

ACTIVIDAD BIOCIDA DE CUATRO PLANTAS DE USO MEDICINAL EN EL PARQUE NACIONAL LAGUNA DE LACHUÁ (PNLL)

Gerbert Solís,¹ Armando Cáceres¹ y Cecilia Cleaves²

¹Escuela de Química Biológica; ²Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
Universidad de San Carlos de Guatemala.

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo principal determinar la actividad biocida de cuatro plantas de uso medicinal en el Parque Nacional Laguna de Lachuá (PNLL), mediante los métodos estandarizados para bacterias, hongos, levaduras, protozoos, larvas, y citotoxicidad contra *Artemia salina*. Las plantas en estudio fueron seleccionadas de un total de 209 reportadas en la encuesta etnobotánica realizada por Cleaves en el año 2,000 (1). Los criterios de selección incluían el no haber sido estudiadas anteriormente, según la base de datos NAPRALERT, y ser nativas de la región en estudio (2-7). Previo a los análisis biológicos respectivos se obtuvieron los extractos etanólicos de las plantas en estudio mediante precolación con etanol al 95% y rotaevaporación al vacío. Se demostró que los extractos de dos de las cuatro plantas tenían actividades biocidas positivas siendo estas: *Piper aeruginosibaccum* con actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis* y *Bacillus subtilis*, hasta una concentración de 0.5 mg/ml, actividad positiva contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* a una concentración de 1 mg/ml y actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina* a una concentración de 0.69 mg/mL. El espécimen vegetal *Hyptis verticillata*, demostró tener actividad contra epimastigotes de *T. cruzi* a una concentración de 0.92 mg/mL y contra promastigotes de *Leishmania braziliensis* a una concentración de 0.81 mg/mL. Las especies *Cissampelos troyaeolifolia* y *Passiflora coriacea* no mostraron ninguna bioactividad. Estos datos no se conocían y constituyen la base de futuras investigaciones que pretendan explorar con mayor profundidad las propiedades biológicas demostradas. Pueden también utilizarse para orientar científicamente el uso de las plantas con fines medicinales.

INTRODUCCIÓN

El Parque Nacional Laguna de Lachuá (PNLL) está definido como área de protección especial según decreto 4-89 del Congreso Nacional de la República de Guatemala. Se encuentra localizado en el departamento de Alta Verapaz, consiste en una extensión de 10,000 ha de bosque maduro y una laguna de color azul-turquesa de 5 km². Su estado poco alterado ha permitido la conservación de una importante biodiversidad, misma que es explotada por los habitantes de la zona de influencia, que obtienen estos recursos del bosque para suplir algunas de sus necesidades básicas, tales como la alimentación, vivienda y salud (8).

Uno de estos recursos lo constituyen las plantas medicinales, cuya utilización se realiza por información que se ha transmitido de una generación a otra, a un reducido número de personas de la comunidad. Muchas veces estas plantas son el único recurso disponible por la población para el tratamiento de las enfermedades infecciosas de mayor incidencia en la región, aunque generalmente la aplicación terapéutica de las mismas es empírica (9).

Puesto que esta situación es común en la mayoría de los países de América Latina, la Organización Mundial de la Salud, mediante la Resolución WHA 31.33 reconoce la importancia de las plantas medicinales en el cuidado de la salud, y llama la

atención a los Estados miembros a utilizar un enfoque analítico del tema de las plantas medicinales, recomendando entre otras cosas, la aplicación de criterios científicos y métodos para asegurar su eficacia en el tratamiento de condiciones y enfermedades específicas (10). Por ello, el objetivo principal de este trabajo es la determinación de la actividad biocida de cuatro plantas de uso medicinal en el PNLL no estudiadas previamente, datos que son necesarios tanto para poder continuar con el estudio científico de las características de los recursos vegetales del PNLL, como para apoyar con datos científicos el uso eficaz de las plantas medicinales por parte de la población del área.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de tipo experimental, en donde se probaron los efectos biocidas de los extractos etanólicos de cuatro plantas de uso medicinal en el PNLL (*Cissampelos troyaeolifolia*, *Hyptis verticillata*, *Passiflora coriacea* y *Piper aeruginosibaccum*) que cumplieron con las características de no haber sido estudiadas previamente, ser nativas de la región, haber sido detectadas anteriormente por la encuesta etnobotánica correspondiente y que puedan ser obtenidas durante la época de recolección asignada. Estas se eligieron de un universo de 209 plantas de uso medicinal, detectadas en un estudio etnobotánico previo, en la zona de influencia en el PNLL.

El material vegetal se secó a la sombra, se molió y una cantidad pesada se colocó en un percolador realizando extracciones con etanol al 95%. Los extractos se concentraron en rotavapor y luego en desecadora (6).

Se determinó la actividad antibacteriana y antifúngica mediante los métodos de Mitscher *et al* (1) y el de Brancato & Golding modificado por MacRae *et al* (2,3,13), respectivamente. Estas determinaciones se realizaron en dos fases, la de tamizaje de la actividad biocida y la fase de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) en la que se realizaron tres diluciones de los extractos positivos en la fase de tamizaje para determinar dicha concentración. Las determinaciones se realizaron por el método de dilución, en cuadruplicado (11).

Se utilizaron las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 9637; los hongos levaduriformes *Candida albicans* ATCC 10231 y *Cryptococcus neoformans* C13; los hongos filamentosos *Aspergillus flavus* CCQQ A-75, *Microsporium gypseum* CCQQ M-71 y *Trichophyton rubrum* CCQQ M-74.

La actividad antiprotozoaria se determinó por medio del método de González *et al.* y Hocquemiller *et al.* (4,5,14), para epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* MHOM/GT/96/SMI-04392, promastigotes de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2903 y *Leishmania mexicana* MNYC/BZ/62/M376. Para esto se enfrentaron los extractos a los protozoos antes mencionados, determinando microscópicamente, el número de parásitos vivos en los pozos de prueba contra el control negativo, el reto se realizó en microplaca (15). Los resultados se analizaron mediante el modelo estadístico Finney's Probit Analysis (5,13,16), para obtener de esta manera el valor de la concentración a la que los extractos ensayados tenían actividad contra el 90% de los protozoos (CI_{90}) a los que se enfrentaron (6,12).

La determinación de la actividad larvicida consistió en enfrentar los extractos etanólicos contra larvas de primero estadio de los mosquitos *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* de 24 horas de vida, mediante un ensayo en micro placa y por triplicado, según el método de Mishra *et al.* (6,7). Se estableció que la actividad positiva sería considerada como tal, si el extracto en estudio provocaba la muerte del 100% de las larvas presentes en los pozos de prueba, de lo contrario se estableció que la Concentración Letal (CL_{100}) es mayor de 1 mg/mL o sea que el extracto no tiene actividad biocida contra dichas larvas.

La determinación de la actividad citotóxica contra nauplios de *Artemia salina* se realizó según el método de Meyer *et al.* (7), en las dos fases de tamizaje y la determinación de la dosis letal 50% (DL_{50}) Figura 1. En la fase de tamizaje la actividad citotóxica fue determinada utilizando una concentración de 1 mg/mL de los extractos mismos que se enfrentaron a nauplios del crustáceo *A. salina* de 48 horas de vida (17). Se consideró que un extracto

tenía actividad positiva si era capaz de matar a más del 50% de los nauplios contra los que se enfrentó. Esto se realizó por triplicado por lo que el valor obtenido es el promedio de los tres pozos de prueba. Para el extracto etanólico que presentó actividad positiva contra los nauplios de *A. salina* en la fase de tamizaje, se procedió a determinar la dosis a la que el mismo era capaz de matar al 50% de estos crustáceos. Para esto se repitió el procedimiento aplicado en la fase de tamizaje, pero utilizando tres diferentes concentraciones del extracto (1.0, 0.5 y 0.25 mg/mL). El resultado se calculó mediante el programa estadístico Finney's Probit Analysis DOS (18).



Figura 1. Equipo y materiales necesarios para determinar la citotoxicidad de extractos vegetales contra nauplios de *Artemia salina*.

RESULTADOS

Rendimiento de las plantas en estudio

Los procedimientos de percolación y concentración en rotavapor a los que se sometió el material vegetal obtenido, dio como resultado la obtención de los extractos etanólicos grado miel de cada planta. En la Tabla 1 se presentan las cantidades de material vegetal inicial y la cantidad de extracto etanólico obtenido a partir de este, en gramos, así como la relación entre estos dos valores expresados por el porcentaje de rendimiento respectivo.

Tabla 1
Rendimiento del proceso de obtención de los extractos etanólicos de las plantas en estudio

Planta	Peso (g)	Extracto (g)	Rendimiento (%)
<i>C. tropaeolifolia</i>	126.9	22.3	17.5
<i>H. verticillata</i>	112.4	22.8	20.2
<i>P. coriacea</i>	118.4	18.4	15.5
<i>P. aeruginosibaccum</i>	181.8	15.6	8.57

De estas plantas, *Hyptis verticillata* resultó ser la especie con un mayor porcentaje de rendimiento con un 20.2%, mientras que *Piper aeruginosibaccum* es la especie con menor porcentaje de rendimiento.

Determinación de la actividad contra bacterias, hongos y levaduras

Fase de tamizaje

Se determinó la actividad de cada uno de los extractos etanólicos obtenidos contra las bacterias Gram positivo *B. subtilis* ATCC 6051 y *S. aureus* ATCC 25923, la micobacteria *M. smegmatis* ATCC 607, las bacterias Gram negativo *E. coli* ATCC 9637, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. typhi* ATCC 14028; los hongos levaduriformes *C. albicans* ATCC 10231 y *C. neoformans* C13; y, los hongos filamentosos *A. flavus* CCQQ A-75, *M. gypseum* CCQQ M-71, *T. rubrum*. Los resultados de estos ensayos se observan en la Tabla 2.

Cuando un microorganismo fue inhibido en su crecimiento o no se evidenció dicha actividad, se consideró que el extracto tenía actividad positiva (+) o negativa (-) respectivamente para este extracto, figura 2. Según se observa en la Tabla 2, la especie *P. aeruginosibaccum* es la única de las plantas con actividad biocida positiva contra las bacterias Gram positivo *B. subtilis* y *S. aureus*, y contra *M. smegmatis*. Este mismo extracto no presentó actividad biocida positiva contra el resto de los microorganismos a los que se enfrentó.

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

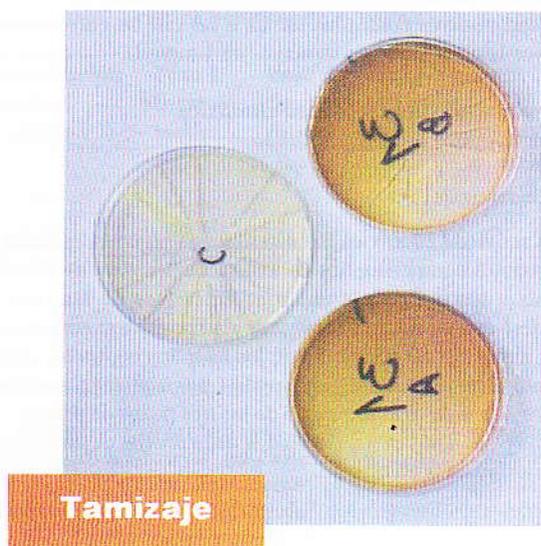


Figura 2: Tamizaje antibacteriano

Tabla 2. Actividad antibacteriana y antifúngica de las plantas en estudio del procedimiento de tamizaje

Planta	Microorganismos										
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhi</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>A. flavus</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>M. gypseum</i>
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

A: *C. tropaeolifolia* B: *H. verticillata* C: *P. coriacea*

D: *P. aeruginosibaccum*

(+) = No hay crecimiento o actividad positiva

(-) = Si hay crecimiento o actividad negativa.

Determinación de la CIM

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



Figura 3. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima de la actividad antibacteriana de *Piper aeruginosibaccum* en mg/mL

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

Referencias:

(+) = No hay crecimiento o actividad positiva;

(-) = Hay crecimiento o actividad negativa.

Se observa que el extracto etanólico de *P. aeruginosibaccum* Figura 4 nuevamente inhibió el crecimiento de los tres microorganismos contra los que ya se había enfrentado en la fase de tamizaje. Coincidentemente a la concentración de 0.5 mg de extracto por mL de agar se inhibió el crecimiento de los tres microorganismos en estudio, por lo que se considera que este valor de concentración corresponde a la CIM *in vitro* del extracto contra las bacterias Gram positivo: *B. subtilis*, *S. aureus* y la micobacteria *M. smegmatis*. En la concentración de 0.25 mg/mL se observó crecimiento bacteriano por lo que se considera que a esta concentración el extracto ya no tiene actividad.



Figura 4. *P. aeruginosibaccum*

Determinación de la actividad contra *Leishmania mexicana* y *Trypanosoma cruzi* de los extractos etanólicos de cuatro plantas

Esta actividad se determinó contra epimastigotes de *T. cruzi* y amastigotes de *L. mexicana* y *L. braziliensis*. Para esto se enfrentaron los extractos a los protozoos antes mencionados determinando, microscópicamente, el número de parásitos vivos en los pozos de prueba contra el control negativo. Los resultados se analizaron mediante el modelo estadístico Finney's Probit Analysis, para obtener de esta manera el valor de la concentración a la que los extractos ensayados tenían actividad contra el 90% de los protozoos (CI_{90}) a los que se enfrentaron. Los resultados se observan en la Tabla 4.

Tabla 4. Actividad Antiprotozoaria (*L. braziliensis*, *L. mexicana*, *T. cruzi* y) de las cuatro plantas en estudio en mg/mL

Planta	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>T. cruzi</i>
<i>C. tropaolifolia</i>	>1	>1	>1
<i>H. verticillata</i>	0.81	>1	0.92
<i>P. coriacea</i>	>1	>1	>1
<i>P. aeruginosibaccum</i>	>1	>1	1

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

Determinación de la actividad larvicida:

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

Tabla 5. Actividad larvicida contra *A. aegypti* y *A. albimanus* de las cuatro plantas en estudio (mg/mL)

Planta	<i>A. aegypti</i>	<i>A. albimanus</i>
<i>C. tropaolifolia</i>	>1	>1
<i>H. verticillata</i>	>1	>1
<i>P. coriacea</i>	>1	>1
<i>P. aeruginosibaccum</i>	>1	>1

*Concentración Letal CL_{100}

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

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

Fase de tamizaje

La actividad citotóxica fue determinada según la letalidad de los extractos contra nauplios del crustáceo *A. salina* de 48 horas de vida a los que se enfrentaron. En la fase de tamizaje se consideró que un extracto tenía actividad positiva si era capaz de matar a más del 50 por ciento de los nauplios contra los que se enfrentó. Este procedimiento se realizó por triplicado por lo que el valor obtenido es el promedio de los tres pozos de prueba. En la Tabla 6 se incluyen los resultados de la prueba de tamizaje de las cuatro plantas en estudio.

Tabla 6. Tamizaje de la actividad citotóxica de las plantas en estudio

Especie vegetal	Pozo	Pozo	Pozo	Nauplios muertos (%)
	No. 1 Muertos / totales	No. 2 Muertos / totales	No. 3 Muertos / totales	
<i>C. tropaeolifolia</i>	1/10	1/11	0/10	6.4
<i>H. verticillata</i>	0/11	0/12	0/12	0.0
<i>P. coriacea</i>	3/11	4/12	1/11	23.5
<i>P.aeruginosibaccum</i>	10/12	8/11	10/13	77.8

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

Determinación de la DL₅₀:

Ya que el extracto etanólico de *P. aeruginosibaccum* presentó actividad positiva contra los nauplios de *A. salina* en la fase de tamizaje, se procedió a determinar la dosis a la que el mismo era capaz de matar al 50% de estos crustáceos. Para esto se repitió el procedimiento aplicado en la fase de tamizaje, pero utilizando tres diferentes concentraciones del extracto (1.0, 0.5 y 0.25 mg/mL). Estos resultados se observan en la Tabla 7.

Tabla 7. Determinación de la Dosis Letal (DL₅₀) del extracto de *P. aeruginosibaccum* contra nauplios de *A. salina*

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

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

DISCUSION DE RESULTADOS

Rendimiento de las plantas en estudio

La especie *P. aeruginosibaccum* resultó ser el más importante de las cuatro analizadas, en cuanto a las diversas actividades biocidas demostradas, fue además el de menor porcentaje de rendimiento en la obtención del correspondiente extracto etanólico. Deben considerarse las dosis o concentraciones a las que demostró tener actividad positiva en relación con la cantidad de materia vegetal necesaria para obtener las propiedades establecidas en el presente estudio.

Actividad contra bacterias, levaduras y hongos

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

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

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

Las bacterias contra las que se demostró actividad positiva, coincidentemente son Gram positivo, y ninguna de las Gram negativo resultaron inhibidas por el extracto. Este hecho también ha sido observado en investigaciones anteriores, en las que se ha considerado que las características de la pared celular de las bacterias Gram negativo son las que les confieren resistencia a factores ambientales y a la acción de algunos antibióticos, principalmente los que actúan al nivel de la misma (10).

Actividad antiprotozoaria

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

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

Actividad larvicida

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

Actividad citotóxica contra nauplios de *Artemia salina*

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

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

Se confirma la hipótesis planteada, demostrándose la actividad de las especies *P. aeruginosibaccum* contra *S. aureus*, *M. smegmatis*, *B. subtilis*, *T. cruzi* y contra nauplios de *A. salina* y de *H. verticillata* que demostró actividad contra *L. braziliensis* y *T. cruzi*. Si bien la actividad es evidente y útil para validar en parte el uso tradicional, la concentración efectiva es relativamente alta, por lo que su importancia para el desarrollo de medicamentos es limitada. Se recomienda realizar un fraccionamiento bioguiado de *P. aeruginosibaccum* para determinar la naturaleza química del principio activo.

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación fue posible gracias a todas las personas que laboran en el Departamento de Citohistología, Escuela de Química Biológica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, especialmente a: la Licda. María Eugenia Paredes, Jefe del Departamento cediendo amablemente las instalaciones del área para la realización de los ensayos, a las Licdas. Margarita Paz de Ramírez y Blanca Samayoa por las observaciones y recomendaciones con respecto a la edición del presente documento así como los anteriores al mismo; a mis compañeros Lourdes Lorenzana, Swisly Arana y Adolfo Pérez, por el apoyo técnico pero especialmente por su amistad. Al Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica por proveer las cepas bacterianas y fúngicas utilizadas así como la asesoría en las técnicas microbiológicas de los ensayos y descarte de materiales, especialmente a la Licda. Heidi Logeman y Liliana Acevedo. A las siguientes instituciones por el apoyo financiero y material del presente trabajo: Departamento de Citohistología, Cooperación Técnica del Gobierno del Japón (JICA), Organización de los Estados Americanos (OEA), Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas (IIQB) y Depto. de Entomología (MSPAS).

REFERENCIAS

1. Cleaves, C. 2000. Etnobotánica Médica de Cinco Comunidades de la Zona de Influencia del Parque Nacional Laguna Lachuá (PNLL), Alta Verapaz, Guatemala. Tesis Licenciada en Biología. Proyecto Lachuá -Escuela de Biología, Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC) / Instituto Nacional de Bosques (INAB) / UICN.
2. CYTED. 1993. Manual de técnicas de investigación. Bogotá, Proyecto X-1, S/P.
3. Bracanto FP & Golding NS. 1983. The diameter of the mould colony as a reliable measure of growth. *J. Mycol.* 45: 848-863.
4. Mac Rae WD *et al.* 1988 Studies of the pharmacological activity of Amazonian *Euphorbiaceae*. *J. Ethnopharmacol.* 22:143-172.
5. González J *et al.* 1990. In vitro activity of natural products against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Phytoter. Res.* 4:1-4.
6. Cáceres A *et al.* 1998. Plants used in Guatemala for treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American Trypanosomes of 13 native plants. *J. Ethnopharmacol.* (62):195-202.
7. Mishra SK *et al.* 1987. Insecticidal and nematocidal properties of microbial metabolites. *J. Indust. Microbiol.* 2: 267-276.
8. Conservation of Lake Lachuá and sustainable development of its influence area. Disponible en www.uicnhumedales.org/index.htm.
9. X.A.D.S. 1978. Plantas de interés terapéutico e industrial. Monterrey, Ed. Limusa, pp.11, 13.
10. Varea, A. *et al.* 1997. Biodiversidad, Bioprospección y Bioseguridad. Quito, Ed. Abyayala, pp. 151-159.
11. Ríos J.L., *et al.* 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity; a review of the literature. *J. Ethnopharmacol.* 28:127-149.
12. Berger I. *et al.* 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. *J. Ethnopharmacol.* 62:107-115.

13. Cáceres A *et al.* 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening of antimycotic activity of 44 plant extracts. J. Ethnopharmacol. 40:207-213.
14. Hocquemiller R *et al.* 1991 Isolement syntese of 1 espinatol. nouveae antiparataire. J. Nat. Prod. 54:445-452.
15. Fournet A *et al.* 1994. Leishmanicidal and trypanomicidal activities of Bolivian medinal plants. J. Ethnopharmacol. 37:159-264.
16. Berger I *et al.* 2001. Antiprotozoal activity of *Neurolaena lobata*. Phytother. Res. 15: 327-330.
17. Nirmal, S *et al.* 1998. Larvicidal Activity of *Gliricidia sepium* Against Mosquito Larvac of *Anopheles stephansi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Pharmaceutical Biol. 36: 3-7.
18. Sam Wah T, Colegate FM & Molineux RJ. 1993. Toxicity testing using the brine shrimp. *Artemia salina*. IN. Bioactive Natural products. Detection, isolation and structural determination. Boca Raton, CRC Press, pp. 441-456.