método de dilución en caldo o agar

Consiste en exponer a las cepas a estudiar a diferentes concentraciones de antimicrobiano, y observar el crecimiento de los microorganismos para luego definir la concentración mínima inhibitoria (CIM) (Taroco *et al.*, s.f.).

Este método depende de la inhibición del crecimiento de un cultivo microbiano, en una solución uniforme del antibiótico (diluciones), en un medio fluido (caldo), que es favorable para el crecimiento del microorganismo, en ausencia del antibiótico. Se realiza para sustancias antimicrobianas que se evalúen con microorganismos de rápido crecimiento, se mide la turbidez del caldo de cultivo por medio de método espectrofotométrico o colorimétricos, se realiza una curva de cantidad de microorganismos que ha crecido, contra las concentraciones de las respectivas diluciones de antibiótico (Martínez, 2005).

1.5.6. Factores que influyen en la actividad antimicrobiana

Las siguientes variables son algunas de las de mayor importancia que se deben considerar, para evitar las posibles variaciones en los resultados esperados.

1.5.6.1. Profundidad del agar

La profundidad de la capa de agar afecta los resultados. Se debe procurar estandarizar el volumen medido de agar fundido antes de depositarlo en las cajas, dado que existe una relación inversamente proporcional entre el diámetro del halo formado y el grosor de la

placa de agar solidificado. Esto quiere decir que si es adicionado un volumen grande de agar en la placa, pueden generarse halos con diámetros menores o viceversa, cuando las demás condiciones permanecen constantes (Pedraza y Castellanos, 2009).

1.5.6.2. Concentración del inculo

Es una variable importante, con capacidad de modificar la respuesta (halo de inhibición) es la concentración de suspensión del microorganismo seleccionado (inculo). La magnitud del diámetro del halo que se obtiene es inversamente proporcional a la concentración del inculo con las demás concentraciones constantes. La suspensión utilizada debe ofrecer una concentración del microorganismo conocida de 10^5 a 10^6 UFC/ml, bajo estas concentraciones se obtienen respuestas instrumentales dentro de valores razonables es decir superiores a 10 mm de diámetro (Pedraza y Castellanos, 2009).

1.5.6.3. Temperatura de incubación

La uniformidad de la temperatura de incubación es indispensable. El apilamiento de placas genera gradientes de temperatura, por lo que en las placas más externas, podría presentarse un crecimiento más acelerado que en las placas que se encuentran en el centro del apilamiento, lo que finalmente ocasionaría respuestas diferentes, no comparables (Davis y Stout, 1971).

La temperatura que se emplea para la incubación de las placas, debe ser la adecuada para el microorganismo inoculado, de esta forma, se incuba el microorganismo a su temperatura óptima de crecimiento para que sea la sustancia antimicrobiana (antibiótico) quien ejerza su efecto inhibitor del crecimiento y no otra condición, como este caso, la temperatura (Pedraza y Castellanos, 2009).

1.5.6.4. Naturaleza del borde del halo de inhibición

Dado que en gran medida, cualquier conclusión tomada a partir de las pruebas de difusión en gel para determinar la potencia de un antibiótico, depende de los halos de inhibición medidos, se deben determinar de tal modo que el valor tomado, sea lo más aproximado posible al borde real del halo. Sin embargo, en la práctica se observan halos con bordes: difusos, indefinidos, dobles, difíciles de medir; esto se debe a que el organismo inoculado en el medio de agar se enfrenta a un gradiente de concentración del antibiótico, generalmente menor a medida que se aleja de la fuente (pozo) lo que da lugar a la formación de una zona de inhibición parcial, generando la sensación de degradación en los bordes del halo, como una zona difusa difícil de medir, a esto se le adiciona el hecho que el diámetro de los halos son características que se miden en función del tiempo ya que no son estáticos y después de determinado tiempo de incubación generan cambios como sobrecrecimiento que distorsiona y dificulta la lectura.

En algunos casos, se presenta el fenómeno de la formación del doble halo siendo el halo interno el que manifiesta completa inhibición, lo que se observa mediante un halo bien definido en su borde y transparente hasta donde las características del medio lo permitan. Por su parte el halo externo se ve menos transparente y con bordes poco definidos, lo que dificulta su lectura (Pedraza y Castellanos, 2009).

La lectura de los halos de inhibición deben interpretarse como sensible (S), intermedio (I) y resistente (R), según las categorías establecidas por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS). Además, el comité establece por regla general, que un diámetro de inhibición de 30 a 35 mm es indicativo de una cepa altamente sensible, mientras que, diámetros de zona de inhibición inferiores a 15 mm son los que presentan las cepas resistentes (Picazo, 2002).

1.5.6.5. Composición química del medio de agar

Se conoce que muchos medios no son apropiados para el crecimiento de algunos microorganismos, con lo que se hace necesario buscar un medio que llene los

requerimientos nutricionales del modelo microbiológico seleccionado, del tal modo que ofrezca las condiciones óptimas para su crecimiento.

Por otra parte en el medio seleccionado se debe verificar el contenido de ciertas sustancias, especialmente electrolitos, que pueden afectar la difusión de la sustancia antimicrobiana cuando ésta sufre algún tipo de interacción por cargas, lo que finalmente obstaculiza el efecto inhibitorio del antibiótico frente al microorganismo ya que el mismo no difunde libremente a través del centro del líquido por sus repulsiones de naturaleza eléctrica (Pedraza y Castellanos, 2009).

1.5.6.6. Tiempo de incubación

Dado que el halo de inhibición formado, depende del tiempo de incubación, se debe tener un tiempo de lectura fijo, para evitar errores en las determinaciones de los diámetros de los halos formados, ya que después de pasado el tiempo adecuado de lectura se presentan problemas como sobrecrecimiento. Las lecturas en diferentes tiempos de una prueba a otra, no son comparables de forma estadística y mucho menos aptos para el cálculo de potencia (Pedraza y Castellanos, 2009).

1.5.6.7. Volumen de la concentración del antibiótico a servir

El volumen de la concentración del antibiótico a servir en el pozuelo debe ser siempre el mismo, para que actúe como un reservorio de concentración constante. En el desarrollo experimental se emplean volúmenes estándar, normalmente se aplica en cada reservorio un volumen de 100 μ l, de las diferentes concentraciones de las diluciones del antibiótico (Pedraza y Castellanos, 2009).

1.5.7. Medios de Cultivo

1.5.7.1. Mueller Hinton

Medio para el ensayo de sensibilidad, o para resistencia de agentes patógenos médicamente importantes frente a antibióticos y sulfamidas. Este medio es utilizado para la realización del ensayo de difusión en placas. La composición de este medio garantiza, por una parte, condiciones favorables de crecimiento y por otra parte cuenta con la ausencia de antagonistas de las sulfamidas. Contiene infusión de carne e hidrolizado de caseína y almidón (Merck, 1994).

El medio que se utiliza es el Mueller-Hinton pero puede ser suplementado para bacterias exigentes (Gamazo, 2000).

1.5.7.2. Papa dextrosa

Es un medio muy usado que sirve para aislar todo tipo de hongos. Los más importantes hongos parásitos de insectos, al igual que los parásitos de plantas y los hongos saprofitos crecen muy bien y esporulan en este medio. La infusión de papa como fuente de almidones y la dextrosa son la base para el crecimiento de hongos y levaduras. El bajo pH (3.5) evita el crecimiento de las bacterias. Cuando se va a usar para el recuento de hongos y levaduras, agregar al medio de cultivo una vez esterilizado y enfriado aproximadamente a 45°C, 14 ml de una solución estéril de ácido tartárico al 10% para obtener un pH aproximado de 3.5 (Dibico, 2014).

1.5.8. Cepas Bacterianas

1.5.8.1. *Staphylococcus aureus*

Son cocos Gram positivos de 0,5 – 1 mcm de diámetro, inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos, caracterizados por su agrupación en forma de racimo. Crecen a

una temperatura óptima de 37°C y se desarrolla mejor en un pH ligeramente alcalino de 7,6 la adición de glucosa favorece el crecimiento (Peñaranda, 2003).

Forma parte de la flora normal de mucosas y piel e intervienen en procesos patológicos diversos como infecciones supurativas e intoxicaciones alimenticias (Arévalo, 1996).

Staphylococcus aureus es una bacteria que puede causar infección en todos los grupos de edad tanto en forma esporádica como epidémica y se ha identificado como una de las principales causas de infección de herida quirúrgicas. Su principal forma de transmisión es por contacto (Uribe, 2003).

1.5.8.2. *Escherichia coli*

Es un bacilo de 1 – 3 µm por 0,5 µm, que se presenta solo, en pares, en cortas cadenas o formando grupos. En general es móvil (por flagelos peritricos), aunque existen variantes inmóviles no flageladas. No forma esporas y por lo general es no cápsulado y gram negativo. En cultivos jóvenes la forma cocobacilar es bastante frecuente; en los viejos se presentan formas de una dimensión mayor. Este bacilo es aerobio y anaerobio facultativo. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, pero posee propiedades de desarrollo en una gama bastante amplia de temperaturas; el pH favorable es de 7, algunas cepas producen hemolisina (Peñaranda, 2003).

Se ha considerado inicialmente solo como un habitante del intestino, desde hace cerca de tres décadas se empezó a estudiar su poder enteropatógeno. Se ha visto que las cepas toxigénicas de *E. coli* pueden producir un a enterotoxina termolábil (TL), una termoestable (TS) o ambas. La TL es una proteína de alto peso molecular, que bioquímicamente es muy similar a la toxina de *Vibrio Cholerae*, activando la adenilciclase. Es inactivada a 60°C, la TS es una pequeña molécula relativamente estable al ser hervida (Rodríguez, 1995)

1.5.8.3. *Pseudomona aeruginosa*

Es un bacilo Gram negativo aerobio con un flagelo polar. Cuando se cultiva en medios adecuados produce piocianina, un pigmento azulado no fluorescente. Es un microorganismo común en el medio ambiente y puede encontrarse en las heces, el suelo, el agua y las aguas residuales. Puede proliferar en ambientes acuáticos, así como en la superficie de materias orgánicas propicias en contacto con el agua. *Pseudomonas aeruginosa* es una fuente conocida de infecciones intrahospitalarias y puede producir complicaciones graves. Se han aislado en gran variedad de ambientes húmedos, como fregaderos, baños de agua, sistemas de distribución de agua caliente, duchas y bañeras de hidromasaje.

Pseudomonas aeruginosa puede causar diversos tipos de infecciones, pero rara vez causa enfermedades graves en personas sanas sin algún factor predisponente. Coloniza predominantemente partes dañadas del organismo, como quemaduras y heridas quirúrgicas, el aparato respiratorio de personas con enfermedades subyacentes o las lesiones físicas en los ojos. Desde estos lugares puede invadir el organismo y causar lesiones destructivas o septicemia y meningitis.

1.5.9. Cepas Fúngicas

1.5.9.1. *Candida albicans*

La especie patógena más frecuente en el hombre es la *Candida albicans*. Estos hongos viven como saprofitos sobre la piel y las mucosas del tracto respiratorio, digestivo y genital femenino, de preferencia en pacientes diabéticos y durante el embarazo. Es una levadura, redonda u ovoide con 3 µm de diámetro, con o sin gemación. Forma parte de la flora normal de la boca, tubo digestivo y vagina. Y está considerada como la más patógena de este género (Arévalo, 1995).

Microscópicamente se puede observar que en el tejido se forma un micelio con hifas delgadas y pseudohifas, además de células micéticas levaduriformes pequeñas. Estas

células pueden mostrar gemación. Las hifas y pseudohifas penetran en el tejido como lo hacen las raíces de una planta. Presentan rasgos clínicos como dolor de esófago y dificultad para comer, infección del torrente sanguíneo y enfermedad diseminada normalmente con fiebre, raramente: pulmonía, osteomielitis y artritis (Roncancio, 2001).

1.6. ACTIVIDAD LETAL

1.6.1. Definición

La toxicidad en vivo de un organismo animal puede usarse como método conveniente para el seguimiento y fraccionamiento en la búsqueda de nuevos productos naturales bioactivos (Sánchez y Neira, 2005).

1.6.2. Bioensayo de *Artemia salina*

El ensayo de letalidad de *Artemia salina* se basa en la posibilidad de causar la muerte de larvas de este crustáceo cultivadas en el laboratorio. Este método fue propuesto por *Michael* y colaboradores, y posteriormente desarrollado por *Vanhaecke* y colaboradores, así como *Sleet* y *Brendel*, con el propósito de contar con una herramienta útil y sencilla para la determinación de toxicidad. Este método, en el cual se determina el valor de la concentración letal media (CL₅₀) de compuestos y extractos en medio salino, ha sido utilizado para la detección de toxinas de hongos y cianobacterias, toxicidad de extractos de plantas, metales pesados y para predecir citotoxicidad de compuestos puros (Fernández *et al.*, 2009).

1.6.3. *Artemia Salina*

Pertenece a la clase de los crustáceos. Presenta un cuerpo de aspecto variable, segmentado, delgado; su longitud oscila entre 10-12 mm y la variabilidad depende

según el tipo de especie y de las características del medio donde habitan, especialmente la salinidad (Gualdrón, 1994).

Artemia salina L. (Artemiidae), la larva de camarón de salmuera, es un invertebrado utilizado en el ensayo alternativo para determinar la toxicidad de los productos químicos y naturales (Parra *et al.*, 2001).

Habita en aguas saladas y zonas salubres. Se desplaza velozmente sobre su dorso por el agua y constituye una parte fundamental dentro de la cadena alimenticia en los ecosistemas donde vive (Forero, 2002).

Este organismo es fácil de cultivar y manipular en laboratorio, es sensible a una gran variedad de tóxicos; y genera resultados confiables en cuanto a una alternativa poco costosa, sencilla y rápida. Puede ser usada de manera rutinaria en la investigación fitoquímica y permite crear una base para adelantar posteriores estudios, que brinden aplicaciones (Forero, 2002)

El estudio de toxicidad usando *Artemia salina* L, resulta muy económico, reproducible y utiliza un gran número de organismos que permiten una buena evaluación estadística (Monguelli *et al.*, 1995).

1.6.4. Importancia del Bioensayo de *Artemia salina*

En la actualidad muchos de los medicamentos empleados para el tratamiento de diversas enfermedades incluyendo el cáncer son obtenidos de especies vegetales. La metodología para la búsqueda de estas nuevas sustancias con actividad citotóxica es muy variada, sin embargo existen algunos reportes donde se propone el método de nauplios de *Artemia salina*, como un estudio inicial para dirigir la búsqueda de compuestos citotóxicos a partir de extractos vegetales (García y otros, 2013).

Este bioensayo es aplicable a compuestos con estructuras y modos de actividad diversos, lo que le otorga la característica de ser de amplio espectro, de ahí que sea

usado como método de análisis para detectar residuos de pesticidas, micotoxinas, anestésicos y compuestos de tipo morfínico entre otros (Gualdrón, 1994).

Los extractos positivos al bioensayo se someten al estudio químico detallado para llegar a compuestos puros o mezcla de compuestos, los cuales se someten de nuevo al bioensayo, para hacer la selección en base a la concentración letal 50 (CL₅₀) (García *et al*, 2013).

2. DISEÑO METODOLÓGICO

2.1. Localización de la Investigación.

El presente trabajo de investigación, se realizó en la Planta Piloto de Farmacia, de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud de la Universidad Técnica de Machala.

2.2. Universo de trabajo.

Se tomó muestra de las plantas a analizarse (*M. officinalis* y *C. citratus*), que son cultivadas y vendidas en la Provincia de El Oro.

2.3. Tipo de muestra.

Para el análisis y la investigación respectiva se utilizó las hojas de las plantas *C. citratus* (hierba luisa) y *M. officinalis* (toronjil).

2.4. Materiales.

2.4.1. Materiales de laboratorio

- Guantes
- Tamiz con luz de 1,5mm
- Balón de destilación
- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Pipetas volumétricas
- Pipetas automáticas

- Pipetas Pasteur
- Pera de succión
- Vasos de precipitación (100, 250 y 500 ml)
- Erlenmeyer (250 y 500ml)
- Luna de reloj
- Cajas Petri

2.4.2. Otros materiales

- Tijeras
- Papel periódico
- Lavacara
- Lápiz graso
- Hisopos
- Triturador
- Molino
- Papel aluminio
- Toallas absorbentes
- Fundas plásticas
- Lámpara de 75W
- Lupa
- Papel filtro

2.4.3. Equipos

- Estufa
- Rotavaporador
- Cámara de vapor
- Balanza analítica

- Lámpara UV
- Incubadora
- Autoclave
- Cocineta

2.4.4. Sustancias

- Agua destilada
- Hexano
- Metanol
- Cloroformo
- Ácido clorhídrico al 1%
- Reactivo de Dragendorf
- Reactivo de Mayer
- Acido pícrico al 1%
- Carbonato de sodio al 10%
- Reactivo de Kedde
- Anhídrido acético
- Ácido sulfúrico concentrado
- Virutas de Mg
- Hidróxido de potasio al 5%
- Hidróxido de sodio al 5%
- Reactivo de Baljet
- Solución de Sudan III
- Reactivo de Arnow
- Solución de Fe (III) al 5%
- Dimetilsulfoxido
- Agua de mar
- Agar Müller Hinton
- Agar Papa-dextrosa
- Reactivo de BAW

- Cetona
- Alcohol potable

2.5. MÉTODOS

2.5.1. Tipo de Investigación

Descriptivo – Analítico: Este tipo de estudio se basa en la descripción de cada una de las plantas a investigar y en el análisis fitoquímico, actividad letal, antibacteriano y antifúngico de las mismas, para determinar los ingredientes activos en cada especie, a las cuales deben sus propiedades medicinales.

2.5.2. Selección de las muestras

Las muestras a investigarse de las plantas *C. citratus* (hierba luisa) y *M. officinalis* (toronjil) fueron recolectadas en los diferentes puntos de cosecha de los cantones Pasaje, El Guabo y otros alrededores de la provincia de El Oro, durante los meses de agosto y septiembre de 2014.

2.5.3. Procesamiento del material vegetal

Se separó las hojas de las plantas, luego se lavó con agua corriente para después poner a secar al ambiente por 24 horas y luego a la estufa a 40°C, igual por 24 horas.

Se trituró las hojas secas hasta convertir en partículas más pequeñas posible con tamiz de 1,5mm, tratando de obtener casi polvo de igual tamaño de partícula.

2.5.4. Preparación de extractos orgánicos (Miranda, 2002)

Se pueden utilizar diversos solventes de tipo orgánico, pero en esta investigación se usó metanol como el solvente más polar, y hexano como el menos polar.

Los metabolitos secundarios pueden ser extraídos aplicando diversos métodos, dependiendo del solvente, en este caso se utilizó el método de maceración. De la siguiente manera:

- Se pesó una cantidad del material vegetal (hojas molidas) aproximada de 75g.
- Se colocó una cantidad suficiente de solvente, de tal manera que cubra totalmente el material vegetal.
- Se dejó en maceración por 24 horas, se filtró y el filtrado se le almacenó.
- Al residuo se llevó nuevamente a maceración, iniciando con el solvente menos polar hasta el más polar.
- Se volvió a filtrar y se colocó el filtrado en un recipiente de vidrio.
- Por último, se llevó el filtrado combinado al rotavaporador (temperatura y presión controlada), hasta evaporación máxima del solvente.
- Se envasó el extracto en un vial pequeño, para que el poco solvente que quedó se evapore a temperatura ambiente hasta obtener agotamiento total y obtener un extracto seco.

2.5.5. Tamizaje fitoquímico Marcano y Hasegawa (2002) y Miranda (2002),

Se realizó la detección de las familias de metabolitos secundarios presentes en *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Melissa officinalis* (toronjil), de la siguiente manera:

- **Ensayo para identificación de alcaloides**

Prueba de Dragendorff

Utilizado para detectar la presencia de alcaloides se debe tomar en cuenta si el extracto está disuelto en solvente orgánico este debe evaporarse en baño de agua y residuo redisolverse en 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Si se trata de un extracto acuoso a la alícuota se le añade una gota de ácido clorhídrico concentrado (calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez) Para el ensayo a la solución acuosa ácida se le añade 3 gotas del reactivo de Dragendorff y se observa si hay opalescencia, turbidez definida y precipitado.

Prueba de Wagner

Se parte de la solución ácida de igual forma que en los casos anteriores. A esta solución se le adiciona 2 ó 3 gotas del reactivo de Wagner y se reporta los resultados de igual forma que la reacción anterior.

Prueba de Mayer

Se parte de la solución ácida de igual forma que en los casos anteriores. A esta solución se le adiciona 2 o 3 gotas del reactivo de Mayer y se reporta los resultados de igual forma que en la reacción anterior.

- **Ensayo de identificación de glicósidos cianogénicos y cardiotónicos**

Para detectar glicósidos cianogénicos, al material fresco macerado se le añadirán unas gotas de cloroformo y se calentará entre 50 y 70 °C en un tubo de ensayo cerrado, los vapores serán puestos en contacto con un papel filtro impregnado en una solución al 1% de ácido pícrico en carbonato de sodio al 10%. Los compuestos cianogénicos se pueden identificar por la aparición de una mancha roja sobre el papel.

Prueba de Kedde

Los glicósidos cardiotónicos por la reacción con una mezcla 1:1 recién preparada, de ácido 3,5-dinitrobenzoico (2%) y KOH (0,5 mol * L⁻¹). La presencia de glicósidos cardiotónicos fue detectada por la aparición de un color rojo violeta.

- **Ensayo para identificación de triterpenos y/o esteroides**

Prueba de Lieberman-Buchard

Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides en ambos tipos de productos debe poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6. Para ello si la alícuota no se encuentra en cloroformo debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayo se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar.

Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración:

- Rosado-azul muy rápido
- Verde intenso-visible aunque rápido
- Verde oscuro-negro-final de la reacción.

El tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos. Para realizar este ensayo no puede haber agua en el medio de reacción, pues ésta con el ácido sulfúrico reacciona de forma violenta y puede ocurrir un accidente.

La reacción de Liebermann-Buchard es también utilizada para diferenciar las estructuras esteroidales de los triterpenoides, las primeras producen coloraciones azul o azul verdoso, mientras que para las segundas se observa rojo rosado o púrpura. Estas coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantofilas, y esteroides saturados que puedan estar presentes.

- **Ensayo para identificación de flavonoides**

Ensayo de Shinoda

A un ml del extracto, se le agregara 0,5 g de virutas de Mg y, HCl concentrado gota a gota, hasta que termine el desprendimiento de hidrogeno y durante 10 minutos se observara los cambios de color en la solución. La aparición de una coloración amarilla a roja es indicativo de flavonas y flavonoles; rojo a magenta de flavanonoles; rojo magenta, violeta y azul de flavanonas.

- **Ensayo para identificación de quinonas**

Prueba de Borntrager

Es útil para detectar la presencia de quinonas. Si la alícuota no está en cloroformo debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5% en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación. El ensayo es positivo cuando la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado.

- **Ensayo para identificación de compuestos lactónicos (cumarinas)**

Prueba de Baljet

Es útil para reconocer la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico en particular Cumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar resultado positivo. Si la alícuota de la muestra a probar no está en alcohol debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en 1 mL de alcohol. Seguidamente se añade 1 mL de reactivo. La prueba es positiva cuando aparece una coloración o precipitado de color rojo

- **Ensayo para identificación de compuestos grasos**

Prueba de Sudan III

Permite conocer en un extracto la presencia de compuestos grasos para ello, cuando un extracto etéreo se evapora a sequedad en presencia de una solución de Sudán III al 0,6 % en glicerina-agua (1:1) La aparición de gotas oleosas de color rojo-oscuro, indica la presencia de lípidos y/o aceites esenciales.

- **Ensayo para identificación de catequinas**

Prueba de catequinas

Para ello, tomar de la solución alcohólica obtenida, una gota con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel filtro. Sobre la mancha aplique solución de Carbonato de Sodio. La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV indica positiva la prueba.

- **Ensayo para identificación de resinas**

Prueba de resinas

Para detectar este tipo de compuesto se adiciona a 2 mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada. La aparición de un precipitado indica un ensayo positivo.

- **Ensayo para identificación de saponinas**

Prueba de espuma

Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroideal como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.

El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos.

- **Ensayo para identificación de fenilpropanoides**

Prueba del reactivo de Arnow

Una pequeña cantidad del extracto crudo se disuelve en etanol y se añadió 1 mL de la solución del extracto etanólico en tres tubos de ensayo. El primero sirve como patrón de comparación, al segundo se le añaden 2 mL de HCl $0,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 2 mL de la solución acuosa de nitrito de sodio al 10 % (reactivo de Arnow) y 2 mL de la solución acuosa de NaOH $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, y, en el tercer tubo, se adicionan todos los reactivos sin la muestra que también sirvió como testigo.

El reactivo de Arnow, en presencia de fenilpropanoides, presenta una coloración naranja y después de la adición de NaOH se cambia a rosado púrpura.

- **Ensayo para identificación de compuestos fenólicos y/o taninos**

Prueba de cloruro de Fe (III)

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se añade 3 gotas de una solución de Fe (III) al 5% en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0,9% en agua). Si el extracto es acuoso el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota de extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de Fe (III) al 5% en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- a) Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- b) Desarrollo de una coloración verde-intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- c) Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalónicos.

- **Ensayo para identificación de mucílagos**

Permite reconocer en los extractos de vegetales la presencia de esta estructura tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa que aumenta la densidad del agua donde se extrae. Para ello una alícuota del extracto en agua se enfría a 0-5°C, si la solución toma una consistencia gelatinosa el ensayo es positivo.

2.5.6. Actividad biológica antimicrobiana Marcano y Hasegawa, 2002

Para la determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica se empleó la siguiente metodología:

Técnica de difusión en agar (antibiograma)

- *Actividad Antibacteriana*

- Se preparó el medio (agar Müller Hinton) y los extractos a concentraciones de 20 y 40 mg/mL.
- Se procedió a inocular en el medio solidificado la suspensión bacteriana de concentración conocida (10^8 células/mL) de las diferentes cepas (*E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*)
- Se hicieron unos pocillos de 6mm de diámetro en el medio inoculado y se colocaron 10 ó 25 μ L de una solución (extractos preparados a concentraciones de 20 y 40 mg en 1 mL de un solvente adecuado).
- Luego se llevó a incubar a 37°C por 24 h. La acción antibacteriana se midió tomando el diámetro (mm) del crecimiento bacteriano alrededor del disco (halo de inhibición).

- *Actividad antifúngica*

- Se incubó cepas de hongos en tubos, a temperatura ambiente por una semana. Transcurrido este tiempo, se le agregaron aproximadamente 10 mL de agua destilada estéril a cada tubo para remover las esporas y se filtraron sobre gasas estériles, para obtener la solución esporangial.
- Utilizando hisopos estériles, se colocó la solución obtenida sobre las cápsulas o placas de Petri, previamente preparadas con el agar papa dextrosa (PDA).
- Seguidamente, se aplicó la técnica del antibiograma, haciendo unos pocillos de 6mm de diámetro en el medio inoculado y colocando 10 ó 25 μL de una solución (extractos preparados a concentraciones de 20 y 40 mg en 1 mL de un solvente adecuado).
- Se llevó a incubación por 48 horas a temperatura ambiente. La actividad fué detectada al medir el diámetro (mm) del halo de inhibición que se observó alrededor del disco.

2.5.7. Actividad tóxica o letal Meyer *et al*, 1982

Se determinó la actividad letal del extracto crudo de las hojas de las plantas, contra larvas del crustáceo *A. salina*, aplicando la metodología de la siguiente manera:

- Se preparó una solución de 10 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto, en una mezcla $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ según la solubilidad del extracto (20mg en 0,5mL DMSO y 1,5 mL agua destilada).
- A partir de ésta, se prepararon soluciones de 1000; 100; 10 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mediante diluciones sucesivas con agua de mar filtrada.
- Se colocó en tubos de ensayo, los mismos que contenían entre 10 y 15 nauplios de *A. salina*.
- Se llevó a eclosionar por 24 horas, en ese periodo se mantuvo la luz artificial encendida y con oxígeno constante.

- Por cada concentración, se realizaron tres réplicas y un control con igual número de réplicas.
- La cuantificación de la mortalidad de los nauplios se llevó a cabo pasadas las 24 horas y analizadas usando diversos métodos estadísticos diseñados para determinar la concentración letal media (CL_{50}).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

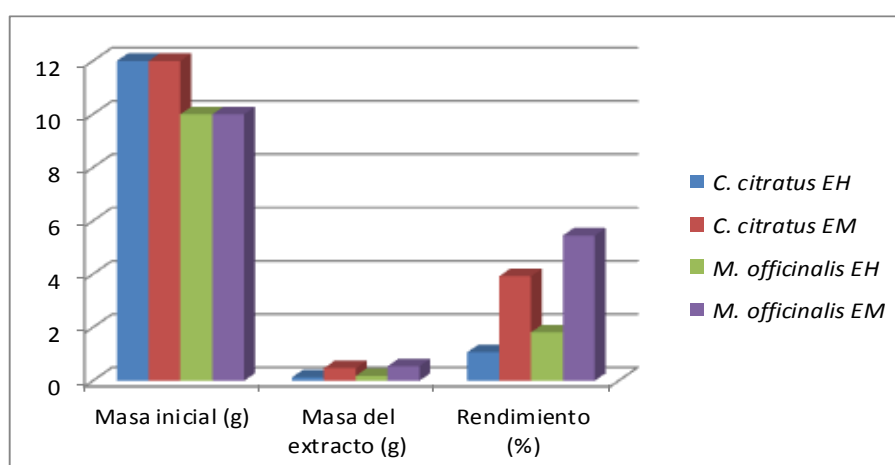
A continuación, se presentan los resultados obtenidos durante este trabajo de investigación expresados en tablas y figuras, correspondientes a datos de análisis fitoquímico de los extractos de las dos especies mencionadas anteriormente, así como de la bio-actividad observada para los mismos (actividad antimicrobiana y letal o tóxica):

3.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Tabla 1. Rendimiento porcentual (%) de los extractos hexánicos y metanólicos de las plantas en estudio

Especie	Extracto	Masa inicial (g)	Masa del extracto (g)	Rendimiento (%)
<i>C. citratus</i> (hierba luisa)	EH	12	0,1280	1,07
	EM	12	0,4698	3,92
<i>M. officinalis</i> (toronjil)	EH	10	0,1811	1,81
	EM	10	0,5446	5,45

EH: Extracto de Hexano; EM: Extracto de Metanol



EH: Extracto de Hexano; EM: Extracto de Metanol

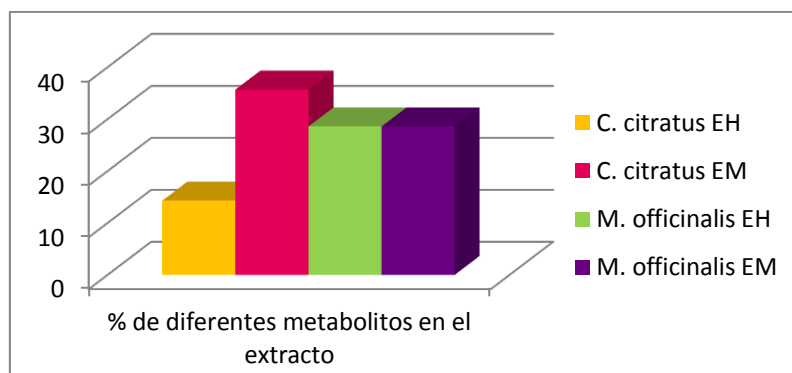
Figura 1. Variación de los valores de la masa y rendimiento porcentual (%) de extracción de las plantas en estudio.

La tabla 1, muestra la comparación de los valores obtenidos del rendimiento porcentual de los diferentes extractos, siendo evidente que el rendimiento es mayor al emplear como solvente el metanol (polar) y obteniendo una cantidad mayor de extracto para la especie *M. officinalis*, estos valores dependen de distintos factores como las condiciones agronómicas del suelo, las malezas presentes que compiten por nutrientes con la planta, el momento en el que se cosechan y las partes usadas para la extracción, según la OMS (2009).

3.2. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Tabla 2. Familia de metabolitos secundarios presentes en los diferentes extractos de las plantas en estudio

Familia de metabolitos	<i>C. citratus</i>		<i>M. officinalis</i>		% de metabolitos en los extractos
	EH	EM	EH	EM	
Saponinas	-	-	-	-	0
Taninos y polifenoles	-	-	-	-	0
Glicósidos cardiotónicos	-	-	+	-	25
Glicósidos cianogénicos	-	-	-	-	0
Alcaloides	-	-	-	-	0
Cumarinas y metilencetonas	-	+	+	-	50
Flavonoides	-	-	-	-	0
Esteroles y triterpenos	+	+	+	+	100
Fenilpropanoides	-	+	-	+	50
Antraquinonas	-	-	-	-	0
Catequinas	-	+	-	+	50
Resinas	-	-	-	-	0
Mucilagos	+	+	+	+	100
Ácidos grasos	-	-	-	-	0
% de diferentes metabolitos en el extracto	14,3	35,7	28,6	28,6	



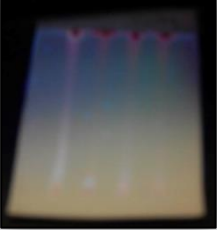


EH: Extracto de hexano; EM: Extracto de metanol.

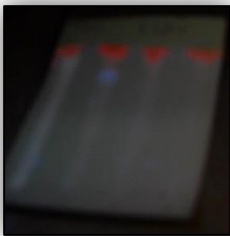

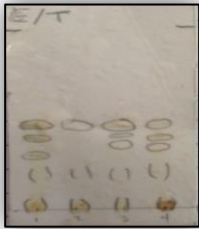
Figura 2. Representación de los porcentajes de los diferentes metabolitos en los extractos en estudio

La tabla 2, muestra las familias de metabolitos secundarios presentes en cada extracto de las especies en estudio, observándose que el extracto de hexano de *C. citratus* contiene un 14,3% de metabolitos, siendo éstos los esteroides y triterpenos y los mucilagos; a diferencia del extracto de metanol que contiene un 35,7% de metabolitos, los cuales son cumarinas y metilencetonas, esteroides y triterpenos, fenilpropanoides, catequinas y mucilagos, teniendo presente que el metanol al ser un solvente polar tiene la capacidad de extraer en su gran mayoría metabolitos secundarios. Según un estudio farmacológico en el Departamento de Investigaciones Experimentales de la Unidad de Toxicología Experimental Villa Clara, al realizar el tamizaje a un extracto hidroalcohólico de esta misma especie se corroboró la presencia de compuestos reductores, alcaloides y taninos, y se observó gran concentración de flavonoides y triterpenos (BETANCOURT, 2015); sin embargo, la mayoría de estos metabolitos no fueron detectados en los extractos orgánicos analizados.

Por otra parte, en la especie *M. officinalis* se obtuvo un porcentaje similar de metabolitos secundarios en los dos extractos (hexano y metanol), pero varía de acuerdo al solvente, como es el caso del extracto de hexano que contiene glicósidos cardiotónicos, cumarinas y metilencetonas, esteroides y triterpenos y mucilagos, a diferencia del extracto de metanol que contiene esteroides y triterpenos, fenilpropanoides, catequinas y mucilagos. Según estudios realizados en Perú, en un extracto hidroalcohólico de esta misma especie se identificaron los siguientes compuestos orgánicos: taninos, compuestos fenólicos, flavonoides, glicósidos, alcaloides y esteroides (PARDO, 2009).

Tabla 3. Metabolitos detectados por Cromatografía en Capa Fina.

Metabolitos secundarios	Fase móvil	Revelador	Resultado (fotografía)	Interpretación
Cumarinas	Acetona	U.V.		Intensa fluorescencia azul, marrón o azul-verdosa indica la presencia de este metabolito.
Antraquinonas	Acetona-Hexano (4:1)	U.V.		Todas las antraquinonas dan fluorescencia amarilla o rojo-marrón.
Polifenoles	BAW (4:1:5)	U.V.		En presencia de polifenoles se observa fluorescencia de color azul intensa.

Flavonoides	BAW (6:1:2)	U.V. antes y después de exponer a vapores de NH ₃		Fluorescencia roja, azul o púrpura indica la presencia de este metabolito.
Fenilpropanoides	Hexano-Cloroformo (3:2)	Vainillina al 1% en H ₂ SO ₄ al 5%, seguido de calor		Una gama de colores a simple vista indica la presencia de algunos fenilpropanoides
Terpenos	Hexano-Acetona (4:1)	H ₂ SO ₄ al 5% en etanol seguido de calentamiento a la estufa		Manchas de diversidad de colores son indicativos de la presencia de estos metabolitos

La tabla 3, nos muestra los metabolitos presentes en cada extracto detectados mediante cromatografía de capa fina, fue realizada como prueba confirmatoria de los metabolitos detectados por reactivos en el laboratorio (reacciones químicas). En las fotografías se muestra las coloraciones obtenidas en cada extracto: extracto metanólico de hierba luisa, extracto metanólico de toronjil, extracto hexánico de hierba luisa y extracto hexánico de toronjil (de izquierda a derecha), siendo muy notorio las coloraciones en unos y la ausencia en otros, lo que indica la ausencia o presencia de estos metabolitos.

3.3. ACTIVIDAD LETAL

Tabla 4. Citotoxicidad del extracto de hexano de *C. citratus* frente a *A. salina*

Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)	N° de nauplios		Porcentaje (%) de mortalidad
	Expuestos	Muertos	
1000	30	30	100,0
100	30	7	23,3
10	30	3	10,0
1	30	3	10,0
Control	30	2	6,7

Control: Solución de dimetilsulfóxido (500 μl) en 3,6ml de agua de mar.

La tabla 4, revela el porcentaje de mortalidad del extracto de hexano de *C. citratus* frente a la larva de *Artemia salina* con la variación de las concentraciones, teniendo en cuenta que a mayor concentración mayor porcentaje de larvas muertas, aunque el porcentaje es similar en concentraciones de 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 5. Concentración letal media (CL_{50}) del extracto de hexano de *C. citratus*

Método Estadístico	CL_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Límites de confianza del 95%	
		Mínimo	Máximo
Binomial	216,53	100,00	1000,00
Moving Average	168,77	113,42	262,17
Probit	162,79	0,00	∞
Logit	416,73	0,00	∞

CL_{50} : 168,77 $\mu\text{g/ml}$

La tabla 5, muestra la concentración letal media del extracto de hexano de *C. citratus*, validando el valor del método estadístico Moving Average, debido a que nos ofrece un dato aceptable dentro de los límites de confianza, determinando por lo tanto que la CL_{50} de este extracto es de 168,77 $\mu\text{g/ml}$, lo cual evidencia una letalidad significativa (Meyer *et al.*, 1982).

Tabla 6. Citotoxicidad del extracto de hexano de *M. officinalis* frente a *A. salina*

Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)	N° de nauplios		Porcentaje (%) de mortalidad
	Expuestos	Muertos	
1000	33	33	100,0
100	35	5	14,3
10	30	5	16,7
1	31	0	0,0
Control	30	3	10,0

Control: Solución de dimetilsulfóxido (500 μl) en 3,6ml de agua de mar.

La tabla 6, exhibe el porcentaje de mortalidad del extracto de hexano de *M. officinalis* frente a larvas de *A. salina* con la variación de las concentraciones; observándose que a mayor concentración del extracto, mayor porcentaje de larvas muertas, aunque el porcentaje es similar en concentraciones de 100 y 10 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 7. Concentración letal media (CL_{50}) del extracto de hexano de *M. officinalis*

Método Estadístico	CL_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Límites de confianza del 95%	
		Mínimo	Máximo
Binomial	267,00	100,00	1000,00
Moving Average	233,56	156,95	370,50
Probit	214,45	0,00	∞
Logit	435,75	0,00	∞

CL_{50} : 233,56 $\mu\text{g/ml}$

La tabla 7, muestra la concentración letal media del extracto de hexano de *M. officinalis*, validando el valor del método estadístico Moving Average, debido a que ofrece un resultado aceptable dentro de los límites de confianza, determinándose por lo tanto que la CL_{50} de este extracto es de 233,56 $\mu\text{g/ml}$, lo cual implica que este extracto posee una letalidad moderada.

Tabla 8. Citotoxicidad del extracto de metanol de *C. citratus* frente a *A. salina*

Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)	N° de nauplios		
	Expuestos	Muertos	Porcentaje (%) de mortalidad
1000	31	25	80,6
100	30	6	20,0
10	30	0	0,0
1	30	0	0,0
Control	30	2	6,7

Control: Solución de dimetilsulfóxido (500 μl) en 3,6ml de agua de mar.

La tabla 8, muestra el porcentaje de mortalidad del metanol de *C. citratus* frente a larvas de *A. salina* con la variación de las concentraciones, teniendo en cuenta que a mayor concentración mayor porcentaje de larvas muertas, que un 20% de los organismos murieron a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ y que no hubo mortalidad a 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 9. Concentración letal media (CL_{50}) del extracto de metanol de *C. citratus*

Método Estadístico	CL_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Límites de confianza del 95%	
		Mínimo	Máximo
Binomial	358,03	100,00	1000,00
Moving Average	358,03	236,14	558,99
Probit	366,31	231,78	589,14
Logit	336,89	0,00	∞

CL_{50} : 358,03 $\mu\text{g/ml}$

La tabla 9, presenta la concentración letal media del extracto de metanol de *C. citratus*, validando el resultado con el método estadístico Moving Average, debido a que arroja un dato aceptable dentro de los límites de confianza, determinándose por lo tanto que la CL_{50} de este extracto es de 358,03 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 10. Citotoxicidad del extracto de metanol de *M. officinalis* frente a *Artemia salina*

Concentraciones (µg/ml)	N° de nauplios		Porcentaje (%) de mortalidad
	Expuestos	Muertos	
1000	30	30	100,0
100	30	16	53,3
10	30	4	13,3
1	30	0	0,0
Control	30	2	6,7

Control: Solución de dimetilsulfóxido (500µl) en 3,6ml de agua de mar.

La tabla 10, revela el porcentaje de mortalidad del metanol de *C. citratus* frente a larvas de *A. salina* con la variación de las concentraciones, observándose que a mayor concentración mayor porcentaje de larvas muertas, es evidente que en la concentración de 100 µg/ml hay un porcentaje de organismos muertos mayor al 50% y que en la de uno no hubo mortalidad.

Tabla 11. Concentración letal media (CL₅₀) del extracto de metanol de *M. officinalis*

Método Estadístico	CL ₅₀ (µg/ml)	Límites de confianza del 95%	
		Mínimo	Máximo
Binomial	100,00	10,00	1000,00
Moving Average	72,25	45,19	122,11
Probit	82,04	51,04	132,07
Logit	90,31	52,46	180,70

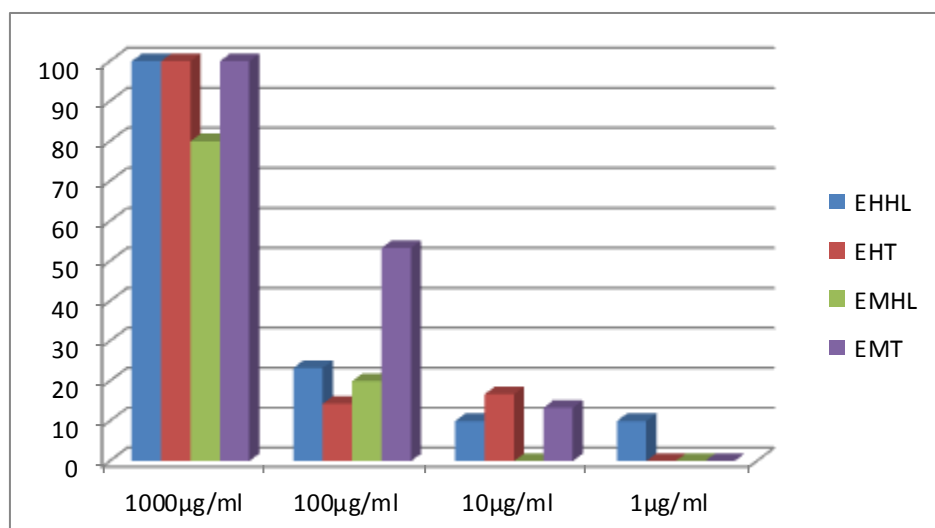
CL₅₀: 72,25 µg/ml

La tabla 11, muestra una CL₅₀ de 72,25 µg/ml para el extracto de metanol de *M. officinalis*, usando método estadístico Moving Average, dentro de los límites de confianza, y se podría decir que por lo tanto este extracto posee una letalidad muy significativa y más potente en relación a los otros extractos bioensayados, siendo una fuente promisoría de compuestos antitumorales (MEYER *et al.*, 1982; PINO y LAZO, 2010).

Tabla 12. Valores del % de mortalidad correspondientes al ensayo de *A. salina* en los diferentes extractos

Extractos	% de mortalidad			
	1000 μ g/ml	100 μ g/ml	10 μ g/ml	1 μ g/ml
EHHL	100,00	23,3	10,0	10,0
EHT	100,00	14,3	16,7	0,0
EMHL	80,00	20,0	0,0	0,0
EMT	100,00	53,3	13,3	0,0

EHHL: Extracto de hexano de hierba luisa; EHT: Extracto de hexano de toronjil;
EMHL: Extracto de metanol de hierba luisa; EMT: Extracto de metanol de toronjil.



EHHL: Extracto de hexano de hierba luisa; EHT: Extracto de hexano de toronjil;
EMHL: Extracto de metanol de hierba luisa; EMT: Extracto de metanol de toronjil.

Figura 3. Variación del % de mortalidad en los extractos ensayados.

El ensayo de *A. salina*, según la tabla 12 demostró que todos los extractos a excepción del extracto de metanol de hierba luisa lograron un 100% de mortalidad a una concentración de 1000 μ g/ml, por lo que el extracto de metanol de hierba luisa al disminuir las concentraciones no provocó la muerte de las larvas ni a 10 μ g/ml, menos a 1 μ g/ml. El extracto de hexano de hierba luisa conservó su actividad letal incluso a la concentración menor ensayada.

Se puede observar también en la figura 3, que todos los extractos presentaron un determinado porcentaje de mortalidad a una concentración de 100µg/ml, siendo el % más alto el del extracto de metanol de toronjil, aunque a concentraciones inferiores de diez no hubo mortalidad. Así mismo, es evidente que a una concentración de 10µg/ml el extracto que obtuvo un elevado porcentaje de mortalidad en relación de los otros fue el hexánico de toronjil y a 1µg/ml el de mayor porcentaje fue el hexánico de hierba luisa.

Los extractos de hexano fueron los que mayor porcentaje de mortalidad obtuvieron a pesar de que disminuía la concentración, a diferencia del extracto de metanol de toronjil los de metanol que a una concentración de 100 µg/ml, mató más del 50% del crustáceo en ensayo.

Tabla 13. Valores de CL₅₀ correspondientes al ensayo de *A. salina*

Extractos	Método	Intervalo	CL ₅₀ (µg/ml)
EHL	Moving Average	113,42 – 262,17	168,77
EHT	Moving Average	156,95 – 370,50	233,56
EMHL	Moving Average	236,14 – 558,99	358,03
EMT	Moving Average	45,19 – 122,11	72,25

EHL: Extracto de hexano de hierba luisa; EHT: Extracto de hexano de toronjil; EMHL: Extracto de metanol de hierba luisa; EMT: Extracto de metanol de toronjil.

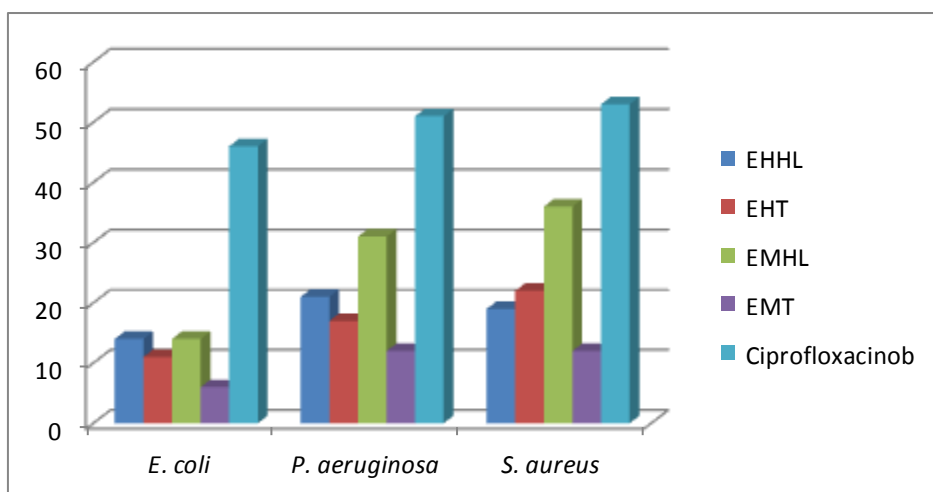
En la tabla 13, se muestra un resumen de los valores de la concentración letal media del ensayo de *A. salina* para cada extracto, la cual demuestra que el extracto de metanol de toronjil al poseer una CL₅₀ menor que la de los otros extractos, posee una actividad letal mayor que los mismos, seguido por el extracto de hexano de hierba luisa (el cual también mostró una gran actividad letal frente a *A. salina*), siendo el extracto de metanol de hierba luisa, el que menor actividad letal posee; todos son considerados letales y podrían poseer compuestos bioactivos ya que tienen un CL₅₀ < 1000 µg/ml (MEYER *et al.*, 1982).

3.4. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Tabla 14. Actividad antibacteriana de una solución de 20 mg/ml de los extractos.

Bacterias	Halos de inhibición (mm) promedios ^a				Ciprofloxacino ^b
	EHHL	EHT	EMHL	EMT	
<i>E. coli</i>	14	11	14	6	46
<i>P. aeruginosa</i>	21	17	31	12	51
<i>S. aureus</i>	19	22	36	12	53

EHHL: Extracto de hexano de hierba luisa; EHT: Extracto de hexano de toronjil; EMHL: Extracto de metanol de hierba luisa; EMT: Extracto de metanol de toronjil; a: Media de los valores de dos réplicas; b: antibiótico de referencia; pocillo de 6 mm de diámetro.



EHHL: Extracto de hexano de hierba luisa; EHT: Extracto de hexano de toronjil; EMHL: Extracto de metanol de hierba luisa; EMT: Extracto de metanol de toronjil; b: antibiótico de referencia; pocillo de 6 mm de diámetro.

Figura 4. Representación de los valores de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana de una solución de 20 mg/ml de los extractos en estudio.

En la tabla 14, se muestran los valores de los halos de inhibición que se presentaron en los medios de cultivo sembrados con distintas cepas de bacterias, luego de ser expuestos

a una solución de una concentración de 20 mg/ml de los diferentes extractos. Se puede observar que el extracto de hexano de hierba luisa y el de metanol tuvieron mayor actividad antibacteriana contra la cepa de *E. coli*.

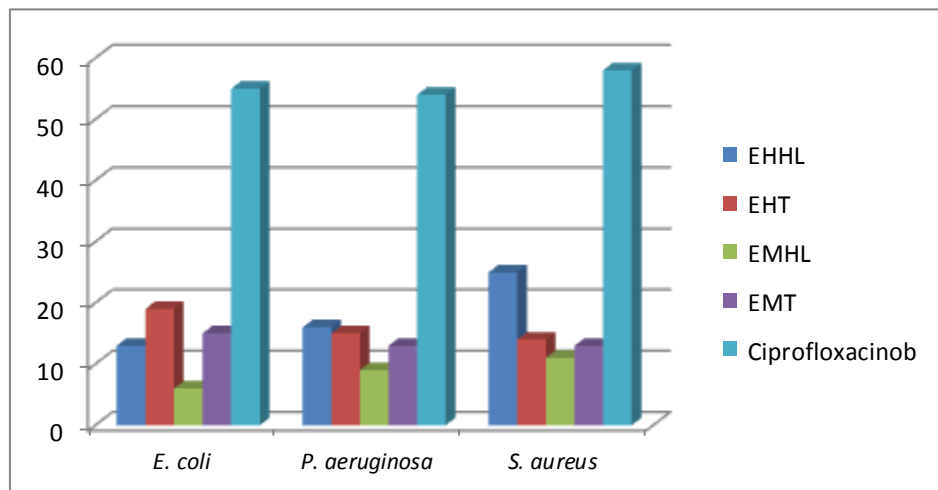
Para la cepa de *P. aeruginosa*, el extracto metanólico de hierba luisa presentó mayor actividad antibacteriana, seguido del hexánico. Es evidente a su vez que para la cepa de *S. aureus* el extracto que presentó mayor actividad antibacteriana fue el de metanol de hierba luisa, seguido del extracto hexánico de toronjil.

En término general, como se observa en la figura 4 se puede deducir, que el extracto que presenta mayor actividad antibacteriana a una concentración de 20 mg/ml, contra todas las cepas de bacterias ensayadas, fue el de metanol de hierba luisa; y el que mostró un efecto antibacteriano menor, fue el de metanol de toronjil. Los extractos hexánicos poseen una similitud en su actividad bactericida.

Tabla 15. Actividad antibacteriana de una solución de 40 mg/ml de los extractos.

Bacterias	Halos de inhibición (mm) promedios ^a				Ciprofloxacina ^b
	EHHL	EHT	EMHL	EMT	
<i>E. coli</i>	13	19	6	15	55
<i>P. aeruginosa</i>	16	15	9	13	54
<i>S. aureus</i>	25	14	11	13	58

EHHL: Extracto de hexano de hierba luisa; EHT: Extracto de hexano de toronjil; EMHL: Extracto de metanol de hierba luisa; EMT: Extracto de metanol de toronjil; a: Media de los valores de dos réplicas; b: antibiótico de referencia; pocillo de 6 mm de diámetro.



EHHL: Extracto de hexano de hierba luisa; EHT: Extracto de hexano de toronjil; EMHL: Extracto de metanol de hierba luisa; EMT: Extracto de metanol de toronjil; b: antibiótico de referencia; pocillo de 6 mm de diámetro.

Figura 5. Representación de los valores de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana de una solución de 40 mg/ml de los extractos en estudio.

En la tabla 15, se muestran los valores de los halos de inhibición que se midieron luego que las bacterias sembradas en los medios de cultivo, fueron expuestas al efecto de distintos extractos de una concentración de 40 mg/ml. Se puede observar que el extracto de hexano de toronjil y el de metanol mostraron un mayor efecto antibacteriano contra la cepa de *E. coli*.

En relación a la cepa de *P. aeruginosa* los extractos hexánicos de hierba luisa, seguido del de toronjil presentaron mayor actividad antibacteriana contra las cepas ensayadas. Es evidente a su vez que para la cepa de *S. aureus*, el extracto que mostró mayor actividad antibacteriana, fue el de hexano de hierba luisa, seguido del extracto hexánico de toronjil.

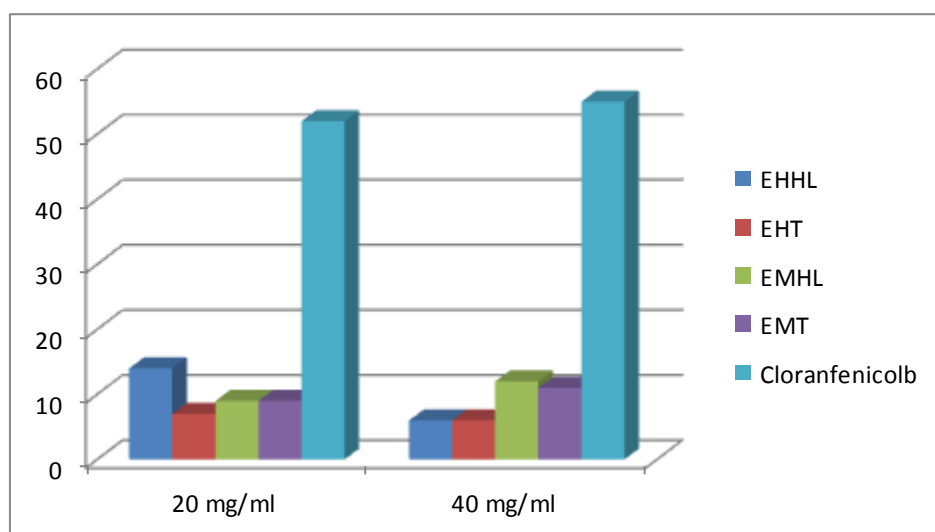
Según lo observado en la Figura 15, en término general, se puede inferir que el extracto que presenta mayor actividad antibacteriana a una concentración de 40 mg/ml independientemente del tipo de bacteria ensayada, es el de hexano de hierba luisa, y el de menor actividad antibacteriana, es el de metanol de hierba luisa.

3.5. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Tabla 16. Actividad antifúngica de los extractos estudiados.

Hongo	Concentración n (mg/ml)	Halos de inhibición (mm) promedios ^a				
		EHHL	EHT	EMHL	EMT	Cloranfenicol ^b
<i>C. albicans</i>	20	14	7	9	9	52
<i>C. albicans</i>	40	6	6	12	11	55

EHHL: Extracto de hexano de hierba luisa; EHT: Extracto de hexano de toronjil; EMHL: Extracto de metanol de hierba luisa; EMT: Extracto de metanol de toronjil; a: Media de los valores de dos replicas; b: antifúngico de referencia; pocillo de 6 mm de diámetro.



EHHL: Extracto de hexano de hierba luisa; EHT: Extracto de hexano de toronjil; EMHL: Extracto de metanol de hierba luisa; EMT: Extracto de metanol de toronjil; a: Media de los valores de dos replicas; b: antifúngico de referencia; pocillo de 6 mm de diámetro.

Figura 6. Representación de los valores de los halos de inhibición de la actividad antifúngica de soluciones de 20 mg/ml y 40 mg/ml de los extractos en estudio.

Según la tabla 16, se puede notar que los halos de inhibición que se formaron en los medios de cultivo sembrados con una cepa específica de hongo, luego de ser expuestos a los diferentes extractos con diferentes concentraciones (20 y 40 mg/ml), corresponden a una actividad antifúngica a una mínima concentración; mientras que al utilizar una mayor concentración, no se observa la acción inhibitoria del crecimiento de *C. albicans*.

El extracto con mayor efecto antifúngico (fuerte) a una concentración de 20 mg/ml, es el de hexano de hierba luisa, en término medio se encuentran los extractos metanólicos de hierba luisa y toronjil (acción inhibitoria moderada), y el de menor actividad antifúngica es el hexánico de toronjil, lo cual se estableció de acuerdo al tamaño de los halos formados (Tabla 16 y Figura 6).

A una concentración de 40 mg/ml, el extracto con mayor actividad antifúngica, fue el de metanol de hierba luisa, seguido del metanólico de toronjil, y los extractos hexánicos de hierba luisa y toronjil, no mostraron ningún efecto antifúngico contra la cepa de hongo ensayada, cuyo diámetro medido es el del pocillo solamente, por no formarse halo de inhibición alrededor del pocillo (Tabla 16 y Figura 6).

4. CONCLUSIONES

1. Mediante el tamizaje fitoquímico realizado a diferentes extractos de las dos plantas, se detectó la presencia de cumarinas y metilencetonas, esteroides y triterpenos, fenilpropanoides, glicósidos cardiotónicos, catequinas y saponinas entre los compuestos representativos tanto en los extractos de hierba luisa como en los de toronjil.
2. Por medio del ensayo de letalidad contra *Artemia salina*, se pudo determinar que el extracto de metanol de hierba luisa es el que posee una actividad letal muy significativa, debido a que mata el 50% de los organismos a una concentración muy baja en relación a la de los otros extractos ($CL_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$).
3. El extracto de metanol de hierba luisa a 20 mg/ml, posee mayor actividad antibacteriana y el de menor actividad antibacteriana, es el de metanol de toronjil. A una concentración de 40 mg/ml, el extracto con mayor actividad antibacteriana, es el de hexano de hierba luisa, y el de menor actividad antibacteriana, es el de metanol de hierba luisa.
4. Para la actividad antifúngica, se observó que el extracto con mayor capacidad inhibitoria del crecimiento fúngico, fue el metanólico de hierba luisa, seguido del metanólico de toronjil.
5. Se puede inferir que algunos de los metabolitos secundarios detectados en los extractos de ambas plantas, podrían ser responsables de la antibiosis observada en las pruebas de actividad biológica, y a su vez afirmar que dichas plantas constituyen una fuente promisoría de compuestos químicos de interés farmacológico.

6. RECOMENDACIONES

1. Continuar con esta investigación con ambas plantas, para lograr la identificación de los compuestos que estas presentan, determinar otras propiedades biológicas de las mismas y cuantificar los metabolitos detectados que le dan actividad farmacológica a dichas especies.
2. Continuar con el uso de las plantas medicinales y valorar las riquezas del suelo de nuestro hábitat, de la misma manera incentivar a la población a el cuidado y conservación de las mismas.
3. Conociendo la actividad inhibitoria del crecimiento de microorganismos y letalidad de cada extracto, realizar un seguimiento con la investigación para en un futuro elaborar fitofármacos con propiedades antibacterianas o antitumorales.

6. BIBLIOGRAFÍA

ARÉVALO, M. y ENCISO, A. Determinación de la actividad antimicrobiana (bacterias, hongos y levaduras) de algunas especies de *Espeletias* encontradas en el páramo de Guasca. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. 1996. p. 14-25.

BARRETO, J. Efectos antimicrobianos del diente de león (*Taxaxacum officinale*) y el gualanday (*Jacaranda obtusifolia*) sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* causantes de enfermedades de la piel. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. 1997. p. 9-29.

BVSDE. *Pseudomonas aeruginosa*. Documentos microbiológicos de bacterias. <http://www.bvsde.paho.org/cd-gdwq/docs_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Pseudomonas.pdf>

CABRERA, Y. FADRAGAS, A. y GUERRERO, L. Antibióticos naturales. Mito o realidad. Revista Cubana de medicina general integral. 21 (3). 2005. 1.

CRUZ, A. Antibióticos naturales. Editorial Selector S.A. México. 2004. P. 16.

DAVIS, P. Aromaterapia de la A a la Z. Editorial EDAF S.L. Madrid. 1988. p. 212-213.

DE LA TORRE, L., ALARCÓN, D., KVIST, L. y SALAZAR, J. Usos medicinales de las plantas. Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Herbario QCA & Herbario AAU. Ecuador. 2008. p. 105–114.

DE PAULA, J. y MARTÍNEZ, A. Acción antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de *Rubus urticaefolius*. Rev. Cubana Plant. Med. 5(1) 2000: 26-9.

DIBICO. Medio de cultivo. Bacteriología General. DIBICO S.A. Mexico. 2014. <http://www.probiotek.com/wp-content/uploads/2014/01/1059-E_AGAR-DEXTROSA-Y-PAPA.pdf>

FERNÁNDEZ, A., VALDES, C., MENDIOLA, J. y GARCÍA, M. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. 2009. <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602009000300009>

FONNEGRA, R. y JIMENEZ, S. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Editorial Universidad de Antioquia. Colombia. 2007. 343p.

FORERO. G. Estudio Fitoquímico del extracto etanólico de la madera de "*Virola carinata*" (Myristicaceae). Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia. Colombia. 2002. p. 98.

GAMAZO, C., LÓPEZ, I. y DÍAZ, R. Manual Práctico de Microbiología. Editorial MASSON S.A. Barcelona. 2000. p. 40-47.

GARCÍA, B., DÍAZ, R. y MENDOZA, J. Importancia del Bioensayo de *Artemia salina*. Universidad Autónoma de la Ciudad de México. México. <http://www.comprendamos.org/alephzero/52/importancia_del_bioensayo_de_artemia_salina.html>.

GUALDRON, V. y LOPEZ, P. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre larvas de *Artemia salina* de algunas plantas superiores colombianas. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia. Colombia. 1994. p. 123.

HOOGESTEGER, C. Uso de plantas medicinales. Árbol Editorial S.A. México. 1994. 127p.

LOCK, O. Manual de Fitoterapia. Editorial Es Salud. Perú. 2001. p. 41-60 <<http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/cap4.pdf>>

MADUBUNYI, I. Antimicrobial activities of the constituents of *Garcinia kola* seeds. Intern. J. Pharm., 33(3) 1995: 232-237.

MARÍN, M. y GUIDOL, F. Antibióticos Betalactámicos. Servicio de enfermedades infecciosas. Hospital de Bellvitge. Universidad de Barcelona. España. 2003. 21:42.

MARTINEZ, R. Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibiótico de administración intravenosa a través de método in vitro. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 2005. p. 88.

MERCK. Manual de medios de cultivo. Alemania. 1994

MEYER, B., FERRIGNI, N., PUTNAM, J., JACOBSEN, L., NICOLS, D. y MCLAUGHIN, J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, 45(1) 1982: 31-34.

MONGELLI, E., COUSSIO, D. y CICCIA, G. Estudio de toxicidad aguda de plantas medicinales argentinas mediante el bioensayo de *Artemia salina* L. Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica. *Dominguezia* 12(1) 1995: p. 35-37.

MONTIEL, M. Introducción a la flora de Costa Rica. Editorial Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 1978. p. 141.

MUÑOZ, F. Plantas Medicinales y Aromáticas. Estudio cultivo y procesado. Editorial Aedos S.A. Barcelona. 1996. p. 175-176

OLIVEIRA, M., VELAZQUEZ, D. y BERMUDEZ, A. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales. *Revista de ciencia y tecnología de América*. 30 (8). 2005. 453-459.

ORTUÑO, M. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Editorial AIYANA. España. 2006. p. 223-224.

PARRA, L., SILVA, Y., GUERRA, S. y IGLESIAS, B. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts, *Phytomedicine*. 8(5) 2001: 395–400.

PEDRAZA, P. y CASTELLANOS, H. Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos in vitro. Parte X. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. 2009. p. 107.

PEÑARANDA, L. y SIERRA, M. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de partes aéreas de las especies *Bursera Sinamba* y *Bursera Graveolens* contra algunos microorganismos patógenos. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. 2003. p. 50-68.

PICAZO, J. Procedimiento en Microbiología clínica. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Editorial SEIMC. 2000. p. 4-6.

RETO, A., CARVAJAL, V. y VELÒZ, R. Guía moderna de medicina natural. Editorial ASDIMOR. Perú. 2002. p. 368.

RODRÍGUEZ, P y URIBE, N. Efecto antagónico de *Lactobacillus acidophilus* frente a *E.coli* y *Shiguella sp* aislados de materia fecal obtenida de un grupo de niños entre 1 y 7 años. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 1995. p. 20.

ROOPASHREE, T., RAMAN, D., SHOBHA, R. y NARENDRA, C. Antibacterial activity of antipsoriatic herbs: *Cassia tora*, *Momordica charantia* and *Calendula officinalis*. International Journal of Applied Research in Natural Products. India. 1(3) 2008: 20-28.

RONCANCIO, D. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos a partir de hojas y corteza de *Protium Calnense* (Burseráceas) frente a microorganismos patógenos transmitidos por diferentes vías. Pontificia Universidad Javeriana. 2001. Bogotá. p. 31-50.

RUIZ, M. y SUSUNAGA, C. Actividad antimicrobiana presente en partes aéreas de las especies *Bursera simaoruba* y *Bursera graveolens*, frente a microorganismo como: *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Fusarium oxisporum*, *Trichoderma viride* y *Botrytis cinerea*. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. 2000. p. 40.

SÁNCHEZ, L. y NEIRA, A. Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava. L* y *Psidium guineense. Sw* Editorial Cultura Científica. 2005. p. 40-44.

SHARAPIN, N., Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Editorial Convenio Andrés Bello. Bogotá. 2000. p. 198.

SOTO, R., VEGA G. y TAMAJON A. Instructivo técnico del cultivo de *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf (caña santa). Rev Cubana Plant Med [online], 7(2). 2002: 90-95.

TAROCO, R., SEIJA, V. y VIGNOLI, R. Temas de Bacteriología y Virología médica. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. 2008. <<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>>

TORRES, C. Investigación en la transformación secundaria de frutos, tubérculos, flores, hojas o tallos de especies pertenecientes a ecosistemas andinos. Editorial jardín Botánico José Celestino Mutis. Colombia. 2004. p. 2-14.

URIBE, C. seguimiento epidemiológico de infección nosocomial por *Staphylococcus aureus neticilino resistente* mediante electroforesis de campo pulsado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 2003. p. 21-22.

VEGA, M. Etnobotánica de la amazonia peruana. Editorial Abya-Yala. Ecuador. 2001. p. 50.

ANEXOS

ANEXO 1. Preparación del material vegetal (hierba luisa y toronjil)



Foto 1. Lavado de hojas de toronjil



Foto 2. Secado de hojas de toronjil al ambiente

ANEXO 2. Obtención de extractos



Foto 3. Maceración del material vegetal en solventes



Foto 4. Filtrado del material vegetal



Foto 5. Evaporación del solvente al ambiente



Foto 6. Evaporación en rotavaporador



Foto 7. Almacenamiento en vial pequeño



Foto 8. Obtención del extracto seco

ANEXO 3. Tamizaje fitoquímico

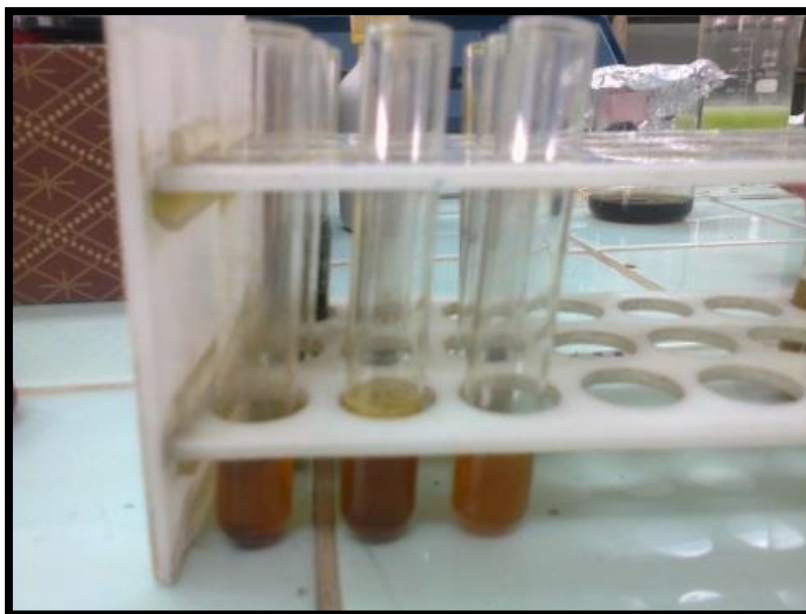


Foto 9. Determinación de metabolitos secundarios presentes en los extractos

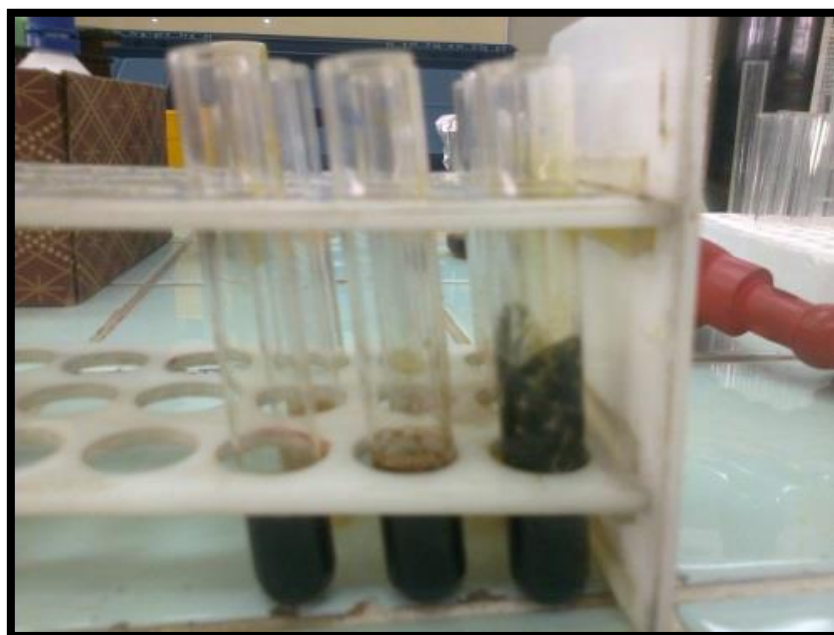


Foto 10. Observación de resultados positivos con formación de precipitados

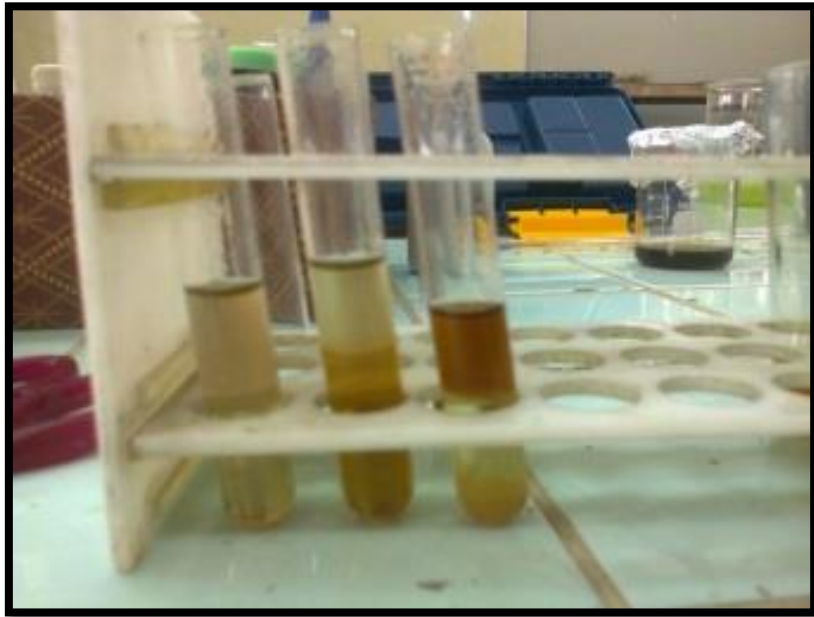


Foto 11. Observación de resultados positivos con separación de fases



Foto 12. Observación de resultados positivos con cambio de coloración y formación de espuma.

ANEXO 4. Actividad letal



Foto 13. Preparación de muestra patrón.



Foto 14. Preparación de diluciones seriadas.



Foto 15. Colocación de larvas de *A. salina* en cada tubo de dilución



Foto 16. Conteo de larvas de *A. salina* vivas para determinar el porcentaje de mortalidad

ANEXO 5. Actividad antimicrobiana



Foto 17. Preparación de extractos y patrón.



Foto 18. Preparación de medios de cultivo.



Foto 19. Inoculación de cepas en medios de cultivos.



Foto 20. Realización de pocillos



Foto 21. Llenado de los pocillos con concentraciones establecidas del extracto y de muestra patrón.

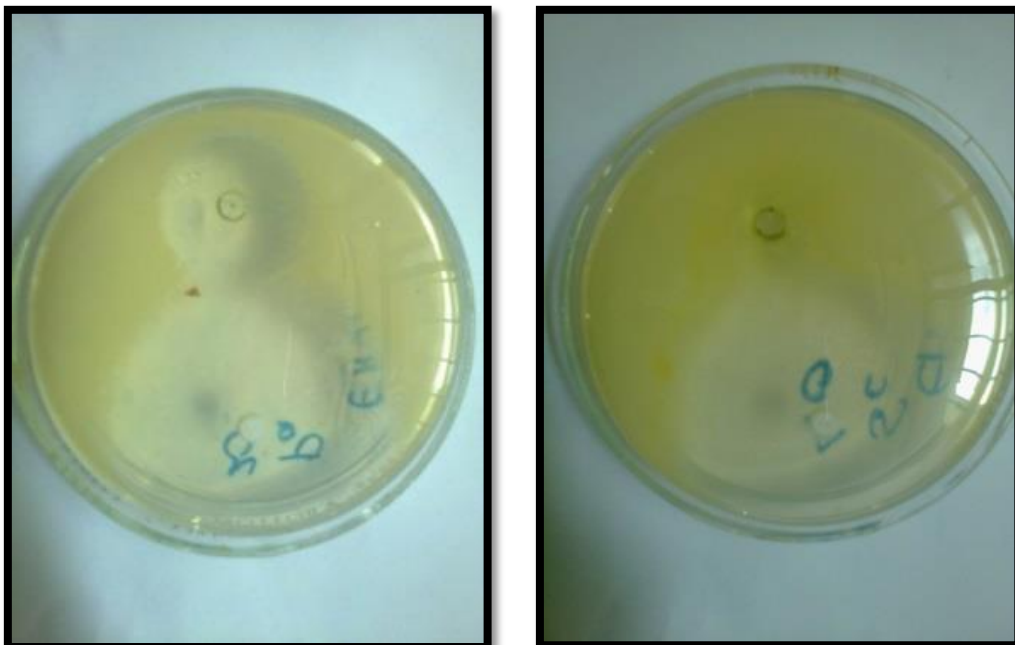


Foto 22. Lectura de resultados. Actividad antibacteriana positiva (foto de la izquierda).
Actividad antibacteriana negativa (foto de la derecha).

