


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
PROGRAMA EXPERIENCIAS DOCENTES CON LA COMUNIDAD
SUBPROGRAMA EDC-BIOLOGÍA



INFORME FINAL DE LA PRÁCTICA DE EDC
LABORATORIO DE PRODUCTOS FITOFARMACEÚTICOS
FARMAYA, S.A.
DE ENERO DEL 2005 A ENERO DEL 2006

LUIS EDUARDO ÁLVAREZ HERNÁNDEZ
LICDA. EUNICE ENRÍQUEZ

LICDA. LIDIA GIRON
Vo. Bo. ASESOR INSTITUCIONAL

ÍNDICE

	Página
1. Introducción	1
2. Cuadro resumen de las actividades de EDC	1
3. Actividades realizadas durante la práctica de EDC	2
3.1. Actividades de servicio	2
3.1.1. Horas obligatorias Herbario BIGU	2
3.1.2. Control de calidad farmacobotánico	4
3.1.3. Revisión general del Herbario de FARMAYA, S.A.	5
3.1.4. Determinación y/o montaje de plantas para la colección del Herbario de FARMAYA.	5
3.2. Actividades de Docencia	6
3.2.1. Capacitación a estudiantes de Postgrado en el curso de Tecnología Fitofarmacéutica I.	6
3.2.2. Capacitación a trabajadores de la Unidad de Práctica (FARMAYA).	6
3.2.3. Colecta, herborización, determinación y montaje de plantas para los proyectos de investigación del LIPRONAT.	7
3.2.4. Capacitación a una Licda. Salvadoreña sobre el Análisis de Control de calidad Farmacobotánico realizado en FARMAYA, S.A.	8
3.2.5. Herborización y determinación de tres plantas para Proyectos del LIPRONAT y para tesis de Químicos Farmacéuticos.	8
3.2.6. Capacitación sobre Extracción y concentración de extractos vegetales utilizando la técnica por percolación y concentración en Rotavapor.	9
3.2.7. Capacitación para aprender a realizar la actividad antimicrobiana <i>in Vitro</i> .	9
3.2.8. Capacitación para aprender a realizar el Tamizaje antimicótico <i>in Vitro</i> .	10
3.2.9. Capacitación para aprender a realizar la Citotoxicidad con <i>Artemia salina</i> .	
3.2.10. Capacitación para aprender a realizar el Tamizaje de la actividad larvicida.	10
3.2.11. Capacitación para aprender a usar el programa de computadora Finney (DOS).	11
3.3. Actividades no planificadas	11
3.3.1. Corrección y ampliación en la información del PEO – Manual de Procedimientos del Proyecto Biodiversidad OEA. Técnica de herborización.	11
3.3.2. Revisión de las muestras de referencia Materia-médica.	12
3.3.3. Elaboración de un Manual PEO sobre el Manejo y Configuración de un GPS.	12
3.4. Actividades de Investigación	13
3.4.1. Colecta en el campo de <i>Buddleja americana</i>	13
3.4.2. Extracción por percolación del extracto con diclorometano y con metanol, y su respectiva concentración en rotavapor.	13
3.4.3. Preparación del agar-planta para determinar tanto la actividad antibacteriana como la actividad antilevadura.	14

3.4.4. Preparación del inóculo bacteriano y levadura.	14
3.4.5. Demostración de la actividad antibacteriana y antilevadura.	15
3.4.6. Preparación del agua de mar y cultivo de huevos de <i>Artemia salina</i> en la solución de agua de mar.	15
3.4.7. Demostración de la actividad citotóxica de los dos extractos obtenidos de <i>Buddleja americana</i> .	16
3.4.8. Demostración de la actividad larvicida de los dos extractos de <i>Buddleja americana</i> .	17

4. Anexos

1. INTRODUCCIÓN

En las prácticas de EDC, como se mencionó en el Diagnóstico, se llevan a cabo tres actividades importantes: servicio, docencia e investigación. A cada una de estas actividades se le asignó cierta cantidad de horas, las cuales deben completarse según lo establecido en el Plan de Trabajo. Las horas que asignadas para cada actividad cambiaron ya que se pasaron horas de investigación y docencia a servicio. Las horas asignadas fueron: 452 horas para servicio, 124 horas para docencia y 174 horas para el proyecto de investigación. En cada actividad se enumeran todas las subactividades realizadas con el nombre de la actividad, los objetivos, resultados y limitaciones que se pudieron presentar al realizar cada subactividad. También se incluyen las subactividades realizadas en actividades no planificadas, las cuales son actividades que no fueron programadas en el Plan de Trabajo.

En el informe final se indican todas las actividades de servicio, docencia e investigación realizadas en el período de enero del 2005 a febrero del 2006. Este informe final debe ser entregado por escrito a los asesores de EDC y se debe hacer una presentación oral del informe. La entrega y presentación del informe final es el 14 de febrero del 2006.

2. CUADRO RESUMEN DE LAS ACTIVIDADES DE EDC

Programa Universitario	Nombre de la actividad	Fecha de la actividad	Horas de EDC ejecutadas
A. Servicio	Horas obligatorias Herbario BIGU	24/01/05 – 30/01/05	60
A. Servicio	Control de calidad farmacobotánico	18/01/05 – 08/02/05	266
A. Servicio	Revisión general del Herbario de FARMAYA, S.A.	18/01/05 – 03/02/05	129.5
A. Servicio	Determinación y/o montaje de plantas para la colección del Herbario de FARMAYA	18/01/05 – 23/01/05	56.5
B. Docencia	Capacitación a estudiantes de Postgrado en el curso de Tecnología Fitofarmacéutica I	02/04/05	3
B. Docencia	Capacitación a trabajadores de FARMAYA.	18/04/05 y 16/05/05	3
B. Docencia	Colecta, herborización, determinación y montaje de plantas para los proyectos de investigación del LIPRONAT	13/06/05 – 26/07/05	39
B. Docencia	Herborización y determinación de tres plantas para Proyectos del LIPRONAT y para tesis de Químicos Farmacéuticos	04/07/05 – 07/07/05	15
B. Docencia	Capacitación a una Licda. salvadoreña sobre el Análisis de Control de Calidad Farmacobotánico realizado en FARMAYA, S.A.	24/08/05	5
B. Docencia	Capacitación sobre Extracción y concentración de extractos vegetales utilizando la técnica por percolación y concentración en Rotavapor	06/10/05	5

Programa Universitario	Nombre de la actividad	Fecha de la actividad	Horas de EDC ejecutadas
B. Docencia	Capacitación para aprender a realizar la actividad antimicrobiana <i>in Vitro</i>	10/10/05 – 18/10/05	25
B. Docencia	Capacitación para aprender a realizar el Tamizaje antimicótico <i>in Vitro</i>	10/10/05 – 14/10/05	10
B. Docencia	Capacitación para aprender a realizar la Citotoxicidad con <i>Artemia salina</i>	17/10/05 – 21/10/05	10
B. Docencia	Capacitación para aprender a realizar el Tamizaje de la actividad larvicida	24/10/05 – 26/10/05	10
B. Docencia	Capacitación para aprender a usar el programa de computadora Finney (DOS)	18/01/2006	3
C. Investigación	Colecta en el campo de <i>Buddleja americana</i>	15/03/05 – 16/09/05	32
C. Investigación	Extracción por percolación del extracto con diclorometano y con metanol, y su respectiva concentración en rotavapor	07/11/05 – 18/11/05	30
C. Investigación	Preparación del agar-planta para determinar tanto la actividad antibacteriana como la actividad antilevadura	21/11/05 – 25/11/05	5
C. Investigación	Preparación del inóculo bacteriano y levadura	21/11/05 – 25/11/05	15
C. Investigación	Demostración de la actividad antibacteriana y antilevadura	21/11/05 – 25/11/05	22
C. Investigación	Preparación del agua de mar y cultivo de huevos de <i>Artemia salina</i> en la solución de agua de mar	28/11/05 – 02/12/05	5
C. Investigación	Demostración de la actividad citotóxica de los dos extractos obtenidos de <i>Buddleja americana</i>	28/11/05 – 02/12/05	30
C. Investigación	Demostración de la actividad larvicida de los dos extractos de <i>Buddleja americana</i>	05/12/05 – 09/12/05	35
D. Elaboración de Diagnóstico, Plan de Trabajo, Perfil, Informes, Protocolo, Informe final, etc.		enero 2005 – enero 2006	226
TOTAL			1040

3. ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE LA PRÁCTICA DE EDC

Actividades de Servicio

Horas obligatorias Herbario BIGU

Objetivos:

- Que el estudiante preste servicio a las instalaciones del herbario BIGU de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Conocer y diferenciar entre las familias de plantas que se encuentran en Guatemala.
- Ordenar correctamente los especímenes de los armarios de acuerdo a su familia.

- Aprender todos los procedimientos para mantener el orden en las instalaciones del Herbario BIGU.

Descripción, método o procedimiento:

En el herbario BIGU se realizaron las siguientes actividades:

1) Se montaron nuevas plantas que ingresaron al Herbario. El procedimiento fue sencillo: Las mejores muestras se pegaron con goma en papel texcote en la forma ya establecida para el Herbario BIGU. Hubo algunas a las cuales se les puso etiqueta y a otras no. Después se les cubrió con una camisa de papel blanco para protegerlas. Las muestras que eran para la colección del Herbario se guardaron en los armarios acatando las reglas establecidas por el Herbario BIGU para el almacenamiento de las muestras. Hubo una sencilla razón por la cual a algunas no se les puso etiqueta y fue debido a que todavía no se habían impreso dichas etiquetas para estas plantas. Las plantas sin etiqueta fueron las del proyecto del Ingeniero Jorge Mario.

2) Las muestras debidamente montadas, etiquetadas, enumeradas y con el sello del Herbario, almacenadas en el armario de intercalado, se intercalaron en los diferentes armarios de la colección del Herbario. Las muestras que ya estaban dentro de la colección, únicamente se intercalaron y el procedimiento fue: 1) buscar en el listado el No. del armario donde se encontraba la familia de la especie; 2) ya encontrado el número de armario se procedió a intercalar la muestra en orden alfabético por el nombre científico. Para las muestras montadas que tenían especies nuevas para la colección se realizó un procedimiento extra. En dicho procedimiento se colocó la muestra dentro de una camisa de papel Manila; en donde previamente se escribió en la parte inferior el nombre científico, y más abajo el nombre de la familia de la planta montada y luego se le colocó el sello del Herbario. Hecho esto se procedió a intercalar y por último se anotó en el listado cuántas fueron las plantas nuevas ingresadas para las diferentes familias. Esto se hizo anotando dichos datos en las respectivas etiquetas, ubicadas en cada armario, en donde aparece el número de especies que hay en cada familia.

3) Se les puso camisas de papel blanco a las muestras de toda la colección del Herbario que estaban cubiertas con papel periódico. El procedimiento fue el siguiente: Se fue revisando armario por armario, familia por familia y especie por especie para buscar las muestras que tenían papel periódico y a éstas se les ponía la camisa de papel blanco.

4) Se procedió a ingresar en la base de datos la información de las especies vegetales que se van a utilizar para intercambio con otros herbarios nacionales e internacionales. La información ingresada fue # de paquete, # de muestra, nombre de la familia y nombre científico.

Resultados:

- La cantidad de plantas montadas fueron unas 120 aproximadamente.
- Se intercalaron aproximadamente 45 muestras.
- Se les cambió camisas a las muestras de 11 armarios.
- Se ingresaron 150 especies a la base de datos del Herbario.
- Se completaron las 60 horas de servicio del Herbario.

Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

Control de calidad farmacobotánico

3.1.2.1. Objetivo: Realizar el análisis de control de calidad farmacobotánico a la materia prima vegetal utilizada para la producción de las medicinas distribuidas por los laboratorios FARMAYA.

3.1.2.2. Descripción, método o procedimiento:

- A las muestras que son ingresadas a FARMAYA se les realiza primero un análisis de Control de Calidad Microbiológico antes de ingresar al análisis de Control de Calidad Farmacobotánico.
- Al ingresar al Departamento de Control de Calidad Farmacobotánico lo primero que se hace es analizar las muestras para determinar si la planta ingresada al laboratorio es la correcta. Por ejemplo: si el principio activo a utilizar se encuentra en una especie específica como *Piper scabrum* y la muestra ingresada es *Piper cayoense* es obvio que la medicina o producto natural final no contiene el o los principios activos utilizados para el tratamiento descrito para dicho producto natural.

La metodología utilizada para esta actividad es la misma para la determinación botánica de una planta: a) se observa la morfología externa de la planta y se anotan sus características; b) cuando la muestra botánica está muy seca y frágil es muy difícil manipularla, entonces lo que se hace es colocar dicha muestra en un beaker con agua y jabón. Esto humedece la muestra y se puede manipular mejor; c) con la ayuda de claves taxonómicas, muestras de referencia y las colecciones del Herbario de FARMAYA se determina su nombre científico correcto.

Cuando la planta ingresada no es la correcta se avisa al jefe del Departamento de Control de Calidad para rechazar la materia prima vegetal enviada al laboratorio. Si la planta es la correcta se procede con el siguiente punto.

- Se procede con el análisis macro morfológico. En este análisis se observa el color, olor (análisis organoléptico) de la muestra botánica. También se procede a observar contaminación por materias extrañas (haciendo uso del estereoscopio) como: 1) otras partes de la propia planta; 2) órganos ennegrecidos o deteriorados; 3) partes de otras plantas; 4) insectos o larvas; 5) mohos (principalmente); y 6) partículas de tierra, arena, piedras y otros considerados como materia extraña. Las materias extrañas del numeral 1) y 2) se pueden presentar en un porcentaje \leq al 10% del contenido total de la muestra. En cambio los otros incisos no deben presentarse. Si se presentan se rechaza la muestra.
- Toda la información obtenida en los dos incisos anteriores se anotan en una hoja de certificado de calidad de la materia prima vegetal, la cual lleva un orden correlativo que va de acuerdo al orden en el cual las plantas fueron ingresadas a FARMAYA.
- Por último se registran los resultados y se manda un informe a la Sección de Control de Calidad.

3.1.2.3. Resultados:

- Durante el período de enero del 2005 a febrero del 2006 analicé un total de 137 muestras. De las 137 muestras se rechazaron 11 por no cumplir con las especificaciones del control de calidad farmacobotánico. Se realizó un total de 266 horas.

3.1.2.4. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

Revisión general del Herbario de FARMAYA, S.A.

Objetivo: Hacer una revisión general del Herbario de la empresa para verificar el buen estado de las muestras, datos en tarjetas y en el cuaderno de ingreso correlativo de las mismas.

Descripción, método o procedimiento:

- Las colecciones del Herbario de FARMAYA están guardadas dentro de cajas que contienen cierta cantidad de plantas montadas. Estas cajas están enumeradas de la siguiente manera: A-1, A-2, B-1, C-1, C-2 y así sucesivamente.
- Lo que se hizo fue tomar primero una de las cajas y observar detenidamente si las plantas montadas estaban dañadas o tenían hongos u otras plagas. Se anotaban los datos más importantes como: # de caja, # de registro, familia, nombre común, nombre científico, lugar de colecta, número de muestras y anotar cual muestra está dañada. Y así se hizo con las demás cajas que se trabajaron en este período de tiempo.

Resultados:

- Durante el período de enero del 2005 a febrero del 2006 se revisaron 30 cajas dando un total de 501 muestras analizadas. De las 501 plantas 19 están dañadas y se necesita conseguir nuevas muestras para sustituir a las dañadas. Se realizó un total de 129.5 horas.

Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

3.1.4. Determinación y/o montaje de plantas para la colección del Herbario de FARMAYA.

3.1.4.1. Objetivo: Aumentar la colección de plantas del Herbario de FARMAYA.

3.1.4.2. Descripción, método o procedimiento:

- Se determinó el nombre científico de las plantas utilizando para ello la Flora de Guatemala y un Diccionario de Botánica.
- Después de determinadas las plantas se revisaron las colecciones del Herbario BIGU para poder comprobar que el nombre científico al cual llegué era el correcto.
- Como siguiente punto corroboré la información con el Ing. Mario Véliz para estar completamente seguro de que la determinación fue exitosa.
- El Ing. Mario Véliz dio el Visto Bueno y se llegó finalmente al nombre científico correcto de las plantas.

- Por último se montaron, etiquetaron y almacenaron las muestras en el Herbario de FARMAYA.

3.1.4.3. Resultados:

- 11 plantas fueron determinadas y montadas: *Passiflora mollissima*, *Solanum nigrescens*, *Brosimum allicastrum*, *Hamelia patens*, *Buddleja americana*, *Passiflora edulis*, *Vanilla* sp., *Manilkara achras*, *Jaltomata procumbens*, *Sida rhombifolia* y *Citrus aurantium*.
- 12 plantas fueron únicamente montadas: *Dioscorea alata*, *Euphorbia lancifolia*, *Hibiscus sabdariffa*, *Punica granatum*, *Cecropia obtusifolia*, *Hibiscus rosa sinensis*, *P. scabrum* (ahora llamada *P. hispidum*), *Salvia mycrophylla*, *Tagetes lucida* y *Cornutia pyramidata*.
- Se realizó un total de 56.5 horas.

3.1.4.4. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

3.2. Actividades de Docencia

3.2.1. Capacitación a estudiantes de Postgrado en el curso de Tecnología Fitofarmacéutica I (ver Anexo 1).

3.2.1.1. Objetivo: Compartir todos los conocimientos adquiridos en FARMAYA con los estudiantes de Postgrado que están optando a una Maestría en Producción y uso de Plantas Medicinales.

3.2.1.2. Descripción, método o procedimiento:

- Los estudiantes de Postgrado se dividieron en dos grupos: A y B para hacer más fácil el recorrido dentro de las instalaciones de FARMAYA.
- A los dos grupos se les enseñó cada uno de los diferentes departamentos de la institución en diferente orden. En cada departamento se les dio una breve explicación de 20 minutos de la función de cada uno de ellos.
- A mí me tocó hablarles sobre el Análisis Farmacobotánico que se realiza en los laboratorios de FARMAYA.

3.2.1.3. Resultados: Se capacitó a 10 estudiantes de Postgrado de diferentes Facultades y Escuelas. Esta actividad tuvo una duración de 3 horas.

3.2.1.4. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

3.2.2. Capacitación a trabajadores de FARMAYA (Ver Anexo 2).

3.2.2.1. Objetivos:

- Compartir todos los conocimientos adquiridos en la Universidad de San Carlos de Guatemala y en FARMAYA con los empleados de FARMAYA.
- Tecnificar y mejorar la calidad de los empleados de FARMAYA.

3.2.2.2. Descripción, método o procedimiento:

- Se realizaron dos capacitaciones los días 18/04/2005 y el 16/05/2005. Los temas de cada capacitación fueron: 1) Farmacobotánica y control de calidad farmacobotánico y 2) Almacenamiento materia prima vegetal. Plagas en almacenamiento y métodos para su control y prevención.
- El procedimiento fue sencillo: Reunimos a los empleados en un salón y se les impartió las capacitaciones haciendo uso de carteles y del pizarrón.

3.2.2.3. Resultados: Se capacitó a todos los empleados de la Unidad de Práctica (lugar donde realicé mis prácticas de EDC). Cada capacitación tuvo una duración de 1 hora y media, dando un total de 3 horas.

3.2.2.4. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

3.2.3. Colecta, herborización, determinación y montaje de plantas para los proyectos de investigación del LIPRONAT.

3.2.3.1. Objetivo: Dominar las técnicas de colecta, herborización, determinación y montaje de muestras botánicas para las colecciones de un Herbario.

3.2.3.2. Descripción, método o procedimiento:

- Se realizaron dos giras de campo para coleccionar plantas para varios proyectos de investigación que tiene a cargo el LIPRONAT. La primera gira se realizó el lunes 13 de junio del 2005 en el ICTA y San José Acatenango, Sacatepéquez. La segunda gira se realizó los días 14 y 15 de junio en dos fincas de Cobán. Se colectaron 13 plantas. La metodología utilizada fue: 1) En el ICTA se colectaron las muestras cultivadas que ellos tienen; 2) En Acatenango, observamos detenidamente en la carretera la presencia de *C. Pyramidata* y *C. grandifolia*; 3) En las dos fincas de Cobán hicimos muestreos oportunisticos para la colecta de *Piper* sp.
- Cada planta colectada se iba herborizando de una vez; anotando la información respectiva en el papel periódico.
- El 16 de junio del 2005 coloqué todas las muestras botánicas colectadas en la secadora del Herbario BIGU por tres días.
- Después de los tres días cierta parte de las plantas colectadas fueron enviadas al Ing. Mario Véliz para que las determinara. Esto se hizo porque el Ing. está trabajando conjuntamente con el LIPRONAT en algunos proyectos.
- La otra parte de las plantas, todas las *Piper* las estoy determinando yo junto con mi compañero Max Mérida, asesorados por el Ing. Mario Véliz. Las determinaciones se están llevando a cabo dentro de mi Unidad de Práctica y en el Herbario del CECON.
- Las muestras ya determinadas han sido enviadas al Ing. Mario Véliz para confirmar si el nombre científico al que llegamos es el correcto para cada una de las *Piper*.

3.2.3.3. Resultados: En esta actividad fueron colectadas 13 plantas, pero solamente 6, las *Piper*, están siendo determinadas por Max y yo. En este período solo se determinaron 4 de las seis: *P.*

hispidum, *P. aduncum*, *P. auritum* y *P. umbellatum*. Todo este proceso desde la primera colecta hasta la última determinación hecha llevó un total de 39 horas.

3.2.3.4. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

3.2.4. Capacitación a una Licda. salvadoreña sobre el Análisis de Control de Calidad Farmacobotánico realizado en FARMAYA, S.A. (ver Anexo 3).

3.2.4.1. Objetivo:

- Capacitar a una Licda. Salvadoreña sobre los diferentes procesos que los Laboratorios FARMAYA realizan en el Análisis Farmacobotánico para el proceso de Control de Calidad de muestras vegetales.

3.2.4.2. Descripción, método o procedimiento:

- El día miércoles 24/08/05 se realizó la capacitación en las instalaciones de los Laboratorios FARMAYA. El procedimiento utilizado fue el mismo que se hizo con los estudiantes de Postgrado sobre el Análisis de Control de Calidad Farmacobotánico.

3.2.4.3. Resultados:

- La profesional capacitada adquirió más conocimientos para una mejor aplicación del Control de Calidad en un laboratorio Fitoterapéutico. Se realizó un total de 5 hora.

3.2.4.4. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

3.2.5. Herborización y determinación de tres plantas para Proyectos del LIPRONAT y para tesis de Químicos Farmacéuticos.

3.2.5.1. Objetivo: Dominar las técnicas de herborización y determinación de plantas.

3.2.5.2. Descripción, método o procedimiento:

- Determiné el nombre científico de 3 plantas; utilizando para ello la Flora de Guatemala y de un Diccionario de Botánica.
- Después de determinadas las plantas revisé las colecciones del Herbario BIGU para poder comprobar que el nombre científico al cual llegué es el correcto.
- Como siguiente punto corroboré la información con el Ing. Mario Véliz para estar completamente seguro de que la determinación fue exitosa.
- El Ing. Mario Véliz dio el visto bueno y se llegó finalmente al nombre científico correcto de las tres plantas.

3.2.5.3. Resultados:

- Los nombres científicos determinados para las tres plantas son: *P. patulum* (ahora llamada *P. marginatum*), *Solanum tequilense* y *Passiflora quadrangularis*. Este proceso llevó un total de 15 horas.

3.2.5.4. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

3.2.6. Capacitación sobre Extracción y concentración de extractos vegetales utilizando la técnica por percolación y concentración en Rotavapor.

3.2.6.1. Objetivo:

- Aprender la técnica de extracción por percolación.
- Aprender a como se debe de utilizar un Rotavapor para concentrar el extracto vegetal crudo.

3.2.6.2. Descripción, método o procedimiento

- Como primer paso la Licenciada Ruth me explicó los principios básicos del funcionamiento de un percolador en el laboratorio del LIPRONAT. Luego me explicó todos los pasos que se encuentran en la metodología del protocolo de investigación. Mientras me explicaba yo iba ayudando a realizar las pruebas o ensayos.

3.2.6.3. Resultados: Aprendí a realizar extracciones en plantas utilizando la técnica de extracción por percolación y a concentrar el extracto en Rotavapor. Esta capacitación tuvo una duración de 5 horas.

3.2.6.4. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

3.2.7. Capacitación para aprender a realizar la actividad antimicrobiana *in vitro*.

3.2.7.1. Objetivo:

- Aprender a preparar los medios de cultivo agar-planta.
- Aprender a preparar el inóculo bacteriano.
- Aprender como se debe inocular la cepa bacteriana en el agar-planta.
- Aprender a interpretar los resultados de la demostración de la actividad antibacteriana.
- Aprender a la técnica para la determinación de la CIM (Concentración inhibitoria mínima)

3.2.7.2. Descripción, método o procedimiento

- La metodología es la que está en el protocolo de investigación. La Licda. Isabel me impartió la capacitación en los laboratorios de Citohistología de los Químicos Biólogos.

3.2.7.3. Resultados: Aprendí todo el proceso que se necesita para comprobar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto vegetal. Esta capacitación tuvo una duración de 25 horas.

3.2.7.4. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

3.2.8. Capacitación para aprender a realizar el Tamizaje antimicótico *in vitro*.

3.2.8.1. Objetivo:

- Aprender a preparar el inóculo para hongos levaduriformes.

3.2.8.2. Descripción, método o procedimiento

- La metodología es la que está en el protocolo de investigación. La Licda. Isabel me impartió la capacitación en los laboratorios de Citohistología de los Químicos Biólogos.

3.2.8.3. Resultados: Aprendí todo el proceso que se necesita para comprobar la actividad antimicótica (hongos levaduriformes) *in vitro* del extracto vegetal. Esta capacitación tuvo una duración de 10 horas.

3.2.8.4. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

3.2.9. Capacitación para aprender a realizar la Citotoxicidad con *Artemia salina*.

3.2.9.1. Objetivo:

- Aprender a preparar el agua de mar para la eclosión de los nauplios de *Artemia salina*.
- Aprender a hacer los cultivos de *Artemia salina*.
- Aprender a hacer la determinación de la citotoxicidad.

3.2.9.2. Descripción, método o procedimiento

- La metodología es la que está en el protocolo de investigación. La Licda. Ruth me impartió la capacitación en el laboratorio del LIPRONAT.

3.2.9.3. Resultados: Aprendí todo el proceso que se necesita para determinar la citotoxicidad con *Artemia salina*. Esta capacitación tuvo una duración de 10 horas.

3.2.9.4. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

3.2.10. Capacitación para aprender a realizar el Tamizaje de la actividad larvicida.

3.2.10.1. Objetivo:

- Aprender la técnica para la determinación de la actividad larvicida (*Anopheles albimanus*).

3.2.10.2. Descripción, método o procedimiento

- La metodología es la que está en el protocolo de investigación. La Licda. Ruth me impartió la capacitación en el laboratorio del LIPRONAT.

3.2.10.3. Resultados: Aprendí todo el proceso que se necesita para determinar la actividad larvicida del extracto vegetal. Esta capacitación tuvo una duración de 10 horas.

3.2.10.4. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

3.2.11. Capacitación para aprender a usar el programa de computadora Finney (DOS).

3.2.11.1. Objetivos: Aprender a usar el programa de computadora Finney.

3.2.11.2. Descripción, método o procedimiento:

- La Licda. Ruth me fue explicando, paso a paso, como se deben de ingresar los datos o resultados que se obtuvieron en el experimento con *Artemia salina* en el programa Finney; para obtener la DL_{50} de los extractos que se obtuvieron. La capacitación se llevó a cabo en el laboratorio del LIPRONAT. Cuando ella terminó de explicarme yo comencé a trabajar solo para obtener mis resultados reales. Después de ingresados los datos se imprimió toda la información estadística y la información de la DL_{50} de cada uno de los extractos.

3.2.11.3. Resultados: Aprendí a utilizar el programa Finney para obtener la DL_{50} de cualquier extracto. Esta actividad tuvo una duración de 3 horas.

3.2.11.4. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

3.3. Actividades no Planificadas

3.3.1. Corrección y ampliación en la información del PEO – Manual de Procedimientos del Proyecto Biodiversidad OEA. Técnica de herborización (ver Anexo 4).

3.3.1.1. Objetivos: Corregir, ampliar y mejorar el PEO – Técnicas de Herborización.

3.3.1.2. Descripción, método o procedimiento: En esta actividad, FARMAYA me dio el PEO – Técnicas de herborización para que le hiciera las correcciones y ampliaciones. Primero se procedió con la lectura del documento para luego volverlo a leer y hacer las correcciones. En los incisos o párrafos en donde había que hacer una ampliación se marcó con un asterisco y en otro papel se escribieron las respectivas ampliaciones para luego agregarlas en el Manual PEO.

3.3.1.3. Resultados: Se mejoró el contenido del Manual PEO – Técnicas de herborización para que el estudiante que llegue a las instalaciones de la Unidad de Práctica (FARMAYA) pueda herborizar de una mejor manera las plantas. Para esta actividad se llevó un total de 3 horas.

3.3.1.4. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

3.3.2. Revisión de las muestras de referencia Materia-médica.

3.3.2.1. Objetivos: Mejorar la calidad de las muestras de referencia del Departamento de Control de Calidad Farmacobotánico.

3.3.2.2. Descripción, método o procedimiento:

- Las muestras de referencia (materia-médica) son las partes herborizadas de las plantas utilizadas por FARMAYA para la producción de sus medicamentos. Dichas muestras están dentro de frascos de vidrio, los cuales están debidamente identificados por: 1) nombre común, 2) parte utilizada (raíz, tallo, rizoma, hojas, etc.) y 3) nombre científico.
- El procedimiento a seguir fue el siguiente: 1) se revisó detalladamente cada frasco para separar las muestras dañadas de las muestras no dañadas.
- Ya hecha la separación procedí a anotar en una hoja los datos de las muestras dañadas para luego hacer un listado de estas.
- Después de terminar de hacer el listado envié una copia a mi asesora, quien es la encargada de conseguir las muestras para las referencias materia-médica.

3.3.2.3. Resultados: Revisé las 137 muestras de referencia, encontrando 41 muestras dañadas. Esta actividad tuvo una duración de 10 horas.

3.3.2.4. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

3.3.3. Elaboración de un Manual PEO sobre el Manejo y Configuración de un GPS (ver Anexo 5).

3.3.3.1. Objetivos: Elaborar un Manual PEO sobre Manejo y Configuración del GPS de la Unidad de Práctica para uso de estudiantes o profesionales.

3.3.3.2. Descripción, método o procedimiento:

- El primer paso fue conocer el significado de mucha terminología que utiliza cualquier GPS como Navigation, Plotter, Waypoint, Routes, etc. El segundo paso fue revisar el Manual en Inglés del GPS y de otros manuales de GPS, para tener una idea clara del funcionamiento general de cualquier GPS.
- Después de hacer las revisiones bibliográficas comencé a estructurar los temas y subtemas que llevaría el Manual. Hecho la estructuración procedí a escribir el Manual en el Procesador de texto Word.
- Este Manual es muy general sobre el uso de cualquier GPS con terminología clave, sobre como crear Waypoints o Routes, la cantidad de satélites necesarias para poder navegar, etc.

3.3.3.3. Resultados: FARMAYA tiene ahora un Manual PEO sobre el manejo y configuración de un GPS. Esta actividad tuvo una duración de 65 horas.

3.3.3.4. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

3.4. Actividades de Investigación: Determinación de la actividad biocida de dos extractos (diclorometano y metanólico) de *Buddleja americana* L. (Salvia Santa)

3.4.1. Colecta en el campo de *Buddleja americana*

3.4.1.1. Objetivo: Colectar la mayor cantidad de hojas de *Buddleja americana*

3.4.1.2. Descripción, método o procedimiento: Se llevaron a cabo tres salidas de campo, de una duración de 8 horas cada una, para la obtención de la materia vegetal en estudio. La primera salida de campo se realizó en la Comunidad, San Andrés Itzapa, Chimaltenango el 15 de marzo del 2005. Se colectaron 4 especies de plantas. La segunda salida de campo se realizó a cabo en el Volcán de Agua en Sacatepéquez el 18 de marzo del 2005. En esta segunda salida de campo se colectaron 2 especies. Por último, la tercera salida de campo se realizó en el municipio de Ciudad Vieja, Sacatepéquez el día 22 de marzo del 2005 y se colectaron 4 especies. El día viernes 16 de septiembre del 2005 se realizó una gira en las faldas del Volcán de Acatenango.

3.4.1.3. Resultados: Solamente en el municipio de Ciudad Vieja, Sacatepéquez se colectó *B. americana*. La cantidad de materia vegetal (hojas) colectado de *B. americana* fue la necesaria para la realización de la investigación. Esta actividad tuvo una duración de 32 horas.

3.4.1.4. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

3.4.2. Extracción por percolación del extracto con diclorometano y con metanol, y su respectiva concentración en rotavapor.

3.4.2.1. Objetivo:

- Obtener los extractos con diclorometano y con metanol utilizando la técnica de extracción por percolación.
- Concentrar los extractos hasta que tengan una consistencia sólida y obtener el porcentaje de rendimiento de los dos extractos.

3.4.2.2. Descripción, método o procedimiento

- Lo primero que se hizo fue quitarle todas las hojas a las muestras secas. Todas las hojas obtenidas fueron colocadas en una balanza para poder determinar su peso seco.
- Después de hecho esto se preparó el percolador. Se cortó un pedazo de papel filtro en forma circular y se puso un pedazo de algodón en la punta del percolador. El papel filtro fue colocado dentro del percolador (hasta el fondo). Se agregó aproximadamente la tercera parte de la materia seca vegetal al percolador. Antes de agregar el disolvente se tapó la salida del percolador con un tapón plástico para impedir que salga el disolvente.
- Inmediatamente después se agregó diclorometano hasta cubrir las hojas secas.
- Después se fue agregando el resto de la materia seca y luego se volvió a agregar el diclorometano.
- Con un pedazo de cinta adhesiva (Maskin tape) se rotuló el percolador con el nombre científico de la planta, fecha y peso. Hecho esto se dejó reposar aproximadamente 24 horas.

- Al día siguiente se retiró el tapón plástico y se dejó gotear hasta que ya no saliera más disolvente.
- El disolvente recuperado en la primera extracción fue agregado nuevamente al percolador. Este proceso se repitió cinco veces.
- El extracto obtenido fue colocado en el balón aforado del rotavapor. Antes de iniciar con el proceso de concentrar en rotavapor se engrasaron todas las bocas esmeriladas del rotavapor.
- Ya engrasadas se insertó el balón aforado, con el extracto dentro, al rotavapor.
- Terminada la destilación o concentración del extracto se procedió a concentrarlo aún más metiendo el extracto en una secadora por 14 días.
- Después de esos días, el extracto sólido se metió en un vial de vidrio con su respectiva identificación. Por último, se calculó el porcentaje de rendimiento del extracto.
- Lo mismo se hizo para la extracción con metanol.

3.4.2.3. Resultados: Se obtuvieron los extractos diclorometano y metanólico con un porcentaje de rendimiento de 2.60% y 13.75% respectivamente. Esta actividad tuvo una duración de 30 horas.

3.4.2.4. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

3.4.3. Preparación del agar-planta para determinar tanto la actividad antibacteriana como la actividad antilevadura.

3.4.3.1. Objetivo:

- Preparar los medios de cultivo para realizar los bioensayos con bacterias y levaduras.

3.4.3.2. Descripción, método o procedimiento

- El primer día se prepararon cuatro tubos de ensayo a los cuales se les agregó 9.5 ml de agar Mueller-Hinton. Después los tubos fueron llevados a una autoclave donde fueron esterilizados. Los tubos con agar ya esterilizados se les agregó 0.5 ml de la solución del extracto disuelto. Hecho esto se agregó las soluciones en cinco cajas de petri, las cuales se dejaron solidificar e incubaron a 36°C por 24 horas.

3.4.3.3. Resultados: Se prepararon cinco cajas de petri con el agar-planta. Dos cajas son para las pruebas con el extracto diclorometano, las otras dos para el extracto metanol y el quinto para el control. Esta actividad tuvo una duración de 5 horas.

3.4.3.4. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

3.4.4. Preparación del inóculo bacteriano y levadura.

3.4.4.1. Objetivo:

- Preparar los inóculos de las bacterias y levaduras que se van a utilizar para hacer los bioensayos.

3.4.4.2. Descripción, método o procedimiento

- En el caso de las bacterias se purificó el microorganismo inoculando a cada bacteria en tubos con agar Mueller-Hinton inclinado. Se dejó incubar por 24 horas. Pasadas las 24 horas se inoculó una asada del cultivo bacteriano en tubos con caldo Tripticasa soya y se dejó incubar por 48 horas. Después de las 48 horas se diluyó 0.05 ml de cada suspensión bacteriana en 4.95 ml de agua destilada estéril.
- En el caso de las levaduras se sembró la cepa en una caja con agar Sabouraud y se dejó incubar por 48 horas. Después de las 48 horas se tomó un inóculo del cultivo fresco y se sembró en tubos de ensayo con caldo Tripticasa soya. Por último, se diluyó la suspensión con levadura a una dilución 1:10.

3.4.4.3. Resultados: Se prepararon los inóculos de las 7 bacterias y 1 levadura sobre las cuales se iba a hacer el bioensayo. Esta actividad tuvo una duración de 15 horas.

3.4.4.4. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

3.4.5. Demostración de la actividad antibacteriana y antilevadura.

3.4.5.1. Objetivo:

- Comprobar si cualquiera de los dos extractos (diclorometano o metanol) tienen actividad antimicrobiana.

3.4.5.2. Descripción, método o procedimiento

- Como se dijo anteriormente, se utilizaron dos cajas con agar-planta para los diferentes extractos. A una caja de petri se le pegó abajo la plantilla A (ver figura 1) y a la otra caja la plantilla B (ver figura 1). Se inocularon en las cajas con agar-planta una asada de cada uno de los microorganismos (bacterias y levaduras preparadas anteriormente) siguiendo el patrón de la plantilla. Se hicieron cuatro repeticiones por microorganismo (ver figura 2). Antes de incubar se dejaron reposar las cajas inoculadas por 10 minutos y luego se incubaron durante 24 horas.
- Para el control negativo se colocó la plantilla A (o la B, no importa) sobre la quinta caja de petri. Luego se hicieron dos repeticiones de cada microorganismo en la caja con el agar-planta.
- Después de las 24 horas se llevó a cabo la interpretación de los resultados. Para hacer la interpretación se volvieron a colocar las plantillas sobre las cajas de petri y se observó cuales fueron las bacterias que no crecieron y se compararon con el control negativo. Si hubo crecimiento la actividad fue negativa y si no hubo crecimiento la actividad fue positiva.

3.4.5.3. Resultados: Se pudo determinar que solo el extracto metanólico tuvo actividad en contra de *Cryptococcus neoformans*. Esta actividad tuvo una duración de 22 horas.

3.4.5.4. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

3.4.6. Preparación del agua de mar y cultivo de huevos de *Artemia salina* en la solución de agua de mar.

3.4.6.1. Objetivo:

- Preparar el agua de mar para que eclosionen los nauplios de *Artemia salina*.
- Cultivar los huevos del crustáceo en el agua de mar.

3.4.6.2. Descripción, método o procedimiento

- En un balón aforado de fondo plano se agregó 0.5 L de agua destilada.
- Luego se pesaron 17.5 g de sal de mar e inmediatamente después se agregó a los 0.5 L de agua destilada.
- Hecho lo anterior se hizo una marca en el balón para indicar el volumen de agua.
- La solución salina se hirvió por 30 minutos. El volumen perdido por evaporación se completó agregando más agua destilada hasta la marca que se hizo.
- Cuando se enfrió el agua de mar se colocó en un vaso de precipitar y se aireó por 30 minutos con un tubo de aire.
- Mientras se aireaba el agua de mar se pesaron 40 mg de huevecillos.
- Por último, se colocaron los huevecillos en el área cerrada de la pecera (ver figura 3) y se dejó incubar por 48 horas a temperatura ambiente y con luz artificial.

3.4.6.3. Resultados: Preparé el agua de mar e incubé gran cantidad de nauplios en la pecera. Esta actividad tuvo una duración de 5 horas.

3.4.6.4. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

3.4.7. Demostración de la actividad citotóxica de los dos extractos obtenidos de *Buddleja americana*.

3.4.7.1. Objetivos: Determinar la citotoxicidad de los dos extractos de *Buddleja americana* utilizando nauplios de *Artemia salina*.

3.4.7.2. Descripción, método o procedimiento:

- Se prepararon las soluciones de los dos extractos, utilizando agua de mar para disolver los extractos. Para la primera parte se preparó la solución de cada extracto a una concentración de 0.5 mg/ml.
- Hechas las soluciones se agregó por triplicado en una microplaca 100 µl del agua de mar entre 10-15 nauplios. Después se agregaron 100 µl del extracto disuelto.
- El control negativo se preparó igual con la excepción de que no se agregó el extracto disuelto.
- Hecho esto se incubaron los nauplios a temperatura ambiente y con luz artificial por 24 horas.
- Al día siguiente se procedió a contar la cantidad de nauplios muertos en cada pozo de la microplaca utilizando para ello un estereoscopio. Por ejemplo, si en la prueba con el extracto de diclorometano hubo 25 camarones muertos en los tres pozos y el total que se agregaron fue de 30, el primer valor se divide dentro del segundo y luego se multiplica por 100.
- Dado que en los dos extractos el porcentaje de camarones muertos fue mayor del 50 %, se tuvo que realizar el experimento a concentraciones de 0.250 mg/ml y 0.125 mg/ml. Esto se hizo para poder obtener la Dosis Letal al 50% (DL₅₀).

- El procedimiento fue igual solo que se prepararon las soluciones de los extractos a las concentraciones anteriormente mencionadas.
- Después de hecho esto se volvieron a contar los nauplios muertos en cada pozo, de cada tratamiento o concentración de los diferentes extractos.
- Los datos obtenidos de lo anterior se utilizaron para obtener la DL_{50} . La Dosis letal al 50% fue obtenida utilizando el programa para computadora Finney.

3.4.7.3. Resultados: Los dos extractos presentaron efectos citotóxicos a 0.5 mg/ml ya que más del 50% de los nauplios murieron. Dado que el porcentaje de nauplios muertos fue grande se tuvo que realizar la prueba para obtener la DL_{50} . El programa Finney reveló que la DL_{50} para el extracto con diclorometano fue de 0.146 mg/ml y para el extracto con metanol fue de 0.088 mg/ml. Esta actividad tuvo una duración de 30 horas.

3.4.7.4. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

3.4.8. Demostración de la actividad larvicida de los dos extractos de *Buddleja americana*.

3.4.8.1. Objetivos: Determinar el grado de citotoxicidad de los dos extractos.

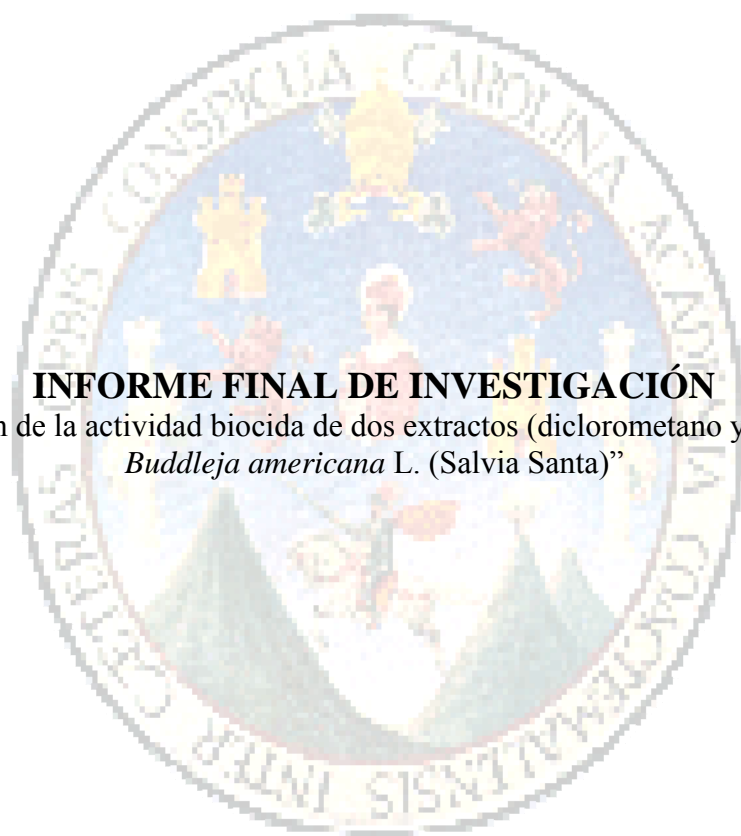
3.4.8.2. Descripción, método o procedimiento:

- Se preparó una solución de cada extracto a una concentración de 0.5 mg/ml, disolviendo el extracto en agua reposada. Al igual que en la prueba de determinación de la citotoxicidad con *Artemia salina*, se agregó por triplicado 100 μ l del agua reposada con 10-15 larvas de mosquito (*Anopheles albimanus*) a una microplaca por cada extracto. Después se agregó 100 μ l del extracto disuelto a cada pozo de la microplaca que contenía las larvas.
- Para el control negativo se agregó por triplicado 100 μ l de agua de chorro reposada con 10-15 larvas de mosquitos. Se incubó a temperatura ambiente en un lugar oscuro por 24 horas.
- Al día siguiente se contó el número de larvas muertas y así obtener el porcentaje de larvas muertas.
- En este experimento se trabajó con los cuatro estadios del mosquito *Anopheles albimanus*.
- Como en ninguno de los casos el porcentaje de larvas muertas no llegó al 100% no se realizó la prueba para determinar la Concentración letal al 100%.

3.4.8.3. Resultados: Los extractos de *Buddleja americana* no presentaron actividad larvicida contra los cuatro estadios del mosquito *Anopheles albimanus*. Esta actividad tuvo una duración de 35 horas.

3.4.8.4. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
PROGRAMA DE EXPERIENCIAS DOCENTES CON LA COMUNIDAD
SUBPROGRAMA DE EDC-BIOLOGÍA



INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN

“Determinación de la actividad biocida de dos extractos (diclorometano y metanólico) de
Buddleja americana L. (Salvia Santa)”

LUIS EDUARDO ALVAREZ HERNÁNDEZ
LICDA. EUNICE ENRÍQUEZ

LIC. ARMANDO CÁCERES
Vo. Bo. ASESOR INSTITUCIONAL



Determinación de la actividad biocida de dos extractos (diclorometano y metanólico) de *Buddleja americana* L. (Salvia Santa).

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Referente teórico	2
4. Planteamiento del problema	5
5. Justificación	6
6. Objetivos	6
7. Hipótesis	6
8. Metodología	7
9. Resultados	13
10. Discusión de resultados	16
11. Conclusiones	17
12. Recomendaciones	17
13. Referencias bibliográficas	17
14. Anexos	19

1. RESUMEN

Estudios etnobotánicos en varios países del mundo han demostrado que a muchas plantas del género *Buddleja* se les atribuyen usos de tipo medicinales (Houghton, 1984). En otros países también se han realizado estudios científicos acerca de las propiedades farmacológicas de algunas especies de este género (Mensah, 2001). En Guatemala no se han realizado investigaciones científicas sobre las propiedades farmacológicas (y biocidas) de las especies de *Buddleja*.

Por lo anteriormente dicho es necesario hacer pruebas experimentales que comprueben científicamente, en el caso de esta investigación, si *B. americana* tiene algunas propiedades biocidas. Para comprobar esto se realizaron dos extracciones diferentes: una con diclorometano y otra con metanol utilizando la técnica de extracción por percolación. Cada extracto fue utilizado para realizar bioensayos con bacterias, levaduras, *Artemia salina* y los cuatro estadios larvales del mosquito *Anopheles albimanus*. *A. salina* se utilizó para poder determinar la citotoxicidad de los extractos.

Los extractos con diclorometano y metanol obtenidos dieron un porcentaje de rendimiento de 2.60% y 13.75% respectivamente. Los bioensayos para determinar la actividad antimicrobiana de los dos extractos obtenidos de *B. americana* fueron determinados por medio de la inhibición del crecimiento de los diferentes microorganismos al inocularlos en agar-planta¹⁰. El bioensayo demostró que tanto el extracto con diclorometano como el extracto con metanol no tienen actividad bactericida y antilevadura. La prueba para determinar la citotoxicidad con *A. salina* demostró que la DL₅₀ del extracto con diclorometano es de 0.146 mg/ml con un intervalo de confianza de 0.106 – 0.180 y la DL₅₀ del extracto con metanol es de 0.088 mg/ml con un intervalo de confianza de 0.028 – 0.121. Ninguno de los extractos tuvo actividad larvicida en ninguna de las fases larvianas del mosquito *A. albimanus*. Los extractos de *B. americana* no dieron resultados positivos en los diferentes ensayos; pero se recomienda realizar más estudios farmacológicos en esta planta (antitucígeno, antiespasmódico, diurético, etc.) con las plantas de este género.

2. INTRODUCCIÓN

Los químicos sintéticos e inorgánicos utilizados como medicina, antisépticos, antifúngicos, insecticidas, en la fumigación de cultivos, etc. causan efectos secundarios indeseables. Además, los productos sintéticos producen desechos extremadamente tóxicos para el medio ambiente. Desde el siglo anterior se han estado buscando alternativas para descubrir compuestos orgánicos que posean las mismas propiedades de los sintéticos. Los científicos han descubierto que las plantas y algunos animales sintetizan químicos orgánicos que pueden ser utilizados en la medicina, agricultura y en otros procesos.

Las plantas son una fuente importante de compuestos orgánicos, tienen propiedades medicinales potentes y otras propiedades que pueden ser utilizadas por la industria y las cuales producen menos efectos secundarios y no ocasionan daños al medio ambiente por ser biodegradables.

B. americana L. es una planta que pertenece a la familia Buddlejaceae, anteriormente ubicada dentro de la familia Loganiaceae³. Las especies de la familia Buddlejaceae tienen hojas opuestas, serradas o a veces enteras. Las ramas jóvenes son muy tomentosas y las adultas son menos tomentosas. Inflorescencias terminales, paniculadas y tomentosas. Flores muy pequeñas, en forma de embudo o tubo y tomentosas. Estambres insertos a la corola y ovario súpero. Existen aproximadamente 100 especies en todo el mundo. En Guatemala existen alrededor de 7 especies.

Existen muchos datos etnofarmacológicos de una gran variedad de especies del género *Buddleja*; aunque no se han hecho muchos estudios científicos que comprueben esta información. Con esta investigación se pretende determinar si la especie *B. americana* tiene propiedades biocidas, utilizando para ello dos tipos de extracciones. Con las extracciones hechas se determinará sus propiedades biocidas realizando para ello varios bioensayos. Los bioensayos se realizarán en microorganismos patógenos de importancia en la medicina (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Mycobacterium smegmatis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Escherichia coli*), en el insecto vector transmisor de la malaria (*A. albimanus*) y en el crustáceo *A. salina*, que se utilizará para determinar la citotoxicidad de los extractos.

3. REFERENTE TEÓRICO

Características generales

Clasificación taxonómica

Clase Magnoliopsida

Subclase Asteriidae

Orden Scrophulariales

Familia Buddlejaceae

Género *Buddleja*

Nombre científico *B. americana*

Descripción botánica.

Arbustos o pequeños árboles de 2 a 5 m de alto (raramente 10 m). Las ramas jóvenes son tomentosas. Hojas subsésiles o con peciolos de 2 cm de largo; hojas membranosas, serradas o enteras; la superficie superior glabra o pubescente estrellada; la superficie inferior con un tomento estrellado suelto compuesto por tricomas glandulares; estrechamente lanceolada, elíptica, ovado lanceolada u ovada. Hojas entre 10 a 15 cm de longitud (4 a 26 cm); usualmente de 5 a 8 cm de ancho (2 a 13 cm), acuminadas, base frecuentemente decurrente pero puede ser atenuada, aguda u obtusa. Inflorescencias de 8 a 12 cm de largo, el grupo de flores bajas usualmente corto pecioladas, el resto son sésiles. Flores fragantes; cáliz de 1.5 a 2 mm de largo, tubular con lóbulos lanceolados y acuminados, tomentoso estrellado afuera. Corola de 4 a 5 mm de longitud, en forma de embudo, amarillo dentro, blanco afuera; tomentoso estrellado afuera. La superficie interna de los lóbulos con una línea de pelos en forma creciente o en penachos de pelos. Los estambres están insertos en cavidades o justamente por debajo; ovario ovoide, de 1 a 1.5 mm de longitud, tomentoso en la parte media, estilo corto, estigma clavado eclipsadamente bilocado; cápsula madura cortamente cilíndrica a ovoide, de 3.5 a 5 mm de largo, septicidamente dehiscente en la mitad de su longitud, loculicidamente usualmente solo en el ápice; semillas numerosas, oblongas, de 0.8 a 1 mm de largo, testa reticulada, prolongándose en cortas alas.

Distribución Geográfica.

Usualmente en malezas húmedas o secas, algunas veces en terrenos baldíos o en bosques de encino (80 a 2,100 msnm); Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Izabal, Jalapa, Jutiapa, Petén, Quiché, Sacatepéquez, San Marcos, Santa Rosa, Zacapa. *B. americana* se distribuye desde el sur de México hasta Bolivia en Suramérica. También se distribuye en las Indias occidentales.

Sinónimos.

B. occidentalis L. *B. spicata* R. & P. *B. callicarpoides* HBK. *B. dentata* HBK. *B. floribunda* HBK. *B. verbascifolia* HBK. *B. cana* Willd ex J. A. & J. H. Schultes. *B. rufescens* Willd. *B. americana* albiflora Gómez. *B. americana* var. *Rothschulii* Loes.

Nombres comunes.

Árnica (Huehuetenango); Sactzam (Alta Verapaz); Salvia (Jutiapa y Sacatepéquez); Salvia santa (Guatemala e Izabal).

Estudios sobre las propiedades farmacológicas de las especies del género *Buddleja*.

Houghton (1984) hizo un estudio sobre la etnofarmacología de algunas especies de *Buddleja*. A continuación se presenta una tabla de los resultados obtenidos en esta investigación en los Anexos (Tabla 1):

Nombre científico	Distribución	Usos etnofarmacológicos
<i>B. asiatica</i> Lour.	Esta especie tiene un rango geográfico amplio, extendiéndose desde el norte de India y Nepal al sur de China y sur de Malasia, Indonesia y Papua Nueva Guinea.	Abortivo, enfermedades de la piel, dolores de cabeza, pérdida de peso, tratamiento contra pequeños tumores en la cabeza, malaria, actividad antifúngica <i>in Vitro</i> .
<i>B. officinalis</i> Maxim.	Provincias chinas de Yunnan, Szechuan, Shensi y Hupeh y en Malasia.	Hipertensión, diabetes, nefritis, cáncer, problemas de la piel, úlceras y abscesos, enfermedades del hígado, opacidad de la córnea, dolor en los ojos, cataratas, fotobia.
<i>B. curviflora</i> Hook. Et Arn.	Nativas del este de China y Japón.	Son similares a <i>B. officinalis</i> , ya que también se utilizan para el tratamiento del catarro y para la etapa crónica de la malaria.
<i>B. davidii</i> Franchet	Nativa de China y Japón, pero cultivada en muchas partes del mundo.	Curación de heridas, úlceras en la piel, curar lesiones asociadas con la lepra.
<i>B. madagascarensis</i> Lam.	Nativa de Madagascar, pero cultivada en muchas regiones tropicales y subtropicales.	Disentería, asma, tos, bronquitis, problemas bronquiales.
<i>B. americana</i> L.	Tiene un rango de distribución amplio. Desde México hasta Bolivia y en las Indias occidentales.	Colapso de la matriz, incrementa el flujo urinario y purifica el cuerpo, eupéptico, tumores, cura cortadas y úlceras, alivia el dolor en las articulaciones, trata quemaduras, antiséptica, efecto hipnótico, cirrosis, mejora la función biliar, indigestión, asma, dolencias uterinas, dolores de cabeza, propiedades sedantes.
<i>B. globosa</i> Lam.	Nativa de centro y sur de Chile y partes vecinas de Suramérica como Perú y Bolivia.	Tratar heridas, curar úlceras crónicas, disentería crónica, hemorroides, hepatitis, catarro, verrugas y antiséptico urogenital.
<i>B. incana</i> Ruiz et Pav.	Centro de los Andes desde Ecuador a Bolivia y Chile.	Tratamiento de heridas infectadas, yeso antirreumático, neuralgia, catarro, gonorrea y otras infecciones genitales, úlceras y verrugas.

Hay otras especies que se utilizan como: 1) remedio para la tos, como en el caso de *B. alviflora* Hemsley; 2) *B. salviifolia* Lam., es utilizada para tratar la tos y los cólicos; 3) *B. humboltiana* Roemer et Schultes se utiliza para tratar infecciones uterinas, reumatismo y para promover la diuresis; 4) *B. marrubifolia* Benth., se utiliza para tratar condiciones reumáticas; 5) *B. parviflora* Kunth, tiene actividad diurética; 6) *B. brasiliensis* Jacq., es utilizada como analgésico, antiartrítico, contra el catarro y propiedades antihemorroides; 7) *B. brachiata* Cham. et Schl., tiene aplicación como diurética y antiblenorrágica; 8) *B. quinquenaria* Cham. et Schl., se utiliza como un sedante; 9) *B. tucumanensis* Grises., es utilizada como astringente y estimulante.

Mensah (2001) realizó un estudio sobre los efectos de las hojas de *B. globosa* y sus componentes relevantes para el tratamiento de las heridas. El objetivo del estudio fue descubrir el o los componentes que tienen poder antioxidante (especialmente contra el H₂O₂) para acelerar el crecimiento de los fibroblastos; y por consiguiente una rápida cicatrización. Entre los componentes del extracto se encontraron tres flavonoides y dos derivados de ácidos caféicos, cada uno de los cuales contribuyó al efecto antioxidante a concentraciones por debajo de los 10 µg/ml.

A *B. americana* se la ha atribuido las siguientes propiedades etnomédicas: afecciones gastrointestinales (cólico, diarrea, disentería, dolor de estómago, gastritis e indigestión) y respiratorios (amigdalitis, asma, bronquitis y fiebre), cirrosis, edema, epilepsia, infecciones urinarias, reumatismo, leucorrea, cefalea, erisipela, sirve como soporífero para personas con insomnio y ayuda a detener la hemorragia nasal, hidropesía, etc.¹.

Estudios microbiológicos han demostrado que *B. americana* tiene propiedades bactericidas. Una investigación en NAPRALERT realizada para *B. americana* (2001) reportó que tiene propiedades bactericidas contra *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*.

Composición fitoquímica de algunas especies del género *Buddleja*.

B. asiatica Lour: De esta especie fueron aislados el glucósido iridoide aucubina, flavonoles, ácidos caféicos, ácidos ferúlicos, alcaloides, saponinas, taninos, sitosterol, estigmasterol y aceites esenciales con actividad fungicida (las hojas). En las flores también se aislaron los flavonoides linarina y quercitina³.

B. officinalis Maxim.: Un alcaloide amarillo (las flores) y glucósidos (las hojas)³.

B. curviflora Hook. et Arn.: En las hojas fueron encontrados el iridoide aucubina y el flavonol linarina; mientras que en la raíz se extrajeron los sesquiterpenos piscicida y buddledina A³.

B. davidii Franchet (*B. variabilis* Hemsl.): El glucósido flavonol (al cual se le llamó buddleoflavonolósido) fue obtenido de las hojas. La linarina y la aglicona acetin fueron extraídos de las flores. El glucósido iridoide aucubina también fue aislado de las hojas. De la raíz fueron extraídos cinco sesquiterpenos (buddledinas A, B, C, D y E) y del tallo coniferaldehídos y alcaloides³.

B. madagascarensis Lam.: De las hojas se extrajeron dos alcaloides, saponinas, n-alcanos, sitosterol, estigmasterol, beta amirina, acetato de beta amirina y el 11-ceto-beta-amirin³.

B. americana L.: Los alcaloides fueron extraídos principalmente de la raíz³. También se ha reportado la presencia de lignanos, sales minerales, cloruros de potasio, principios pécticos, ácido cinámico, aucubina y nigrosido 3 (iridoides monoterpénos), linarina (flavonoide), martionósido (glucósido de fenilpropanodioide) y aceite esencial.

B. globosa Lam.: De las hojas fueron extraídos los iridoides aucubina, caltalpol y metilcatalpol, flavonoides y saponinas, el triterpenoide beta amirina y su respectivo acetato, glutinol, el esteroil condilasterol, los metil ésteres de los ácidos ferúlico y p-coumárico. De las hojas y las flores se extrajeron la aglicona flavonol luteolina y el 6-hidroxluteolina. De las flores se aisló la linarina acacetina 7-O-rutinósido, la apigenina 7-O-glucósido, la quercetina 3-O-rutinósido (rutina), la escutelareína 7-O-glucósido y el lupeol³. Mensah (2001) reportó trisacáridos y disacáridos con feniletanoides y ácidos caféicos y flavonoides que pueden ser agliconas de glucósidos flavonoides.

B. incana Ruiz et Pav.: No hay ningún registro de estudios químicos realizados en esta especie³.

Principales compuestos químicos responsables de las propiedades medicinales del género *Buddleja*.

Los flavonoides, saponinas y aucubina son los principios activos para el tratamiento de las dolencias de la piel o limpieza de la piel. Los flavonoides están relacionados con las propiedades astringente y antiinflamatoria. La aglicona de aucubina es un potente antibiótico³.

Varios terpenos y saponinas son los responsables de aliviar los catarros y la tos, por su acción expectorante causada por la estimulación de la secreción en el tracto respiratorio³.

Los flavonoides y el iridoide aucubina promueven la actividad diurética³.

Se cree que la aglicona de aucubina es la responsable de la antisepsia de *Buddleja* sp. particularmente del tracto urogenital³.

Los alcaloides son los responsables de las propiedades sedantes y analgésicas de *Buddleja* sp.³.

Los lignanos son los responsables de la actividad antihepatotóxica (incrementando el fluido biliar o para el tratamiento de la cirrosis)³.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En 1984, Houghton hizo una recopilación de las propiedades etnofarmacológicas de unas 28 especies distribuidas alrededor del mundo. Como por ejemplo: Las hojas de *B. incana* Ruiz et Pav. son empleadas como un cataplasma antireumático. También se han realizado

algunos estudios farmacológicos en varias especies de buddleja (*B. globosa* Lam. es un potente cicatrizante por el poder antioxidante de ésta, acelerando así la proliferación de fibroblastos)⁵. En Guatemala no se han hecho estudios farmacológicos en las especies de *Buddleja* por lo que es necesario realizar investigaciones para poder demostrar científicamente que las buddlejas tienen las propiedades atribuidas en los estudios etnobotánicos y etnofarmacológicos.

5. JUSTIFICACIÓN

Las plantas son una fuente muy importante de compuestos químicos naturales con propiedades medicinales y biocidas. En los países donde crece *Buddleja* se han hecho estudios sobre las propiedades medicinales que dichas plantas poseen. La mayoría de las aproximadamente 100 especies tienen alguna de estas propiedades, las cuales son de importancia médica.

En Guatemala existen 7 especies de este género y no se han hecho estudios científicos de ellos. Estudios etnofarmacológicos hechos en otros países son una prueba de la gran variedad de propiedades de estas plantas. Incluso hay información científica que demuestra que *B. americana* tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento de *S. pneumoniae*⁶. Este estudio es de importancia porque si las pruebas o bioensayos son positivos contra alguno de los microorganismos en estudio, esta puede utilizarse para producir nuevos medicamentos eficaces contra varias enfermedades o bien combatir al vector transmisor de la malaria (*A. albimanus*). Esto beneficiaría a la población guatemalteca ya que los productos naturales medicinales no producen efectos secundarios y estos productos estarían al alcance de la población de escasos recursos.

Si las pruebas son positivas se sumaría la especie de *B. americana* en la lista de plantas para la producción de medicamentos y pesticidas naturales.

6. OBJETIVOS

General

- 1) Determinar si la especie *B. americana* tiene propiedades biocidas.

Específicos

- 1) Contribuir al conocimiento de la distribución de *B. americana*.
- 2) Demostrar si los extractos con diclorometano y metanol de *B. americana* tienen propiedades biocidas.

7. HIPÓTESIS

Los dos extractos de *B. americana* tienen alguna propiedad biocida.

8. METODOLOGÍA

Diseño.

- Población: *B. americana* de Guatemala.
- Muestra: *B. americana* colectada en cuatro departamentos de Guatemala, durante los meses de marzo a junio del 2,005.

Técnicas a usar en el proceso de investigación.

Recolección de datos

Colecta, herborización y determinación botánica.

Se viajarán a tres departamentos de Guatemala (Sacatepéquez, Chimaltenango y Huehuetenango). Las colectas se harán por conveniencia. Se colectará la necesaria para: la determinación botánica, para la colección de los herbarios BIGU y FARMAYA y para realizar las extracciones y bioensayos.

Obtención del extracto con diclorometano.

- Preparación de la materia seca vegetal (MSV).
 - Obtener la planta a estudiar debidamente identificada, secarla y molerla.
 - Rotular la planta molida con nombre, fecha y parte usada.
 - Pesar 100 g de las hojas de la planta.
- Llenado del percolador.
 - Colocar en la punta del percolador un pedazo de algodón no muy grande, de manera que sirva de filtro. Cortar un pedazo de papel filtro de forma circular y colocarlo cubriendo el fondo del percolador.
 - Tapar la punta del percolador con tapón plástico.
 - Agregar la tercera parte de la cantidad pesada de MSV y cubrir con etanol al 80%.
 - Chequear que no queden burbujas y si las hay, hacer presión con una espátula para destruirlas.
 - Agregar el resto de MSV y cubrirla nuevamente con etanol al 80%, si hay burbujas hacer presión con una espátula para destruirlas.
 - Rotular el percolador con nombre científico de la planta, fecha y peso. Dejar reposar por 12-24 horas para que reaccione (Figura 1).
 - Retirar el tapón plástico y dejar gotear hasta que salga todo el disolvente.
 - Concentrar según instructivo y el disolvente recuperado agregarlo a la materia en extracción en el percolador, repetir esta operación cinco veces antes de comenzar a concentrar en rotavapor.

- Concentración en Rotavapor.

- Encender el baño de María y llevar la temperatura a $40 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Engrasar todas las bocas esmeriladas y armar el rotavapor según instructivo específico (Figura 2).
- Succionar la solución obtenida del percolador (Alcohol + planta).
- Conectar la bomba de vacío y el rotador e iniciar la destilación del extracto con recuperación del disolvente hasta llevar a consistencia semisólida.
- Verter el extracto concentrado en una caja de petri de vidrio tarada y rotulada.
- Colocar en una desecadora durante 7-15 días.
- Cuando el extracto tenga consistencia sólida, pasar a viales tarados y rotulados.
- Calcular el rendimiento del extracto y guardar en viales o recipientes herméticos a 4°C .

Obtención del extracto metanólico

Después de realizada la extracción con diclorometano se deja secar la materia vegetal. Seca la materia vegetal se realiza el mismo procedimiento del inciso 2 con la diferencia de que en vez de etanol se agrega metanol.

8.2.1.4. Determinación de la actividad antimicrobiana *in Vitro*.

- Preparación de agar-Planta

- Preparar tubos con 9.5 ml de agar Mueller-Hinton
- Esterilizar, dejar enfriar a 50°C y agregar 0.50 ml de la solución del extracto disuelto. Este debe tener una concentración de 10 mg/ml. La concentración final que se obtiene es de 0.5 mg/ml.
- Agitar y verter en cajas de Petri estériles, dejar solidificar e incubar a 36°C por 24 horas, para comprobar esterilidad.
- Guardar en refrigeración hasta el momento de usar.

- Preparación del inóculo

- Purificar el microorganismo a ensayar inoculando en un tubo con 8 ml de agar Muller-Hinton inclinado, incubar a 36°C por 24 horas.
- Inocular una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5.0 ml de caldo Tripticasa soya, incubar a 36°C durante 48 horas.
- Diluir 0.05 ml de la suspensión anterior en 4.95 ml de agua destilada estéril (dilución 1:100) (Figura 3).
- Sembrar en caja de petri según la plantilla a utilizar.

- Demostración de la actividad antibacteriana

- Inocular en las cajas con agar-Planta una asada de cada uno de los microorganismos siguiendo el patrón de la plantilla (Figura 4 y 5). Hacer cuatro

repeticiones por microorganismo. Dejar reposar durante 5-10 minutos e incubar a 36°C durante 24 horas.

- Utilizar como control negativo 9.5 ml de agar Muller-Hinton mezclándole 0.5 ml de etanol al 50%.

- Interpretación de resultados

- Si hay crecimiento homogéneo a la largo del inóculo = Actividad negativa
- Si no hay crecimiento homogéneo a la largo del inóculo = Actividad positiva
- Presencia de microorganismos fuera de la inoculación = Contaminación

- Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

- Preparar cajas cuadrilate con las siguientes diluciones del extracto.

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

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

 - 0.125 mg/ml.

 - Un cuadrante con 4.0 ml de agar como control negativo.

- Inocular tres estrías en cada uno de los cuadrantes e incubar a 36° C por 24 horas.

- Realizar la lectura e interpretar según el paso 8.2.1.4.4.

8.2.1.5. Tamizaje antimicótico *in Vitro*.

- Preparación de medio de cultivo

- Preparar tubos con 9.5 ml de agar Muller-Hinton

- Esterilizar, dejar enfriar a 50° C y agregar 0.5 ml de extracto de la planta a probar (dilución 1:10). Agitar. La concentración final que se tiene es de 0.5 mg/ml.

- Verter en cajas de Petri estériles, dejar solidificar, e incubar a 36°C por 24 horas para demostrar esterilidad.

- Guardar en refrigeración hasta el momento de uso.

- Preparación del inóculo para hongos levaduriformes

- Sembrar la cepa en una caja con agar Sabouraud e incubar a 36° C por 48 horas.

- Tomar un inóculo del cultivo fresco, sembrar en 5 ml de caldo Trypticasa soya e incubar 24-48 horas. Tomar con una pipeta estéril 0.5 ml y suspender en 4.5 ml de solución salina estéril (dilución 1:10).

- Inoculación de levaduras en placa

- Preparar cajas con agar-Planta

- Inocular con asa la suspensión de levaduras en cada sección según plantilla.

- Incubar a 36° C durante 48 horas

- Para el control negativo, sembrar por estrías la levadura en una caja con agar Sabouraud.

- Lectura e interpretación de los resultados

- Observar el crecimiento de la levadura en el medio:
Crecimiento + = No actividad
Crecimiento - = Inhibición o actividad antilevadura
- Para evaluar la concentración inhibitoria mínima (CIM), repetir la prueba con cantidades decrecientes del extracto vegetal (1:10, 1:50 y 1:100).

8.2.1.6. Citotoxicidad con *Artemia salina*

- Preparación del agua de mar

- Disolver 17.5 g de la sal de mar en 0.5 L de agua destilada
- Hacer una marca en el vaso de precipitar para indicar el volumen de agua.
- Hervir por 30 minutos y completar el volumen que se evaporó según la marca.
- Filtrar y refrigerar hasta el momento de usar, es estable por un mes a temperatura de 6-8°C.

- Cultivo de *Artemia salina*

- Colocar en un vaso de precipitar 200 ml del agua de mar y airear por 30 minutos.
- Colocar el agua en la pecera y agregar 40 mg de jebecillos en el área cerrada (lado oscuro).
- Incubar por 48 horas a temperatura ambiente y con luz artificial. Al eclosionar, los nauplios (larvas) pasan al área abierta de la pecera (lado con luz).

- Determinación de la Citotoxicidad.

- Se prepararon las soluciones de los extractos con agua de mar con una concentración de 0.5 mg/ml. Agregar por triplicado en una microplaca: 100 µl del extracto disuelto + 100 µl de agua de mar con 10-15 nauplios.
Control negativo: 100 µl de agua de mar con 10-15 nauplios.
- Incubar a temperatura ambiente con luz artificial por 24 horas.
- Contar en el estereoscopio o microscopio el número de nauplios muertos. Agregar metanol a los pozos, esperar 15 minutos y contar de nuevo todos los nauplios. Si se observan nauplios muertos en el control negativo la prueba no es válida y hay que repetirla de nuevo.
- Interpretación: Calcular el % de camarones muertos:
Sumar el número de camarones muertos en los tres pozos (X)
Sumar el número total de camarones en los tres pozos (Y)
Dividir X dentro de Y y multiplicarlo por 100.

Si el % de camarones muertos es mayor del 50%, repetir la prueba utilizando dosis de 0.5, 0.250 y 0.125 mg/ml. Obtener los valores de X y Y en cada dosis y determinar el valor de DL_{50} con el programa de computadora Finney (DOS).

Si el % es menor del 50% la citotoxicidad es mayor de 1 mg/ml.

8.2.1.7. Tamizaje de la actividad larvicida.

- Determinación de la Citotoxicidad

- Preparar soluciones con concentraciones de 0.50 mg/ml de cada uno de los extractos a analizar, utilizando para ello agua de chorro reposada. En la microplaca agregar por triplicado: 100 µl del extracto disuelto + 100 µl de agua de chorro reposada con 10-15 larvas.

Control negativo: 100 µl de agua del chorro reposada con 10-15 larvas.

- Incubar a temperatura ambiente (25-28°C) en un lugar obscuro durante 24 horas.

- Contar en el estereoscopio o microscopio el número de larvas muertas y determinar la CL_{100} (concentración letal al 100%).

- Interpretación: La prueba de tamizaje es positiva si todas las larvas están muertas. Si el % de larvas muertas es 100%, calcular la CL_{100} , para ello repetir la prueba utilizando dosis de 0.5, 0.15 y 0.124 mg/ml.

8.2.2. Análisis de datos.

Para representar los resultados de las extracciones, actividad antimicrobiana, citotoxicidad con Artemia salina y actividad larvicida únicamente se elaborarán tablas.

Instrumentos para registro y medición de las observaciones.

Materiales

8.3.1. Colecta de las plantas

- una prensa
- papel periódico
- tijeras de podar
- libreta de campo y lápiz
- etiquetas para identificación de campo
- alcohol y bolsas plásticas

8.3.2. Determinación botánica

- secadora, estereoscopio, pinzas y claves taxonómicas

8.3.3. Análisis químico

- rotavapor
- bomba de vacío
- percolador
- vasos de precipitar

erlenmeyer
desecadora
viales
disolventes: metanol y diclorometano

8.3.4. Bioensayos

agar Muller-Hinton
autoclave
cajas de petri simples
campana bacteriológica
campana bacteriológica con flujo laminar
etanol al 50%
incubadora a 36° C
plantilla para siembra
refrigeradora
agar Sabouraud
medio Takashio
agua destilada
agua de mar
una pecera
microplacas
un estereoscopio

9. RESULTADOS

Obtención del extracto con diclorometano y metanol

En la tabla No. 1 se observan los porcentajes de rendimiento de cada uno de los extractos obtenidos.

Tabla 1
Porcentaje de rendimiento de los extractos.

Extracto	% de Rendimiento
Diclorometano	2.60
Metanol	13.75

Determinación de la actividad antibacteriana y antilevadura *in Vitro*.

Se determinó la actividad de cada uno de los extractos (diclorometano y metanol) obtenidos, contra las bacterias gram (+) *B. subtilis* y *S. aureus*, gram (-) *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. typhi*, hongos levaduriformes *C. albicans* y *C. neoformans* y *M. smegmatis*. La concentración de los extractos fue de 0.5 mg/ml.

Tabla 2
Resultados de la actividad antibacteriana y antilevadura

Extracto	A	B	C	D	E	F	G	H
Diclorometano	--	--	--	--	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--
Metanol	--	--	--	--	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--

* El símbolo + indica que la prueba es positiva, es decir que no hubo crecimiento microbiano. El signo - indica que si hubo crecimiento microbiano.

- A. *Staphylococcus aureus*
- B. *Salmonella typhi*
- C. *Mycobacterium smegmatis*
- D. *Bacillus subtilis*
- E. *Pseudomona aeruginosa*
- F. *Candida albicans*
- G. *Cryptococcus neoformans*
- H. *Escherichia coli*

Se puede observar que los dos extractos de *Buddleja americana* (diclorometano y metanol) utilizados en la prueba antimicrobiana no presentaron actividad con ninguno de los microorganismos en estudio.

Citotoxicidad con *Artemia salina*.

En la tabla 3 se muestran los resultados para determinar si los extractos presentan actividad citotóxica menor a 0.5 mg/ml. En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos del bioensayo para poder determinar la dosis letal media (DL₅₀).

Tabla 3
Prueba de los extractos a una concentración de 0.5 mg/ml

Extracto a 0.5 mg/ml	# de nauplios al inicio			# de nauplios muertos		
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 1	Placa 2	Placa 3
Diclorometano	10	10	10	10	10	10
Metanol	10	10	12	10	10	5

% de nauplios muertos:

Diclorometano = $30/30 * 100 = 100 \%$

Metanol = $25/30 * 100 = 83.33 \%$

Se observó que los dos extractos presentan actividad citotóxica menor a 0.5 mg/ml; ya que los dos extractos mataron al 50% de los nauplios.

Tabla 4
Determinación de la DL₅₀ de cada uno de los extractos

Extracto	Conc. mg/ml	# de nauplios al inicio			# de nauplios muertos			DL ₅₀ mg/ml	Intervalo de confianza	
		Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 1	Placa 2	Placa 3		Inferior	Superior
Diclorometano	0.250	10	12	11	2	4	5	0.146	0.106	0.180
	0.125	13	11	15	0	6	10			
Metanol	0.250	10	10	10	0	0	2	0.088	0.028	0.121
	0.125	11	10	10	2	0	7			

Tamizaje de la actividad larvicida (los cuatro estadíos larvales de *A. albimanus*).

Esta prueba se realizó con los dos extractos obtenidos contra los cuatro estadíos larvales del mosquito *A. albimanus* de 24 horas de vida, mediante un ensayo en placa y por triplicado. Se estableció que la actividad positiva era considerada si el extracto en estudio provocaba la muerte del 100% de las larvas presentes en los pozos de la placa.

Tabla 5
Larvas de Primer estadio

Extracto a 0.5 mg/ml	# larvas al inicio			# de larvas muertas		
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 1	Placa 2	Placa 3
Diclorometano	10	11	10	1	2	1
Metanol	10	10	10	0	0	1

Porcentaje de larvas muertas:

$$\text{Diclorometano} = 4/31 * 100 = 12.90 \%$$

$$\text{Metanol} = 1/30 * 100 = 3.33 \%$$

Tabla 6
Larvas de Segundo estadio

Extracto a 0.5 mg/ml	# larvas al inicio			# de larvas muertas		
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 1	Placa 2	Placa 3
Diclorometano	12	10	14	0	0	0
Metanol	10	11	12	1	0	0

Porcentaje de larvas muertas:

$$\text{Diclorometano} = 0/36 * 100 = 0.0 \%$$

$$\text{Metanol} = 1/33 * 100 = 3.03 \%$$

Tabla 7
Larvas de Tercer estadio

Extracto a 0.5 mg/ml	# larvas al inicio			# de larvas muertas		
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 1	Placa 2	Placa 3
Diclorometano	10	10	10	0	2	3
Metanol	15	10	10	1	5	1

Porcentaje de larvas muertas:

$$\text{Diclorometano} = 5/30 * 100 = 16.67 \%$$

$$\text{Metanol} = 7/35 * 100 = 20.0 \%$$

Tabla 8
Larvas de Cuarto estadio

Extracto a 0.5 mg/ml	# larvas al inicio			# de larvas muertas		
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 1	Placa 2	Placa 3
Diclorometano	10	10	10	3	2	2
Metanol	10	13	11	2	1	0

Porcentaje de larvas muertas:

$$\text{Diclorometano} = 7/30 * 100 = 23.33 \%$$

$$\text{Metanol} = 3/34 * 100 = 8.82 \%$$

Se estableció que la concentración letal (CL_{100}) es mayor de 0.5 mg/ml para los cuatro estadios de las larvas del mosquito *Anopheles albimanus*.

10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los extractos, con diclorometano y metanol obtenidos con la técnica de extracción por percolación, presentaron un rendimiento de 2.60% y 13.75% respectivamente. El bajo rendimiento con diclorometano se puede deber a que hay cantidades muy bajas de compuestos apolares (alcaloides, estigmasteroles, etc.).

El ensayo antibacteriano y antilevadura determinó que los dos extractos no presentan actividad contra todos los microorganismos en estudio a una concentración de 0.5 mg/ml. Pueden haber dos razones para explicar este comportamiento: 1) Los compuestos fitoquímicos (por ejemplo, la aglicona de aucubina), encontrados en algunas plantas del género *Buddleja*, que han demostrado tener propiedades antibióticas no hayan sido extraídas con los solventes utilizados o 2) En las hojas de *B. americana* no se encuentran estos compuestos fitoquímicos antibióticos o se encuentran en concentraciones muy bajas.

En la determinación de la actividad larvicida se estableció que ninguno de los dos extractos obtenidos presentó actividad contra ninguno de los estadios larvales del mosquito *A. albimanus*. Esto quiere decir que ninguno de los compuestos químicos extraídos de la planta, utilizando al diclorometano y metanol como solventes, son tóxicos para los cuatro estadios larvales del mosquito.

Con el tamizaje de la actividad contra *A. salina* se determinó que los dos extractos presentaron letalidad mayor del 50% a una concentración de 0.5 mg/ml. Dado esto se determinó la DL_{50} , dando una DL_{50} de 0.146 mg/ml para el extracto con diclorometano y 0.088 mg/ml para el extracto con metanol.

11. CONCLUSIONES

- Los extractos con diclorometano y metanol de *B. americana* no presentaron actividad contra las bacterias y levaduras utilizadas a una concentración de 0.5 mg/ml.
- El extracto con diclorometano presentó una DL_{50} de 0.146 mg/ml mayor que la observada para el extracto con metanol el cual fue de 0.088 mg/ml.
- Los extractos con diclorometano y metanol no presentaron actividad contra los cuatro estadios larvales del mosquito *A. albimanus*.

12. RECOMENDACIONES

- Realizar bioensayos contra otros vectores transmisores de enfermedades, como *Triatoma dimidiata*, quién es transmisor de la enfermedad de Chagas.
- Hacer estos bioensayos con las otras especies guatemaltecas de Buddleja.
- Realizar estudios para poder determinar si las especies guatemaltecas de buddleja tienen acciones farmacológicas.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Arana, S. 2002. “Determinación de la actividad larvicida de 18 especies de plantas detectadas por etnobotánica y bioprospección en Guatemala”. Informe de Tesis, Químico Farmacéutico.
- 2) Base de datos Napralert.
- 3) Barrios, R. 2001. “Fraccionamiento bioguiado y tamizaje fotoquímico del extracto etanólico con actividad antibacteriana de *Vaccinium poasanum* Donn. Sm.” Informe de Tesis, Químico Farmacéutico.
- 4) Cáceres, A. 1996. Plantas de uso medicinal en Guatemala
- 5) Cruz, S. 2001. “Fraccionamiento bioguiado y Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico con actividad antiartemia de *Ocimum micranthum* Willd. (Albahaca de Monte)”. Informe de Tesis, Químico Farmecéutico.
- 6) Houghton, P. J. 1984. Ethnopharmacology of some Buddleja species. Journal of Ethnopharmacology, 11: 293 – 308.
- 7) Jiménez, M. 2005. “Determinación de la actividad biocida de 5 plantas del género *Acalypha* (*A. guatemalensis*, *A. arvensis*, *A. polystaquia*, *A. indica* y *A. pseudoalopecuroides*)”. Informe de Tesis, Químico Farmacéutico.
- 8) Mensah, A. Y. et al. Effects of Buddleja globosa leaf and its constituents relevant to wound healing. Journal of Ethnopharmacology 77 (2001) 219 – 226.
- 9) PEO – Manual de Procedimientos del Proyecto Biodiversidad OEA, páginas 2 a la 3. Técnicas de extracción por percolación.
- 10) PEO – Manual de Procedimientos del Proyecto Biodiversidad OEA, páginas 4 a la 5. Actividad antimicrobiana in Vitro.
- 11) PEO – Manual de Procedimientos del Proyecto Biodiversidad OEA, páginas 6 a la 8. Tamizaje antimicótico in Vitro.
- 12) PEO – Manual de Procedimientos del Proyecto Biodiversidad OEA, páginas 14 a la 15) Citotoxicidad con Artemia salina.

- 13) PEO – Manual de Procedimientos del Proyecto Biodiversidad OEA, página 16. Tamizaje de la actividad larvicida.
- 14) Standley, P. C. y Steyemark, J. A. 1946. Flora de Guatemala. Volumen 24, Parte VIII, 278-284 pp.
- 15) Vargas, J. 2000. Técnicas de Herbario. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

13. ANEXOS



Figuras 1. Percolador.



Figura 2. Rotavapor.



Figura 3. Inóculos bacterianos y de levaduras.



Figura 4. Plantillas



Figura 5. Bacterias en agar-planta

Luis Eduardo Alvarez Hernández
guichoguayo2@yahoo.com

RESUMEN DE INVESTIGACIÓN

Determinación de la actividad biocida de dos extractos (diclorometano y metanólico) de *Buddleja americana* L. (Salvia Santa) 2006.

En Guatemala no se han estudiadas las propiedades farmacológicas y biocidas del género *Buddleja*. Si las pruebas son positivas se sumaría la especie de *B. americana* en la lista de plantas para la producción de medicamentos y pesticidas naturales.

Esta investigación tiene como objetivos: 1) Determinar si la especie *Buddleja americana* tiene propiedades biocidas, 2) contribuir al conocimiento de la distribución de *B. americana* y 3) demostrar si los extractos con diclorometano y metanol de *B. americana* tienen propiedades biocidas.

Para poder alcanzar los objetivos planteados se utilizará la siguiente metodología: Las extracciones fueron obtenidas por la técnica de extracción por percolación y se concentró el extracto obtenido utilizando un rotavapor. La actividad antimicrobiana fue determinada por medio de la inhibición del crecimiento de los diferentes microorganismos al inocularlos en agar-planta. Para la prueba de la determinación de la citotoxicidad fue utilizado un método diseñado por Solís y colaboradores. Para el tamizaje larvicida se colocaron de 10-15 larvas en microplacas por triplicado, agregando la solución del extracto a estudiar a una concentración de 0.5 mg/ml. Si se moría el 100% de las larvas se procedería a utilizar dosis más bajas (0.250 y 0.125 mg/ml) para poder determinar la CL_{100} .

Los resultados fueron los siguientes: Los porcentajes de rendimiento para cada extracción fueron de 2.60% (diclorometano) y 13.75% (metanol). Los dos extractos no presentaron actividad bactericida y antilevadura. La DL_{50} de los extractos fueron 0.146 mg/ml (diclorometano) y 0.088 mg/ml (metanol). Ninguno de los extractos tuvo actividad larvicida en contra de las cuatro fases larvarias del mosquito *Anopheles albimanus*.

Con los resultados obtenidos concluimos que los dos extractos no presentaron actividad contra las bacterias y levaduras utilizadas en estos ensayos a una concentración de 0.5 mg/ml. El extracto con diclorometano presentó una DL_{50} de 0.146 mg/ml mientras la DL_{50} del extracto con metanol fue de 0.088 mg/ml. Por último, los dos extractos no presentaron actividad contra los cuatro estadios larvales del mosquito *Anopheles albimanus*.

B. americana no presentó actividad biocida contra los organismos estudiados y utilizando los solventes diclorometano y metanol como solventes de extracción. Para futuras investigaciones se recomienda: 1) realizar bioensayos contra otros vectores transmisores de enfermedades como *Triatoma dimidiata*, quién es transmisor de la enfermedad de Chagas, 2) hacer estos bioensayos con las otras especies guatemaltecas de *Buddleja* y 3) realizar estudios para poder determinar si las especies guatemaltecas de *buddleja* tienen acciones farmacológicas.

Asesor de Investigación: Lic. Armando Cáceres
Institución: Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos FARMAYA, S.A.