

Metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana y letalidad de las hojas de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Melissa officinalis* (toronjil)

Ruth, Vélez¹; Haydelba, D'Armas^{2,3*}; Carmita, Jaramillo-Jaramillo¹; Elington, Vélez¹

(Recibido: Diciembre - 2017, Aceptado: Abril - 2018)

¹Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud, Universidad Técnica de Machala, UTMACH, Machala, Ecuador
²Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Universidad Estatal de Milagro, Milagro, Ecuador; ³Laboratorio de Productos Naturales y Lípidos, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Cumana, Sucre, Venezuela.
E-mails: hdamasr@unemi.edu.ec; htrinidad86@hotmail.com

Resumen

Los ejemplares de las especies vegetales *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Melissa officinalis* (toronjil), se recolectaron al azar en la localidad de Machala, Ecuador. Las hojas fueron lavadas, secadas, molidas y extraídas por maceración con metanol; los filtrados concentrados por evaporación a presión reducida. A cada extracto, se le realizaron pruebas fitoquímicas y ensayos biológicos como: actividad antimicrobiana (antibiograma: difusión en agar) y letalidad con *Artemia salina*. Los extractos de *C. citratus* y *M. officinalis* revelaron la presencia de esteroides insaturados, triterpenos pentacíclicos, fenilpropanoides y catequinas. Mientras que en el de *M. officinalis* se detectaron, además, cumarinas y metilencetonas. Los extractos de ambas especies (soluciones de 20 y 40 mg/L) mostraron actividad antibacteriana contra las cepas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, a excepción de los extractos metanólicos de *M. officinalis* (20 mg/L) y *C. citratus* (40 mg/L) que no exhibieron actividad frente a *E. coli*. La especie *C. citratus* mostró el mayor efecto antibacteriano contra las bacterias *P. aeruginosa* y *S. aureus* (halos de inhibición > 15mm). Se observó una actividad antifúngica alta del extracto de *C. citratus*, y una actividad moderada del extracto de *M. officinalis*, contra la cepa del hongo *Candida albicans*. *C. citratus* y *M. officinalis* mostraron una actividad letal significativa (CL50 <1000 µg/ml) frente a nauplios de *A. salina* a las 24 h de exposición: 358,03 y 72,25 µg/ml respectivamente. La especie *M. officinalis* presentó la mayor letalidad, considerado altamente tóxico según CYTED. A partir de los resultados obtenidos, se puede inferir que las plantas *C. citratus* y *M. officinalis* cultivadas en Ecuador son una fuente promisoriosa de metabolitos secundarios bioactivos con actividad farmacológica (antimicrobianos y citotóxicos).

Palabras Clave: actividad tóxica; actividad antimicrobiana; fitoquímica; *Artemia salina*; *Cymbopogon citratus*; *Melissa officinalis*

Secondary metabolites, antibacterial activity and lethality of *Cymbopogon citratus* (lemon verbena) and *Melissa officinalis* (lemon balm)

Abstract

The specimens of the plant species *Cymbopogon citratus* (lemon-grass) and *Melissa officinalis* (lemon-balm), were collected at random in the town of Machala, Ecuador. The leaves were washed, dried, ground and extracted by maceration with methanol; the filtrates concentrated by evaporation at reduced pressure. Each extract was subjected to phytochemical tests and biological tests such as: antimicrobial activity (antibiogram: agar diffusion) and lethality with *Artemia salina*. Extracts of *C. citratus* and *M. officinalis* revealed the presence of unsaturated sterols, pentacyclic triterpenes, phenylpropanoids and catechins. While in *M. officinalis* were detected, in addition, coumarins and methylene ketones. The extracts of both species (solutions of 20 and 40 mg / L) showed antibacterial activity against the strains *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, with the exception of the methanolic extracts of *M. officinalis* (20 mg / L) and *C. citratus* (40 mg / L) that did not exhibit activity against *E. coli*. The species *C. citratus* showed the greatest antibacterial effect against the bacteria *P. aeruginosa* and *S. aureus* (halos of inhibition > 15mm). A high antifungal activity of the extract of *C. citratus* was observed, and a moderate activity of the extract of *M. officinalis*, against the strain of the fungus *Candida albicans*. *C. citratus* and *M. officinalis* showed significant lethal activity (LC50 <1000 µg / ml) against *A. salina* nauplii at 24 h exposure: 358.03 and 72.25 µg / ml respectively. The species *M. officinalis* had the highest lethality, considered highly toxic according to CYTED. From the results obtained, it can be inferred that the plants *C. citratus* and *M. officinalis* cultivated in Ecuador are a promising source of bioactive secondary metabolites with pharmacological activity (antimicrobial and cytotoxic).

Keywords: toxic activity; antimicrobial activity; *Artemia salina*; *Cymbopogon citratus*; phytochemistry; *Melissa officinalis*.

INTRODUCCIÓN

Hasta el siglo XVIII se conocían las propiedades curativas de las plantas, su efecto sobre el organismo y su modo de aplicación, pero se desconocían sus principios activos. Con el desarrollo de las teorías de la evolución y herencia genética, el uso del microscopio y el nacimiento de ciencias como la fitoquímica y de técnicas como el análisis instrumental, fue posible el reconocimiento y el aislamiento de los principios activos de muchas plantas medicinales (1).

Se han utilizado diversas técnicas microbiológicas para demostrar la actividad antimicrobiana de plantas frente a microorganismos patógenos para el hombre. Entre ellas la utilización de extractos. El extracto de plantas es una mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenible por procesos físicos y/o químicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología; en general, los extractos son soluciones diluidas de metabolitos secundarios (2).

El aumento de la confianza en el uso de plantas medicinales y productos derivados se ve reflejado por su empleo mayoritario tanto en países en vías de desarrollo (80%), como en los países desarrollados (50-60%). Esta realidad se puede potenciar aún más en un país como Ecuador, poseedor de una enorme biodiversidad y de un importante bagaje de conocimientos ancestrales sobre el empleo de plantas como alternativa curativa (3).

Ecuador cuenta con centenares de plantas aromáticas y medicinales. Por lo tanto, en el país el uso de plantas medicinales está inmerso en la cotidianidad de sus habitantes. La medicina popular se practica principalmente por habitantes de zonas rurales, pero también por ciudadanos de toda clase social. Se pueden encontrar gran variedad de plantas con usos medicinales que se expenden en mercados de la Sierra, Costa y Amazonía (4).

En las comunidades rurales de Ecuador, se usa ampliamente un sin número de plantas medicinales, sin que todas estas tengan un estudio científico de sus propiedades, estas prácticas se basan solamente en el conocimiento empírico y en la experiencia de los pueblos. Tal es el caso de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) y toronjil (*Melissa officinalis*), que son usadas por la población rural con la creencia de que posee grandes propiedades medicinales para aliviar diferentes afecciones, siendo utilizada

como calmante, antiinflamatorio, contra el dolor de estómago y afecciones cutáneas en general (5).

La mayoría de las especies del género *Cymbopogon* (Poaceae) han sido ampliamente usadas para el tratamiento de enfermedades, de los nervios y gastrointestinales; también se utilizan como antiespasmódicos, analgésicos, antiinflamatorios, antipiréticos, diuréticos y sedativos (6). A su vez, las plantas del género *Melissa* (Lamiaceae) son muy utilizadas en diversas preparaciones aromáticas por sus propiedades carminativas y sedantes, como estimulante digestivo y son indicadas en el tratamiento de espasmos gastrointestinales; sus hojas también presentan actividad antibacteriana y antiviral (7.)

Este trabajo de investigación se enfocó en un análisis de las hojas de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) y toronjil (*Melissa officinalis*), con el propósito de determinar las familias de compuestos químicos (metabolitos secundarios que brindan la acción terapéutica o toxica) y su acción farmacológica (actividad antimicrobiana y letalidad contra *A. salina*). Este estudio brinda un amplio conocimiento sobre la composición química y el porqué de las propiedades medicinales de dichas plantas a la población que emplea estas especies, de tal manera que se pueda emplear como principios activos en la elaboración de fitofármacos.

DESARROLLO

Metodología

Recolección de las muestras.

Los ejemplares de la especie vegetal *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Melissa officinalis* (toronjil) fueron recolectados en la ciudad de Machala (Provincia del Oro: 65-85 % de humedad relativa y temperatura promedio de 26 °C), Ecuador. Según su calidad organoléptica, se seleccionaron las hojas sanas para realización de los análisis, siendo procesados en el laboratorio, sin almacenamiento previo. La identificación de la especie fue realizada por el Botánico Jesús Inca del Herbario de Quito, Ecuador.

Obtención de los extractos.

Las hojas de cada planta se lavaron con agua destilada y fueron secadas a temperatura ambiente por 24 horas y posteriormente en una estufa (Memmert SNB 400 con flujo de aire) a 40 °C por

24 horas. Luego, se pulverizaron con un molino (Lab. Mill serial No. 56969, Type AR 400 Erweka®, Germany) y se pesaron. Los extractos se obtuvieron por maceración del polvo de las hojas con metanol 100% puro por 72 horas. Los extractos fluidos se filtraron y el residuo se re-extrajo con metanol por 48h; los filtrados combinados fueron concentrados a presión reducida (aprox. 11 mbar) y 40 °C en un rotaevaporador marca Hidolph, obteniéndose el extracto metanólico crudo para cada especie. Se determinó la masa de cada uno de los extractos de ambas plantas.

Análisis Fitoquímico.

Para detectar las familias de compuestos presentes en los extractos de las esponjas se llevaron a cabo pruebas químicas específicas, las cuales permitieron apreciar la posible presencia o ausencia de cumarinas y fenilpropanoides (8); alcaloides, saponinas, glicósidos cardiotónicos, glicósidos cianogénicos, esteroides insaturados y triterpenos pentacíclicos, taninos y polifenoles, antraquinonas y metilencetonas, siguiendo la metodología de (9).

Actividad antibacteriana.

Se utilizó la técnica de difusión en agar, según la metodología descrita por Bauer et al. (10), empleándose cepas de bacterias certificadas: una Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) y dos Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), pertenecientes a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). La misma consistió en impregnar discos estériles de papel de filtro Whatman N° 3 de 6 mm de diámetro con 10 µl de una solución preparada (20 y 40 mg/ml) del extracto a analizar. Estos discos se colocaron dentro de cajas de Petri que contenían agar Mueller-Hinton, inoculadas con una suspensión bacteriana de concentración conocida (1x10⁸ bacterias/ml), preparada por comparación con un patrón comercial estándar N° 0,5 de McFarland. Posteriormente, las cajas se preincubaron a 5°C durante 12 horas, para permitir la difusión del extracto, y luego, se incubaron a 37°C durante 48 horas, para permitir el crecimiento bacteriano. Las zonas claras que se formaron alrededor de los discos, se consideraron halos de inhibición, los

cuales fueron medidos, registrando para cada caso el diámetro en milímetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano.

Actividad antifúngica.

Se siguió la técnica descrita por Madubunyi (11), utilizando cepas de un hongo patógeno (*Candida albicans*) de origen clínico. Dicha cepa se incubó por un periodo de 5 a 7 días a temperatura ambiente en un tubo con Agar Papa Dextrosa (PDA). Al cabo de este tiempo, se añadió 10 ml de agua destilada estéril al tubo, se agitó vigorosamente y se filtró a través de un embudo con gasa previamente estéril, para así obtener una suspensión de esporas. La cepa de *C. albicans* se trató siguiendo la metodología de la comparación con un estándar de turbidez 0,5 McFarland. La solución espongiorial obtenida se colocó sobre cápsulas de Petri, previamente preparadas con PDA, empleando hisopos estériles. Posteriormente, se colocaron los discos de papel Whatman N° 3 de 6 mm de diámetro impregnados previamente con el extracto, y luego, se incubaron por dos días a temperatura ambiente. La aparición de halos de inhibición alrededor del disco indicó la actividad fúngica del extracto, los cuales se verificaron tomando en cuenta el diámetro (mm) de los mismos.

Actividad tóxica o letal contra *Artemia salina*.

Se preparó una solución de 10 000 µg/ml del extracto, en una mezcla H₂O/DMSO según la solubilidad de éste y, a partir de ésta, se prepararon soluciones de 1 000 - 0,01 µg/ml mediante diluciones sucesivas con agua de mar bifiltrada, en viales que contenían 10 nauplios de *A. salina*, eclosionados con 24 horas de anticipación. Por cada concentración, se realizaron tres réplicas y un control con igual número de réplicas. La cuantificación de la mortalidad de los nauplios se llevó a cabo pasadas las 24 y 48 horas de haber montado dicho ensayo. Los datos obtenidos se utilizaron para calcular la concentración letal media de los extractos y fracciones ensayadas, mediante la aplicación del software LC50 V2.5 diseñado para tal fin, que considera los análisis estadísticos computarizados (Probit, Binomial, Logit y Moving Average) con límites de confianza de 95 % (12, 13).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de extractos.

Obtenidos todos los extractos metanólicos de las hojas de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Melissa officinalis* (toronjil), se determinó la masa de los diversos extractos, así como también, su porcentaje de rendimiento. Se pudo observar un rendimiento mayor para la especie *M. officinalis* (5,95%) y menor para *C. citratus* (3,92%), estos valores dependen de distintos factores como las condiciones agronómicas del suelo, las malezas presentes que compiten por nutrientes con la planta, el momento en el que se cosechan y las partes usadas para la extracción, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (14).

Análisis Fitoquímico.

Se realizaron las pruebas químicas para determinar la posible presencia de familias de

metabolitos secundarios en los extractos de las hojas de las especies en estudio. Como puede observarse en la Tabla 1, el extracto de *C. citratus* es más rico en metabolitos secundarios que el extracto de *M. officinalis*, contiene un 46,15 % de familias de compuestos, siendo éstos: cumarinas, metilencetonas, esteroides insaturados, triterpenos, fenilpropanoides y catequinas; a diferencia del extracto metanólico de *M. officinalis* que contiene un 30,77 % de metabolitos y mostró la presencias de los mismos compuestos químicos que *C. citratus*, excepto la ausencia de cumarinas y metilencetonas. En ambas especies no se observó la presencia de alcaloides, taninos, polifenoles, saponinas, glicósidos y flavonoides. Es de hacer notar que el metanol, al ser un solvente muy polar, tiene la capacidad de extraer en su gran mayoría los metabolitos secundarios presentes en las hojas.

Tabla 1. Familia de metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de las hojas de las especies en estudio.

Familia de metabolitos	C. citratus	M. officinalis	% de metabolitos pertenecientes a la misma familia química
Saponinas	-	-	0
Taninos y polifenoles	-	-	0
Glicósidos cardiotónicos	-	-	0
Glicósidos cianogénicos	-	-	0
Alcaloides	-	-	0
Cumarinas	+	-	50
Metilencetonas	+	-	50
Flavonoides	-	-	0
Esteroides insaturados	+	+	100
Triterpenos	+	+	100
Fenilpropanoides	+	+	100
Antraquinonas	-	-	0
Catequinas	+	+	100
% de metabolitos presentes en cada extracto	46,15	30,77	

Mediante un estudio farmacológico y tamizaje químico realizado a un extracto hidroalcohólico de *C. citratus*, se corroboró la presencia de compuestos reductores, alcaloides, taninos, flavonoides y triterpenos (15). En otra investigación realizada a extractos alcohólicos y aceites esenciales de especies del género *Melissa*, se identificaron

algunos compuestos orgánicos como taninos, polifenoles, flavonoides, glicósidos, alcaloides y esteroides en los extractos, y terpenos en las esencias (16). Sin embargo, la mayoría de estos metabolitos no fueron detectados en los extractos orgánicos analizados tanto de *C. citratus* como de *M. officinalis*.

Actividad letal o tóxica.

Este bioensayo es un indicador de la actividad antitumoral de extractos vegetales y/o compuestos químicos presentes en los mismos. Inicialmente, se determinó que existe una correlación positiva entre la mortalidad de las larvas de *Artemia* y la citotoxicidad frente a las células cancerígenas. De este modo, es posible detectar y entonces monitorear el fraccionamiento de extractos con actividad citotóxica, utilizando el ensayo de mortalidad de larvas, más que otros ensayos antitumorales in vivo o in vitro que resultan más tediosos y costosos (17).

La Tabla 2 muestra el porcentaje de mortalidad del extracto en metanol de *C. citratus* frente a larvas de

A. salina, ensayada a distintas concentraciones del extracto, observándose que a mayor concentración, hubo un mayor porcentaje de larvas muertas, específicamente un 20% de los organismos murieron a una concentración de 100 µg/ml y no hubo mortalidad en los rangos de 1 a 10 µg/ml. Adicionalmente, la Tabla 3 presenta la concentración letal media del extracto de metanol de *C. citratus* (CL₅₀ = 358,03 µg/ml), resultado validado con el método estadístico Moving Average, dentro de los límites de confianza, determinándose por lo tanto que el extracto de las hojas de *C. citratus* es moderadamente tóxico según las Categorías de toxicidad del CYTED (18).

Tabla 2. Citotoxicidad del extracto de metanol de *C. citratus* frente a *A. salina*

Concentraciones (µg/ml)	N° de nauplios		
	Expuestos	Muertos	Porcentaje (%) de mortalidad
1000	31	25	80,6
100	30	6	20,0
10	30	0	0,0
1	30	0	0,0
Control	30	2	6,7

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

Tabla 3. Concentración letal media (CL₅₀) del extracto de metanol de *C. citratus*

Método Estadístico	CL ₅₀ (µg/ml)	Límites de confianza del 95%	
		Mínimo	Máximo
Binomial	358,03	100,00	1000,00
Moving Average	358,03	236,14	558,99
Probit	366,31	231,78	589,14
Logit	336,89	0,00	∞

CL₅₀: 358,03 µg/ml

La Tabla 4 revela el porcentaje de mortalidad del extracto metanólico de las hojas de *M. officinalis* frente a larvas de *A. salina*, con la variación de las concentraciones, observándose que a mayor concentración mayor porcentaje de larvas muertas; es evidente que a la concentración de 100 µg/ml hay un porcentaje de organismos muertos mayor a la media de organismos bioensayados (53,3%) y que a la más baja concentración, no hubo mortalidad.

La Tabla 5 muestra una CL₅₀ de 72,25 µg/ml para el mismo extracto de *M. officinalis*, usando método estadístico *Moving Average*, dentro de los límites de confianza. Por lo tanto, se podría decir que este extracto posee una letalidad muy significativa, más potente que el extracto de *C. citratus*, siendo considerado como altamente tóxico según las Categorías de toxicidad del CYTED (18).

Tabla 4. Citotoxicidad del extracto de metanol de *M. officinalis* frente a *Artemia salina*

Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)	N° de nauplios		
	Expuestos	Muertos	Porcentaje (%) de mortalidad
1000	30	30	100,0
100	30	16	53,3
10	30	4	13,3
1	30	0	0,0
Control	30	2	6,7

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

Tabla 5. Concentración letal media (CL₅₀) del extracto de metanol de *M. officinalis*

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

CL₅₀, 72,25 $\mu\text{g/ml}$

A pesar de que la CL₅₀ de *M. officinalis* es mucho menor y más letal que la de *C. citratus*, probablemente, ambos son considerados letales y podrían poseer compuestos bioactivos, ya que tienen un CL₅₀ < 1000 $\mu\text{g/ml}$ (13). Este efecto letal o tóxico observado para ambos extractos metanólicos frente a nauplios de *A. salina*, se debería posiblemente a la presencia de metabolitos secundarios pertenecientes a las familias de: cumarinas, metilcetonas, esteroides insaturados, triterpenos y fenilpropanoides detectados en los ensayos fitoquímicos realizados.

Un estudio reciente realizado sobre la composición química y actividad biológica de cuatro especies del género *Cymbopogon*, demostró la citotoxicidad y la actividad antitripanosomal/antiplasmodial in vitro de sus aceites esenciales (19), lo que está en concordancia con la actividad tóxica observada para *C. citratus* en esta investigación.

Actividad antibacteriana.

Los extractos metanólicos fueron probados frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, mostrando inactividad contra estas cepas bacterianas. Sin embargo, esto

no implica que frente a otros microorganismos no puedan presentar cierta actividad inhibitoria (20). En la Tabla 6 se muestran los valores de los halos de inhibición que se obtuvieron en los medios de cultivo sembrados con las cepas de bacterias mencionadas, luego de ser expuestos a una solución de una concentración de 20 mg/ml de cada uno de los extractos metanólicos. Se puede observar que el extracto de *C. citratus* presentó mayor actividad antibacteriana contra la cepa de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, es decir contra todas las bacterias bioensayadas.

A diferencia de los halos de inhibición medidos, luego de que las bacterias fueron sembradas en los medios de cultivo y expuestas al efecto de una solución de 40 mg/ml de cada extracto (Tabla 7). Se puede observar que el extracto de *M. officinalis* mostró un mayor efecto antibacteriano que el de *C. citratus*, contra la cepa de *E. coli*. En término general, es evidente que la sensibilidad bacteriana de las cepas *P. aeruginosa* y *S. aureus* frente al extracto de *C. citratus* fue mayor a una concentración de 20mg/ml, en relación a lo observado para el extracto de *M. officinalis*.

Tabla 6. Actividad antibacteriana de una solución de 20 mg/ml de los extractos metanólicos de las hojas de ambas especies

Bacterias	Halos de inhibición (mm) promedios ^a		
	<i>C. citratus</i>	<i>M. officinalis</i>	Ciprofloxacino ^b
<i>E. coli</i>	14	6	36
<i>P. aeruginosa</i>	31	12	41
<i>S. aureus</i>	36	12	43

a: media de los valores de dos réplicas; b: antibiótico de referencia; disco de 6 mm de diámetro

Tabla 7. Actividad antibacteriana de una solución de 40 mg/ml de los extractos metanólicos de las hojas de ambas especies.

Bacterias	Halos de inhibición (mm) promedios ^a		
	<i>C. citratus</i>	<i>M. officinalis</i>	Ciprofloxacino ^b
<i>E. coli</i>	6	15	45
<i>P. aeruginosa</i>	9	13	44
<i>S. aureus</i>	11	13	48

a: media de los valores de dos réplicas; b: antibiótico de referencia; disco de 6 mm de diámetro

Los extractos de plantas tienen un gran potencial como compuestos antimicrobianos contra microorganismos. En estudio realizado en Brasil, se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos de plantas y fitoquímicos con microorganismos susceptibles y resistentes a antibióticos, observándose que la asociación de antibióticos y extractos de plantas mostró una actividad antibacteriana sinérgica contra las bacterias resistentes a los antibióticos. Entre ellas la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* fue inhibida por *M. officinalis* y otros extractos ensayados (21). En otra investigación llevada a cabo en varias especies del género *Melissa*, se reportó que sus hojas también presentan actividad antibacteriana y antiviral, como se mencionó previamente (7).

Actividad antifúngica.

En el bioensayo de evaluación de la sensibilidad fúngica de una cepa específica de hongo, se

observó la formación de halos de inhibición en los medios de cultivo sembrados con *C. albicans*, luego de ser expuestos a diferentes concentraciones (20 y 40 mg/ml) de ambos extractos (*C. citratus* y *M. officinalis*), lo que confirma la acción inhibitoria del crecimiento de *C. albicans*.

El extracto que mostró un efecto antifúngico mayor (acción inhibitoria moderada) a ambas concentraciones, fue el de *C. citratus*; sin embargo, se puede decir que *C. albicans* exhibió una sensibilidad antifúngica moderada y similar frente a ambos extractos ensayados. Estos resultados obtenidos están en concordancia con un estudio realizado con extractos de hojas de *Rosmarinus officinalis* y *Melissa officinalis*, dichos extractos presentaron propiedades antifúngicas sobre especies de hongos aisladas del género *Candida*; aunque el de *Melissa officinalis* mostró halos de inhibición de mayor diámetro (22).

Tabla 8. Actividad antifúngica de los extractos metanólicos de las hojas de ambas especies

Hongo	Concentración (mg/ml)	Halos de inhibición (mm) promedios ^a		
		<i>C. citratus</i>	<i>M. officinalis</i>	Cloranfenicol ^b
<i>C. albicans</i>	20	12	11	42
<i>C. albicans</i>	40	19	17	45

a: media de los valores de dos réplicas; b: antifúngico de referencia; disco de 6 mm de diámetro

CONCLUSIONES

La hojas de las plantas estudiadas exhibieron un efecto antibacteriano y antifúngico significativo contra las cepas de bacterias Gram (+) y Gram (-), y hongo ensayado (*C. albicans*).

Ambas especies vegetales analizadas constituyen una fuente promisoría de compuestos químicos antimicrobianos y antitumorales.

Algunos de los metabolitos secundarios detectados en los extractos de ambas plantas, podrían ser responsables de la antibiosis observada en las pruebas de actividad biológica, y se podría inferir que dichas plantas, usadas tradicionalmente en la medicina popular de Ecuador, constituyen una fuente promisoría de compuestos químicos de interés farmacológico.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al Proyecto Prometeo de la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia y Tecnología de la República de Ecuador (SENESCYT) por el financiamiento de esta investigación.

REFERENCIAS

1. Fonnegra R, Jiménez S. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Colombia: Universidad de Antioquia; 2007. 343p.
2. Ortuño M. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. España: AIYANA; 2006. p 223-224.
3. Oliveira M, Velázquez D, Bermúdez A. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales. *Revista de Ciencia y Tecnología de América*. 2005; 30 (8): 453-459.
4. De La Torre L, Alarcón D, Kvist L, Salazar J. Usos medicinales de las plantas. Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Ecuador: Herbario QCA & Herbario AAU; 2008. p 105-114.
5. Cabrera Y, Fadrugas A, Guerrero L. Antibióticos naturales. Mito o realidad. *Revista Cubana de Medicina General Integral*. 2005; 21 (3-4):1-2.
6. Santin M, Dos Santos A, Nakamura C, Dias B, Ferreira I, Ueda-Nakamura T. In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. *Parasitol Res*. 2009; 105(6): 1489-96.
7. Sánchez E, León M, Chávez D, Hechevarría I, Pino J. Caracterización farmacognóstica de *Melissa officinalis* (toronjil). *Rev Cubana Plant Med*. 2010; 15 (4): 198-208.
8. Murillo E, Méndez J. Guía metodológica para la detección rápida de algunos metabolitos secundarios y caracterización de una droga cruda. Colombia: Universidad de Tolima; 2011.
9. Marcano D, Hasegawa M. Fitoquímica Orgánica. Venezuela: Universidad Central de Venezuela-Torino; 2002. 128p.
10. Bauer A, Kirby A, Sherris J, Turk M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 1966; 45 (4): 493-496.
11. Madubunyi I. Antimicrobial activities of the constituents of *Garcinia kola* seeds. *Intern. J. Pharm*. 1995; 33(3): 232-237.
12. Stephan CE. Methods for calculating an LC50. In: Mayer FL, Hamelink J. Editors. Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation: ASTM STP 634. Philadelphia: American Society for Testing and Material; 1977. p 65-84.
13. Meyer B, Ferrigni N, Putnam J, Jacobsen L, Nicols D, McLaughlin J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*. 1982; 45(1): 31-34.
14. World Health Organization. WHO. Monographs on Selected Medicinal Plants; 1999. p 295. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s2200e/s2200e.pdf>.
15. Betancourt E, González Y, Escobar R, Bermúdez D, Blanco F, Martínez C. Evaluación del potencial hipolipemiante de *Cymbopogon citratus* S. en un modelo de hiperlipidemia aguda. *Medicentro Electrónica*. 2015; 19 (1): 2-12.
16. Moradkhani H, Sargsyan E, Bibak H, Naseri B, Sadat-Hosseini M, Fayazi-Barjin A, Meftahzade H. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review. *Journal of Medicinal Plant Research*. 2010; 4(25): 2753-2759.
17. Pino O, Lazo J. Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*. 2010; 22 (1): 35-36.
18. CYTED. (Ciencia y Tecnología para el Desarrollo). Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Manual de Técnicas de Investigación. España: Editor Pinzón; 1995, p 45-49.

19. Kpoviessi B, Accrombessia G, Frédérique M, Moudachirouc M, Quetin-Leclercq J. Chemical composition, cytotoxicity and *in vitro* antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. *J Ethnopharmacol.* 2014; 151(1): 652-9.
20. Mora J, Newmark F, Santos M, Sánchez J. Evaluación de extractos de esponjas marinas como nuevas fuentes de sustancias antimicrobianas. *Rev. Esp. Quimioter.* 2008; 21 (3): 174-179.
21. Gislene G, Nascimento F, Locatelli J, Freitas P, Silva G. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2000; 31: 247-256.
22. Márquez G. Actividad antifúngica de *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Melissa officinalis* (toronjil) contra especies del género *Candida*, aisladas de pacientes con vulvovaginitis. Trabajo de grado. Venezuela: Universidad de Oriente; 2012. 45p.