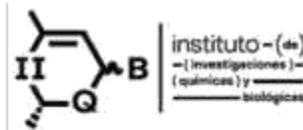




USAC
TRICENTENARIA
Universidad de San Carlos de Guatemala



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS

Guatemala, 17 de julio del 2023

REF.IIQB.119.07.23

Doctora
Alice Patricia Burgos Paniagua
Dirección General de Investigación
Universidad de San Carlos de Guatemala
Presente

Respetable Doctora Burgos:

Con un cordial saludo me dirijo a usted para hacer la entrega, en versión impresa y electrónica, del informe final del proyecto de investigación: **Actividad biológica de fracciones preparativas de extractos de seis plantas del género *Lippia* nativas de Guatemala contra patógenos acuícolas, código DES12-2022 y partida presupuestal 4.8.63.0.55** coordinado por el Dr. Juan Francisco Pérez Sabino.

Sin otro particular, me suscribo de usted,

Atentamente,

“Id y Enseñad a Todos”



Dra. María Eunice Enríquez Cotton
Directora
Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas

c.c. archivo
MEEC/tvch.

INFORME FINAL

**Programa Universitario de Investigación en Desarrollo Industrial
-PUIDI-**

**Actividad biológica de fracciones preparativas de extractos de seis plantas del
género *Lippia* nativas de Guatemala contra patógenos acuícolas**

Partida presupuestaria número 4.8.63.0.55

Código del proyecto de investigación DES12 – 2022

**Unidad Académica Avaladora Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas –
IIQB-Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia**

**Dr. Juan Francisco Pérez Sabino
Coordinador del Proyecto**

**Lcdo. Max Samuel Mérida Reyes
Investigador**

**Br. Zonia Alejandra Caravantes Alvarado
Auxiliar de Investigación I**

Guatemala, 17 de julio de 2023

Autoridades

Dra. Alice Burgos Paniagua
Directora General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas

Inga. Liuba María Cabrera
Coordinadora del Programa Universitario de Investigación en Desarrollo
Industrial -PUIDI-

Autores

Dr. Juan Francisco Pérez Sabino
Coordinador del Proyecto de Investigación

Lic. Max Samuel Mérida Reyes
Investigador

Br. Zonia Alejandra Caravantes Alvarado
Auxiliar de Investigación I

Colaboradores

M. Sc. Josué Rodolfo García Pérez
Centro de Estudios del Mar y Acuicultura – CEMA-, Usac

Licda. Bessie Evelyn Oliva Hernández

Escuela de Química, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Usac

M. A. Rodolfo Orozco Marinelli Orozco Chilel

Escuela de Química, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Usac

Lic. Manuel Alejandro Muñoz Wug

Escuela de Química, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Usac

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (Digi), 2023. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada con recursos del Fondo de Investigación de la Digi de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la partida presupuestaria 4.8.63.0.55 con código DES12 – 2022 en el Programa Universitario de Investigación en Desarrollo Industrial -PUIDI-

Los autores son responsables del contenido, de las condiciones éticas y legales de la investigación desarrollada.



Universidad de San Carlos de Guatemala
Dirección General de Investigación



Formato de informe final (cuerpo del documento)

1 Índice general (incluir índice de tablas y figuras)

Contenido

1	Índice general (incluir índice de tablas y figuras)	4
2	Resumen y palabras claves	8
3	Introducción	10
4	Planteamiento del problema	12
5	Delimitación en tiempo y espacio	13
5.1	Delimitación en tiempo	13
5.2	Delimitación espacial	13
6	Marco teórico	14
6.1	Importancia de la acuicultura en Guatemala	14
6.2	Principales patógenos en acuicultura	14
6.3	Tratamiento de infecciones bacterianas acuícolas con plantas medicinales	15
6.4	Las plantas del género <i>Lippia</i>	15
7	Estado del arte	19
8	Objetivos (generales y específicos aprobados en la propuesta)	20
	General	20
	Específicos	20
9	Hipótesis (si aplica)	20
10	Materiales y métodos	21

Colectas	21
Obtención de extractos etanólicos	21
Extracción de aceite esencial	21
Ensayos de actividad biológica	22
Evaluación de resultados	22
11 Resultados y discusión	23
11.1 Resultados	23
11.2 Discusión de resultados	27
12 Referencias	29
13 Apéndice.....	33
13.1 Fotografías de colecta en campo	33
13.1 Fotografías de obtención de extractos en laboratorio	35
13.1 Fotografías de ensayo antimicrobianos	36
14 Aspectos éticos y legales (si aplica)	37
15 Vinculación	37
16 Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual	37
17 Aporte de la propuesta de investigación a los ODS:	38
18 Orden de pago final (incluir únicamente al personal con contrato vigente)	39
19 Declaración del Coordinador(a) del proyecto de investigación	39
20 Aval del Director(a) del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario.....	39
21 Visado de la Dirección General de Investigación	40

Índice de tablas

Descripción	Página
Tabla 1	23
<i>Datos de campo de colectas de especies del género Lippia spp. en diferentes localidades de Guatemala.</i>	
Tabla 2	25
<i>Pesos y rendimientos de extractos etanólicos obtenidos de partes aéreas de especies del género Lippia de diferentes localidades de Guatemala.</i>	
Tabla 3	25
<i>Pesos y rendimientos de aceite esencial obtenidos de partes aéreas de especies del género Lippia de diferentes localidades de Guatemala.</i>	
Tabla 4	26
<i>Estadística descriptiva de actividad antibacteriana frente a Aeromonas hydrophila de extractos etanólicos y aceites esenciales de especies del género Lippia de diferentes localidades de Guatemala.</i>	

Índice de fotografías

Descripción	Página
Fotografía 1. a) Max Mérida seleccionando partes aéreas de <i>L. salamensis</i> en la Cumbre del Chol, Baja Verapaz. Fotografía por Francisco Pérez Sabino. b) Francisco Pérez Sabino colectando partes aéreas de <i>L. salamensis</i> en la Cumbre del Chol, Baja Verapaz.	33
Fotografía 2. a) Max Mérida colectando partes aéreas de <i>L. graveolens</i> en aldea El Subinal, Guastatoya, El Progreso b) Detalle de hojas y flores de <i>L. graveolens</i> .	34
Fotografía 3 . Partes aéreas de <i>L. chiapasensis</i> en aldea Patachaj, San Cristobal Totonicapán, Totonicapán.	34
Fotografía 4. a) Extracción simultanea de aceite esencial de hojas de <i>L. chiapasensis</i> en aparatos Clevenger. b) Aceite esencial obtenido de hojas de <i>L. chiapasensis</i> pesado y etiquetado.	35
Fotografía 5. a) Rotaevaporación de macerado etanólico 70% de hojas de <i>L. chiapasensis</i> de Totonicapán. b) Extractos desecados de hojas de <i>L. chiapasensis</i> de Totonicapán.	35
Fotografía 6. Cultivo y siembra de <i>Aeromonas hydrophila</i> en el Laboratorio de Sanidad Acuícola del CEMA.	36
Fotografía 7. a) Colocación del aceite esencial de <i>L. graveolens</i> sobre sensidiscos en blanco. b) Zonia Caravantes colocando los sensidiscos en las placas de agar de <i>A. hydrophila</i>	36
Figura 1 Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos y aceites esenciales de especies del género <i>Lippia</i> spp. frente a <i>Aeromonas hydrophila</i> .	27

2 Resumen y palabras claves

Los peces son susceptibles a diferentes infecciones bacterianas, principalmente cuando son criados en condiciones de alta densidad poblacional. Los brotes de enfermedades son responsables de elevadas tasas de mortalidad y disminución de la productividad, causando altas pérdidas económicas a los piscicultores. *Aeromonas hydrophila*, *A. liquifaciens*, *A. punctate*, *A. sorbia*, *Pseudomonas shigelloides*, *P. damsela*, *P. fluorescens*, *Edwardsiella tarda* y *Flexibacter columnaris* ocasionan el síndrome de la septicemia hemorrágica bacteriana (SHB) en tilapia, causando pérdidas económicas considerables en el sector de la acuicultura. Para evaluar el posible uso de plantas nativas de Guatemala como nutraceuticos en la prevención de enfermedades causadas por los patógenos mencionados, se determinó la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos y aceites esenciales de cuatro plantas del género *Lippia* (*L. chiapasensis*, *L. salamensis*, *L. dulcis* y *L. graveolens*) contra *A. hydrophila*. Así, material vegetal de las cuatro especies se colectó en diferentes departamentos de Guatemala durante el 2020. Se encontró que los extractos etanólicos de las cuatro plantas presentan efecto antibacteriano frente a *A. hydrophila* en un rango de 8.15 a 13.79 mm de diámetro de inhibición en ensayo de difusión en disco, siendo el extracto de *L. salamensis* el que mostró la mayor inhibición (8.68 a 13.79 mm). Entre los aceites esenciales, el aceite esencial de *L. graveolens* mostró el mayor efecto antibacteriano (28.3 a 30.12 mm), siendo su actividad comparable a la del control oxitetraciclina, mientras que el aceite esencial de *L. dulcis* no mostró efecto inhibitorio frente a *A. hydrophila*.

Palabras clave: Aceite esencial, extracto etanólico, *Lippia graveolens*, *Aeromonas hydrophila*.

Abstract and keywords

Fish are susceptible to different bacterial infections, mainly when they are raised in conditions of high population density. Disease outbreaks are responsible for high mortality rates and decreased productivity, causing economic losses to fish farmers. *Aeromonas hydrophila*, *A. liquifaciens*, *A. punctata*, *A. sorbia*, *Pseudomonas shigelloides*, *P. damsela*, *P. fluorescens*, *Edwardsiella tarda* and *Flexibacter columnaris* cause the syndrome of bacterial hemorrhagic septicemia (BHS) in tilapia, causing considerable economic losses in the aquaculture sector. To evaluate the possible use of native Guatemalan plants as nutraceuticals in the prevention of diseases caused by these pathogens, the antibacterial activity of the ethanolic extracts and essential oils of four plants of the genus *Lippia* (*L. chiapasensis*, *L. salamensis*, *L. dulcis* and *L. graveolens*) was assayed against *A. hydrophila*. Plant material of the four species was collected in different departments of Guatemala during 2020. It was found that the ethanolic extracts of the four plants have antibacterial effect against *A. hydrophila* in a range of 8.15 to 13.79 mm in inhibition diameter by the disk diffusion assay. The *L. salamensis* extract showed the highest inhibition (8.68 to 13.79 mm). The essential oil of *L. graveolens* was the oil that showed the greatest antibacterial effect (28.3 to 30.12 mm), an activity comparable to that of the oxytetracycline control, while the essential oil of *L. dulcis* did not show inhibitory effect against *A. hydrophila*.

Keywords: Ethanolic extract, essential oil, *Lippia graveolens*, *Aeromonas hydrophila*.

3 Introducción

El cultivo de especies acuícolas es un sector que ha experimentado enorme crecimiento en las últimas décadas, como forma de producción de alimentos. En Guatemala, dicha industria también ha observado un crecimiento importante (García, 2013). Sin embargo, este sector no se escapa a las pérdidas económicas ocasionadas por enfermedades provocadas por patógenos, por lo que el uso de antibióticos es común, siendo esta práctica una fuente de contaminación, además que provoca la generación de resistencia en los patógenos hacia los que se dirige y en otros no considerados como blanco.

Recientemente, se han realizado estudios sobre el uso de productos naturales provenientes de la flora, como posibles sustitutos de los antibióticos tradicionales, ya que varios de dichos compuestos son metabolitos secundarios que son producidos por las plantas para su defensa y han demostrado actividad antibacteriana ante patógenos humanos a lo largo de la historia. Es por esta razón que en el presente estudio se plantea la evaluación de la actividad biológica de metabolitos secundarios que se aislarán de seis plantas del género *Lippia* (*Lippia controversa*, *L. cardiostegia*, *L. chiapasensis*, *L. graveolens*, *L. dulcis* y *L. salamensis*), las cuales son plantas nativas de Guatemala y se encuentran en diferentes regiones geográficas (Pérez Sabino, 2008). Algunas de estas especies han demostrado actividad antibacteriana y antifúngica causantes de enfermedades en humanos (Gasquet et al., 1993; Abad, Sánchez, Bermejo, Villar & Carrasco; Portillo-Ruiz, Avila-Sola, Ramos, Torres & Nevárez-Moorillón, 2012; Slowing Barillas, 1992; Klueger, Daros, Silva, Farias & De Lima, 1997).

Los patógenos contra los que se ensayará la actividad biológica son *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas sobria* y *Aeromonas hydrophila*, los cuales han sido aislados en el Centro de Estudios del Mar y Acuicultura (CEMA), demostrándose que en cultivos de tilapia en diferentes departamentos de Guatemala, *A. hydrophila* es la bacteria patógena más común (Marroquín-Mora & García-Pérez, 2015).

El propósito es evaluar la actividad biológica de diferentes metabolitos que serán aislados de las plantas de estudio por técnicas cromatográficas preparativas, para generar información de

utilidad para la propuesta de nutraceuticos que puedan ser utilizados en la prevención de las enfermedades bacterianas en las diferentes especies que se cultivan en Guatemala. Para lo anterior, se colectará material vegetal de al menos dos poblaciones de cada planta de estudio, realizándose la preparación de la muestra y el aislamiento, por cromatografía de líquidos de alta resolución preparativa en la Escuela de Química de la Universidad de San Carlos, mientras que los ensayos de actividad biológica serán realizados en el CEMA. Los metabolitos secundarios aislados que presenten actividad biológica, serán identificados en el Instituto de Pesquisas de Productos Naturales, de la Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil.

Por esta razón, en el presente estudio se planteó la evaluación de la actividad biológica de los extractos que se obtuvieron de cuatro plantas del género *Lippia* (*L. chiapasensis*, *L. graveolens*, *L. dulcis* y *L. salamensis*), las cuales son especies nativas de Guatemala y se encuentran en diferentes regiones geográficas del país (Pérez et al., 2009; Pérez et al., 2017). Algunas de estas especies han demostrado actividad antibacteriana y antifúngica causantes de enfermedades en humanos (Gasquet et al., 1993; Abad et al., 1995; Portillo-Ruiz et al., 2012; Slowing Barillas, 1992; Klueger et al., 1997).

Se espera que, como producto, se obtenga información sobre los extractos de las especies de *Lippia* spp. responsables por la actividad biológica contra los tres patógenos a evaluar, para el posible desarrollo de productos nutraceuticos para la prevención de enfermedades en la acuicultura provocadas por patógenos, en sustitución de los antibióticos que se usan hoy en día. Así mismo, las nuevas capacidades en los centros de investigación participantes, deberán permitir la generación de valor agregado a los productos naturales de la flora nativa guatemalteca.

4 Planteamiento del problema

El problema al que se dirige la investigación planteada es la falta de alternativas amigables con el ambiente para combatir las enfermedades de especies acuícolas cultivadas en Guatemala causadas por patógenos y que ocasionan pérdidas en la acuicultura. Para el control de estas enfermedades se utilizan antibióticos que generan resistencia en los organismos blanco y actúan en otros a los que no van dirigidos y por otra parte, causan contaminación en el medio ambiente, dentro del marco de los contaminantes emergentes, que tienen efectos desconocidos en la biodiversidad acuática. Entre las bacterias que se encuentran con mayor frecuencia en los cultivos están *A. hydrophila*, *A. liquifaciens*, *A. punctate*, *A. sorbia*, *P. shigelloides*, *E. tarda*, *F. columnare*, *P. damsela*, *P. fluorescens* (Plumb y Hanson, 2010), siendo la más común en los cultivos de tilapia en Guatemala (Marroquín-Mora & García-Pérez, 2015).

Por otra parte, la flora de Guatemala cuenta con un enorme potencial de productos naturales con diferentes aplicaciones que no es aprovechado en forma sostenible y que inclusive se encuentra amenazada por el avance de las fronteras agrícola y urbana que están ocasionando pérdida en la biodiversidad del país. A través del conocimiento de las culturas originarias de Guatemala, se han investigado las propiedades farmacológicas de plantas nativas de Guatemala, varias de las cuales presentan actividad biológica importante contra patógenos humanos. A la fecha, a pesar que se han realizado investigaciones sobre la fitoquímica y actividad biológica de extractos de las plantas, no se ha llegado al nivel de aislar los metabolitos causantes de esa actividad, para su posible uso en el desarrollo de productos nutraceuticos.

Uno de los géneros de plantas que presentan este tipo de propiedades es el género *Lippia* spp., del cual se encuentran más de diez especies nativas en Guatemala, algunas de las cuales no se han investigado en los últimos años, debido a la pérdida de ecosistemas que sufre el país. Por esta razón, debe investigarse la fitoquímica de estas plantas, para promover su aprovechamiento sostenible en la generación de nuevos productos con valor agregado de aplicación en la salud y la industria y que puedan contribuir a generar alternativas de ingreso para las comunidades en regiones caracterizadas por la pobreza.

En el marco anterior se plantea la investigación de la actividad biológica de extractos de cuatro especies del género *Lippia* spp., para su posible aplicación en productos nutracéuticos para la prevención de enfermedades causadas por patógenos en la acuicultura, en sustitución de antibióticos tradicionales. A la vez que se generarán nuevas capacidades para la investigación de los productos naturales de Guatemala y nuevos conocimientos sobre la diversidad química de especies de la flora nativa de Guatemala.

5 Delimitación en tiempo y espacio

5.1 Delimitación en tiempo

El proyecto tuvo una duración de 10 meses, inició el 01 de febrero de 2020 y finalizó el 30 de noviembre de 2020.

5.2 Delimitación espacial

Las muestras de plantas fueron colectadas en los departamentos de Totonicapán, Guatemala, Baja Verapaz, El Progreso, Zacapa, Chiquimula.

Es bien sabido que el sector más grande de la economía de Guatemala es el de la agricultura. Sin embargo, la acuicultura representa una actividad económica que beneficia a alrededor de 155,000 familias guatemaltecas (CONAP, 2012). En Guatemala, la acuicultura se divide básicamente en dos cultivos, el del camarón marino (*Penaeus vannameii*) – de importancia industrial y único rubro de la acuicultura que se exporta- y el cultivo de la tilapia (*Oreochromis* spp.), por su importancia comercial para consumo interno (FAO, 2019).

6 Marco teórico

6.1 Importancia de la acuicultura en Guatemala

Es bien sabido que el sector más grande de la economía de Guatemala es el de la agricultura. Sin embargo, la acuicultura representa una actividad económica que beneficia a alrededor de 155,000 familias guatemaltecas (CONAP, 2012). En Guatemala, la acuicultura se divide básicamente en dos cultivos, el del camarón marino (*Penaeus vannameii*) – de importancia industrial y único rubro de la acuicultura que se exporta- y el cultivo de la tilapia (*Oreochromis spp.*), por su importancia comercial para consumo interno (FAO, 2019).

Las estadísticas revelan que la exportación de productos pesqueros de Guatemala para el año 2018, tuvo su mayor alcance en el mes de agosto con 5,843 toneladas exportadas por un valor de 29.34 millones de dólares. El año 2019 en cambio, tuvo su mayor alcance en el mes de mayo con 1,584 toneladas exportadas por un valor de 10.42 millones de dólares. Los mercados de exportación fueron España (48%), México (26%) y Estados Unidos (20%) para el año 2018, mientras que para el año 2019 los mercados de exportación fueron España (60%), Estados Unidos (16%) y México (9%) (Agexport, 2018; Agexport, 2019).

En Guatemala, la acuicultura se inició en el año 1954 con el Programa de Piscicultura Rural en colaboración con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) a través de la asistencia técnica del Dr. Shu Yen Lin (FAO, 2019). Se estima que Guatemala produce alrededor de 5,500 TM de productos pesqueros y los departamentos de mayor producción son Escuintla, Santa Rosa, Zacapa y Suchitepéquez (Marroquín-Mora & García-Pérez, 2015).

6.2 Principales patógenos en acuicultura

Peces y camarones son susceptibles de diferentes infecciones bacterianas, principalmente cuando son criados en condiciones de alta densidad. Los brotes de enfermedades son responsables de elevadas tasas de mortalidad y disminución en la eficiencia de la productividad,

causando altas pérdidas económicas a los piscicultores (Figueiredo et al., 2006; Hatha & Vivekanandhan, 2005; Immanuel et al., 2004).

Aeromonas hydrophila, *A. liquifaciens*, *A. punctate*, *A. sorbia*, *Pseudomonas shigelloides*, *P. damsela*, *P. fluorescens*, *Edwardsiella tarda* y *Flexibacter columnaris* ocasionan el síndrome de la septicemia hemorrágica bacteriana (SHB) en tilapias (Conroy, 2010; Plumb & Hanson, 2010), mientras que *Vibrio harveyi*, *V. splendidus* y *V. parahaemolyticus* infectan especies de camarón causando gastroenteritis por ingesta de mariscos en humanos (Immanuel et al., 2004; Sujeewa et al., 2009).

Investigadores del Centro de Estudios del Mar y Acuicultura – CEMA-, aislaron cepas de *A. hydrophila* en cultivos de tilapia en los departamentos de Escuintla, Quetzaltenango, Jutiapa, Sololá, Petén, Santa Rosa y Retalhuleu, evidenciando que es la bacteria patógena más común en cultivos de tilapias de Guatemala (Marroquín-Mora & García-Pérez, 2015).

6.3 Tratamiento de infecciones bacterianas acuícolas con plantas medicinales

La resistencia bacteriana contra los antibióticos en el campo de la pesca es causada principalmente por el amplio uso de antibióticos durante la última década, permitiendo la mutación de las bacterias para adaptarse contra los antibióticos (Masithoh et al., 2019).

El tratamiento de enfermedades bacterianas con diferentes plantas ha sido utilizado de manera segura en agricultura orgánica, veterinaria y medicina humana. El tratamiento con plantas medicinales con actividad antibacteriana es una alternativa potencialmente benéfica en acuicultura. Estas plantas mitigan muchos de los efectos secundarios los cuales son asociados a los antimicrobianos sintéticos (Sharma et al., 2012).

6.4 Las plantas del género *Lippia*

Pertenecientes a la familia Verbenaceae, las plantas del género *Lippia* se encuentran distribuidas ampliamente en regiones del centro y sur de América y en territorios de África tropical. El género incluye más de 200 especies de hierbas, arbustos y árboles pequeños

(Terblanché & Kornelius, 1996). La mayoría de las especies son utilizadas tradicionalmente como remedios respiratorios, gastrointestinales y como condimento de alimentos (Leitão, et al., 2019; Morton, 1981). Algunas especies de *Lippia* han demostrado actividades antimaláricas (Gasquet et al., 1993), antiviral (Abad et al., 1995), antifúngica (Portillo-Ruiz et al., 2012), citostática (López et al., 1979; Slowing Barillas, 1992; Klueger et al., 1997) y protección solar (Polonini et al., 2014).

6.4.1 Las plantas del género *Lippia* en Guatemala

Se reportan 13 especies del género *Lippia* para Guatemala, de las cuales, tres (*L. graveolens*, *L. dulcis* y *L. chiapasensis*) se usan tradicionalmente como remedios para el tratamiento de trastornos gastrointestinales y respiratorios y también se utilizan como condimentos en la preparación de comidas y bebidas (Standley et al., 1970; Cáceres, 1996; Mérida et al., 2012). Por su parte, los sesquiterpenos germacreno D (29.5%), β -cariofileno (15.4%) y sabineno (11.1%) fueron los principales compuestos identificados en el aceite esencial de *L. substrigosa* de Guatemala (Da Silva et al., 2010).

La presente propuesta propone la investigación de las especies *L. graveolens*, *L. dulcis*, *L. chiapasensis* y *L. salamensis* debido a su uso frecuente en la medicina tradicional guatemalteca y también atendiendo al hecho que se han realizado estudios que evidencian propiedades contra diferentes cepas de bacterias (Standley et al., 1970; Cáceres, 1996; Mérida et al., 2012; Pérez et al. 2017).

***Lippia chiapasensis* Loes.**

L. chiapasensis se distribuye en México y Guatemala. Se encuentra en matorrales o bosques húmedos, rocosos, frecuentemente en bosques de pino-encino, algunas veces en prados, entre los 1,500-3,000 msnm. En Guatemala se reporta para los departamentos de Baja Verapaz, Huehuetenango, San Marcos, Sololá y Totonicapán. Es un arbusto o árbol pequeño de 4 m de alto, hojas ovado-elípticas de 2-9 cm de largo, densamente pubescentes en el envés, con venación prominente, los márgenes crenados a serrados, las espigas florales de 8-9 mm de ancho,

corolas amarillas usualmente puberulentas en el ápice y dentro de la garganta floral (Standley *et al.*, 1970).

En cuanto a los estudios sobre composición del aceite esencial, Hernández-Arteseros *et al.* (2006), determinaron la presencia de geranial (10.1%), trans-dihidrocarvona (14.2%), neral (7.3%) y 1,8-cineol (7.2%) en aceite esencial de partes aéreas de *L. chiapasensis* de Guatemala. Mérida *et al.* (2012) determinaron la presencia de 1,8-cineol (7.3-31.2%), (*E*)-dihidrocarvona (1.4-33.3%), geranial (11.2-27.2%) y acetato de bornilo (2.1-21.6%) en el aceite esencial de *L. chiapasensis* colectada en diferentes departamentos de Guatemala. En cuanto a la determinación del contenido de flavonoides, Pérez *et al.* (2012) determinaron la presencia de verbascósido, ácido cinámico, flavona y flavonol en las partes aéreas de *L. chiapasensis* de dos localidades de Guatemala.

***Lippia dulcis* Trevir**

L. dulcis se distribuye desde el sur de México, Belice hasta Panamá y las Antillas. Se encuentra en matorrales húmedos y terrenos baldíos, riberas boscosas, orillas de estanques y en pastizales claros y abiertos desde el nivel del mar hasta los 1,800 msnm. En Guatemala se reporta para los departamentos de Alta Verapaz, Chiquimula, Guatemala, Petén, Retalhuleu, Sacatepéquez, Santa Rosa y Sololá. Es una planta perenne, erecta o decumbente, que no sobrepasa los 40 cm de alto, hojas rómbicas a ovadas de 1-6 cm de longitud, agudas o acuminadas, con los márgenes crenado-serrados, ásperas al tacto, pedúnculos solitarios en las axilas de las hojas, las espigas florales globosas, cáliz diminuto veloso, corola blanca, 1-1.5 mm de longitud (Standley *et al.*, 1970).

Compadre *et al.* (1987) aislaron la (+)-hernandulcina del extracto de éter de petróleo obtenido de las hojas y flores de *L. dulcis* de México. El extracto no mostró actividad mutagénica ni tóxica en ratones. Pérez *et al.* (2005) demostraron actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. dulcis* de México en la prueba del edema en pata de rata inducido por carragenina a dosis de 400 mg/kg. Souto-Bachiller *et al.* (1997) determinaron la presencia del sesquiterpenoide (+)-hernandulcina (36%) y de su epímero (-)-epi-hernandulcina (22%) como

los principales constituyentes en las partes aéreas de *L. dulcis* de Puerto Rico. Por su parte, Pérez *et al.* (2009) evidenciaron la presencia de 6-metil-5-hepten-2-ona (16.8%), 3-metil-2-ciclohexen-1-ona (13.3%) y hernandulcina (10.9%) en partes aéreas de *L. dulcis* de Guatemala.

***Lippia graveolens* Kunth**

L. graveolens es una especie que se distribuye desde el sur de Texas, México y Centroamérica. Se encuentra en pendientes rocosas o matorrales húmedos sobre llanuras, en los 350 msnm o menos. En Guatemala se encuentra en los departamentos de Petén, El Progreso y Zapaca (Cáceres, 1996; Standley *et al.*, 1970). Es un arbusto delgado de 2 m de alto, hojas en peciolo de usualmente de 5-10 mm de longitud, láminas foliares oblongas o elípticas de 2-4 cm de longitud, los márgenes finamente crenados, espigas florales oblongas de 4-12 mm de longitud, corolas blancas, el tubo estriguloso, de 3-6 mm de longitud. Las hojas aromáticas, sean frescas o secas, son utilizadas en Centroamérica para saborizar la comida, y las hojas secas son vendidas en los mercados (Standley *et al.*, 1970).

Los hallazgos en cuanto a composición química de *L. graveolens* se han enfocado principalmente en la determinación de la composición de aceites esenciales y flavonoides de las hojas de la especie. Pérez Sabino *et al.* (2012) discriminaron satisfactoriamente tres quimiotipos (timol, carvacrol y mixto) en aceite esencial de hojas de *L. graveolens* de Guatemala por medio de la técnica de microextracción en fase sólida y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Fisher *et al.* (1997), por su parte, determinaron la presencia de timol (80.6%) y carvacrol (45.2%) en *L. graveolens* de Guatemala. En cuanto a la composición de metabolitos no volátiles, Lin *et al.* 2007 identificaron 23 flavonoides en extracto metanólico de *L. graveolens*. La planta presenta también saponinas, taninos, triterpenos (Cáceres, 1996), iridoides y secoiridoides (Rastrelli *et al.*, 1998).

***Lippia salamensis* Loes.**

L. salamensis es una especie que se ha reportado únicamente para los departamentos de Baja Verapaz y Jalapa en bosques de encino y laderas húmedas o secas alrededor de los 1,600 msnm. Es un arbusto delgado de 2 m de alto, hojas gruesas, con peciolo cortos, la lámina foliar ovada-

oblonga, de 2-10 cm de longitud, redondeada o aguda en el ápice con márgenes crenado-serrulados, las espigas florales subglobosas, de 5-7 mm de longitud en floración y 7 mm de ancho, cáliz de 2-2.4 mm de longitud, corola blanca, puberulenta (Standley *et al.*, 1970).

Pérez *et al.* (2017) determinaron la presencia de 1,8-cineol (14.3%), o-cimeno (6.8%) y borneol (6.2%) en el aceite esencial de partes aéreas de *L. salamensis* colectada en una localidad de Baja Verapaz. La actividad antibacteriana de este aceite también fue evaluada, mostrando actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* en el método de difusión en agar con halos de inhibición de 15 y 22 mm respectivamente.

7 Estado del arte

Estudios recientes evidencian propiedad antibacteriana de extractos de diferentes especies vegetales. El extracto de acetato de etilo de las hojas de *Azadirachta indica* evidenció actividad antimicrobiana contra el patógeno acuícola *A. hydrophila* aislado de *Dawkinsia filamentosa* mostrando halo de inhibición de 19 mm en la prueba de difusión en agar (Kavitha, et al., 2017).

El extracto de la hoja de *Momordica charantia* presentó actividad antibacteriana contra *A. hydrophila* en la categoría intermedia de resistencia (Masithoh et al., 2019). En Guatemala, investigadores del Centro de Estudios del Mar y Acuicultura – CEMA-, evaluaron el efecto antimicrobiano de seis extractos de plantas medicinales frente a cepas de bacterias patógenas aisladas de cultivos de tilapia de los departamentos de Escuintla, Quetzaltenango, Jutiapa, Sololá, Petén, Santa Rosa y Retalhuleu. De los extractos evaluados, el extracto de *Lippia graveolens* fue el que presentó mejor actividad antibacteriana, inhibiendo todas las cepas aisladas, seguido del extracto de *Syzygium aromaticum* que inhibió 6 cepas bacterianas. También, los extractos de *Pimenta dioica* y *Rosmarinus officinalis* inhibieron 5 y 3 cepas bacterianas respectivamente (Marroquín-Mora & García-Pérez, 2015).

A pesar de los hallazgos antibacterianos de estas investigaciones, es importante notar que todas se trabajaron con los extractos crudos de las plantas que se investigaron. El objetivo de la presente propuesta es determinar la propiedad antibacteriana de los extractos de cuatro plantas del género

Lippia spp. de Guatemala contra patógenos acuícolas, con el fin de determinar a qué tipo de extracto se debe la acción antibacterana de cada especie vegetal.

8 Objetivos (generales y específicos aprobados en la propuesta)

General

Evaluar la actividad biológica de fracciones preparativas de cuatro plantas del género *Lippia* nativas de Guatemala, contra tres microorganismos patógenos acuícolas, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas sobria* y *Aeromonas hydrophila*.

Específicos

1. Aislar a escala preparativa metabolitos secundarios de extractos de las cuatro plantas de estudio en fracciones preparativas.
2. Determinar el tipo y la concentración de los principales metabolitos secundarios en las fracciones preparativas con actividad biológica contra microorganismos patógenos de peces.
3. Determinar la actividad biológica de los extractos crudos y de las fracciones preparativas de las cuatro plantas de estudio contra tres microorganismos patógenos de peces.
4. Determinar la actividad antioxidante de los extractos crudos y de las fracciones preparativas de las cuatro plantas de estudio.

9 Hipótesis (si aplica)

Al menos uno de los extractos obtenidos de cada una de las cuatro plantas de estudio del género *Lippia* spp. presenta actividad biológica cuantificable contra el microorganismo patógeno acuícola *Aeromonas hydrophila*.

10 Materiales y métodos

Colectas

Se colectaron partes aéreas de *L. chiapasensis*, *L. graveolens* y *L. salamensis*, entre marzo y octubre de 2020 de poblaciones silvestres en los departamentos de Totonicapán, Baja Verapaz, El Progreso, Zacapa, Chiquimula y Guatemala. Se seleccionaron diferentes individuos de cada especie al azar en sus medios silvestres. El material vegetal colectado se secó en un secador solar a temperatura entre 28 y 32 °C y luego fue pulverizado en un molino. Por su parte, *L. dulcis* fue adquirida seca y fragmentada por la empresa Quimiprova, debido a la dificultad de colectar la especie en el campo, dadas las limitaciones ocasionadas por la pandemia por COVID-19.

Obtención de extractos etanólicos

Dos porciones de 50 g de material vegetal seco de cada una de las cuatro especies de estudio fueron sometidas a maceración por 48 horas con tres porciones consecutivas de 500 mL de etanol al 70% dentro de frascos de vidrio ámbar. Los macerados fueron posteriormente filtrados y luego evaporados en rotavapor. Se pesaron los extractos obtenidos para calcular rendimiento y luego se trasvasaron a viales para centrífuga de fondo cónico de 1 mL debidamente rotulados y almacenados en refrigeración para posteriores ensayos de actividad antibacteriana.

Extracción de aceite esencial

Los aceites esenciales de las plantas de estudio fueron extraídos utilizando 40.0 g de cada especie, por medio de hidrodestilación en un aparato tipo Clevenger durante 2 h y se recuperaron en pentano. Después de la extracción, el pentano se eliminó en un rotavapor a 40 °C y los aceites se pesaron en una balanza analítica para determinar el rendimiento de extracción.

Ensayos de actividad biológica

Para la determinación de la actividad antibacteriana del aceite esencial y el extracto etanólico 70% de las distintas especies del género *Lippia* spp. seleccionadas, se utilizó una modificación de la técnica de difusión en disco descrita por Alderman y Smith (2001). Para ello se utilizó cultivos puros de *Aeromonas hydrophila* (AH) en concentración bacteriana de 10^8 UFC/mL. Los cultivos bacterianos fueron lavados individualmente con solución salina 0.85%, para remover productos extracelulares, posterior, se inocularon 100 μ l de la solución bacteriana preparada y se esparció en la superficie del agar Mueller Hinton (MHA: Merck) de manera uniforme. Se procedió a dejar a temperatura ambiente durante 5 minutos para que la suspensión bacteriana fuera absorbida por el agar.

Posteriormente, se colocaron 10 μ l de aceite esencial (EOS) y 40 mg de extracto etanólico (ET) de cada especie de *Lippia* spp. de forma individual, en disco en blanco para pruebas de sensibilidad (BBL[®]). Los discos fueron colocados equidistantes en la placa de agar con la bacteria a evaluar.

Las placas de agar sembradas fueron incubadas durante un periodo de 24 - 48 horas a 28.0 ± 1.0 °C. Finalizado el tiempo de incubación se evaluó visualmente el crecimiento bacteriano alrededor de los discos con los productos naturales de las plantas de estudio. El diámetro de inhibición bacteriano fue medido en (mm) en ángulos opuestos, y se determinó como el promedio de todas las mediciones de las réplicas. Se utilizó como control positivo oxitetraciclina (OXI) el cual es el antibiótico de mayor uso en la acuicultura y como control negativo se utilizó metanol.

Evaluación de resultados

Se elaboraron tablas y gráficas con las concentraciones y rendimientos de los extractos etanólicos y aceites esenciales obtenidos.

11 Resultados y discusión

11.1 Resultados

11.1.1 Colecta de especies del género *Lippia* spp. de diferentes regiones del interior de Guatemala

Se detalla la información de campo colectas de especies del género *Lippia* spp. en sitios del interior de Guatemala, con excepción de la especie *L. dulcis*, la cual fue adquirida por la empresa Quimiprova (Tabla 1).

Tabla 1

Datos de campo de colectas de especies del género Lippia spp. en diferentes localidades de Guatemala.

Especie	Localidad de colecta	Código	Coordenadas geográficas/ Altitud	Fecha de colecta	Estado fenológico
<i>Lippia chiapasensis</i> Loes.	Aldea Patachaj, San Cristóbal Totonicapán, Totonicapán	LC	N 14° 55' 40.9" O 091° 27' 14.1" 2,572 msnm	Marzo 2020	Fructificación
<i>Lippia salamensis</i> Loes.	Universidad de San Carlos de Guatemala, Campus central, zona 12	LS	N 14° 35' 07.2" O 090° 33' 11.4" 1,492 msnm	Junio 2020	Frutificación
<i>Lippia salamensis</i> Loes.	Universidad de San Carlos de Guatemala, Campus central, zona 12	LS1	N 14° 35' 07.2" O 090° 33' 11.4" 1,492 msnm	Agosto 2020	Fructificación
<i>Lippia dulcis</i> Trevir.	Quimiprova, 6 ^a avenida 22-47 zona 12, ciudad de Guatemala	LD	--	Septiembre 2020	Fructificación
<i>Lippia salamensis</i> Loes.	Cumbre de El Chol, Baja Verapaz	LS2	N 14° 58' 57.7" O 090° 28' 18.0"	Octubre 2020	Vegetativo

Informe final proyecto de investigación 2022

Dirección General de Investigación –DIGI-

				1,374 msnm		
<i>Lippia salamensis</i> Loes.	Rabinal, Baja Verapaz	LS3	N 15° 02' 28.6" O 090° 29' 09.4"	1,362 msnm	Octubre 2020	Vegetativo
<i>Lippia graveolens</i> Kunth	Aldea Subinal, Guastatoya, Progreso	El LGM	N 14° 51' 20.7" O 090° 08' 01.0"	514 msnm	Octubre 2020	Floración
<i>Lippia graveolens</i> Kunth	Aldea Carrizal, Jacinto, Chiquimula	El LGC	N 14° 37' 18.0" O 089° 28' 58.0"	700 msnm	Octubre 2020	Floración
<i>Lippia dulcis</i> Trevir.	Aldea Antonio Socorro, Malacatán, San Marcos	San El LD1	N 14° 52' 09.4" O 092° 06' 26.6"	222 msnm	Octubre 2020	Floración
<i>Lippia chiapasensis</i> Loes.	Aldea Patachaj, San Cristóbal Totonicapán, Totonicapán	LC1	N 14° 55' 28.6" O 091° 26' 54.8"	2,432 msnm	Octubre 2020	Fructificación
<i>Lippia graveolens</i> Kunth	Carretera Interamericana, km 93.5, San Agustín Acasaguastlán, El Progreso	LGT	N 14° 55' 34.8" O 089° 56' 48.6"	278 msnm	Noviembre 2020	Fructificación
<i>Lippia graveolens</i> Kunth	Aldea La Tuna, Ipala, Chiquimula	LGC1	N 14° 55' 34.8" O 089° 56' 48.6"	278 msnm	Noviembre 2020	Fructificación
<i>Lippia graveolens</i> Kunth	Aldea Casas de Pinto, Río Hondo, Zacapa	LGT1	N 15° 01' 25.4" O 089° 36' 35.6"	180 msnm	Diciembre 2020	Floración
<i>Lippia dulcis</i> Trevir.	Universidad de San Carlos de Guatemala, Campus central, zona 12	LD2	N 14° 35' 03.9" O 090° 33' 12.9"	1,489 msnm	Diciembre 2020	Vegetativo

11.1.2 Rendimientos de extractos etanólicos de especies del género *Lippia* spp. de regiones del interior de Guatemala

Se presentan los resultados de pesos y rendimientos de extractos etanólicos obtenidos de las partes aéreas de especies del género *Lippia* spp. de diferentes localidades del interior de Guatemala (Tabla 2).

Tabla 2

Pesos y rendimientos de extractos etanólicos obtenidos de partes aéreas de especies del género Lippia de diferentes localidades de Guatemala.

Código	Peso materia vegetal seca (g)	Número de extracciones	Peso del extracto (g)	Rendimiento (%)
LC	100	6	31.62	31.62
LD	100	6	14.64	14.64
LS	100	6	11.21	11.21

11.1.3 Rendimientos de aceite esencial obtenidos de especies del género *Lippia* spp. de regiones del interior de Guatemala

Tabla 3

Pesos y rendimientos de aceite esencial obtenidos de partes aéreas de especies del género Lippia de diferentes localidades de Guatemala.

Código	Peso materia vegetal seca (g)	Número de extracciones	Peso del aceite esencial (g)	Media del rendimiento (desviación estándar)
LC	47.95	2	0.22	0.47 (0.01)
LD	710.00	8	0.25	0.03 (0.01)
LS	257.29	4	3.01	1.44 (1.56)
LGC	80.00	2	1.56	1.95 (0.21)
LGT	40.00	1	0.27	0.67 (0.00)
LS3	80.00	1	1.33	1.66 (0.00)

11.1.4 Resultados de actividad antibacteriana de extractos de plantas del género *Lippia* spp. frente a *Aeromonas hydrophila*

Se presenta los resultados de estadística descriptiva de la actividad antibacteriana frente a *Aeromonas hydrophila* de los extractos etanólicos y aceites esenciales obtenidos de plantas del género *Lippia* spp. de diferentes localidades del interior de Guatemala (Tabla 4, Figura 1).

Tabla 4

Estadística descriptiva de actividad antibacteriana frente a Aeromonas hydrophila de extractos etanólicos y aceites esenciales de especies del género Lippia de diferentes localidades de Guatemala.

PLANTA	EXTRACTO	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx	Mediana	P(95)
CNT	OXI	Y	3	23.81	0.86	23.21	24.79	23.43	24.79
LC	EOS	Y	4	7.36	0.58	6.59	7.80	7.52	7.80
LC	ET	Y	6	11.28	3.50	8.15	17.91	10.72	17.91
LD	EOS	Y	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
LD	ET	Y	6	11.19	0.87	9.62	11.94	11.37	11.94
LGT	EOS	Y	3	28.98	1.00	28.23	30.12	28.59	30.12
LS	EOS	Y	3	6.27	0.49	5.75	6.73	6.33	6.73
LS	ET	Y	6	11.78	1.77	8.68	13.79	12.03	13.79

CNT: control; OXI: oxitetraciclina; ET: extracto etanólico 70%; EOS: aceite esencial.

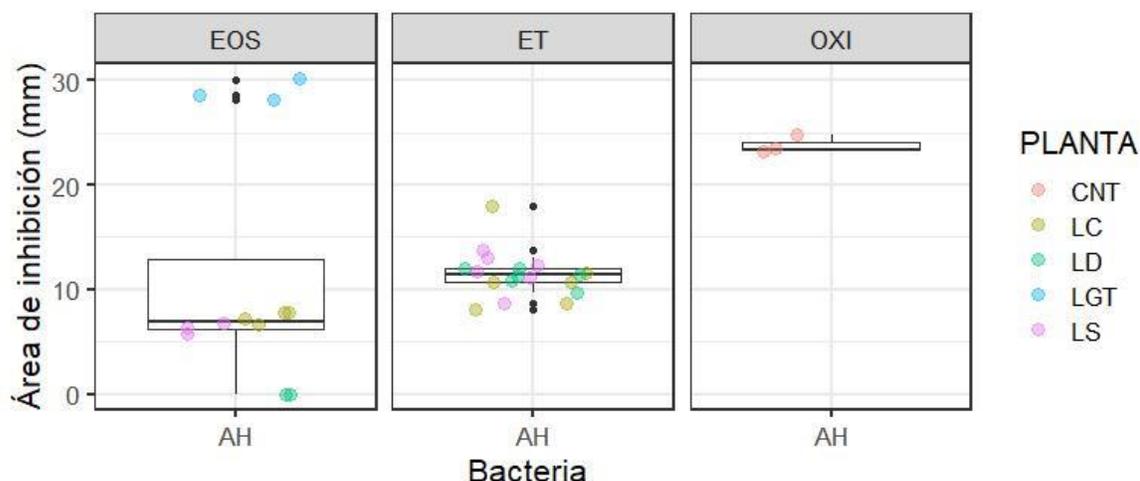


Figura 1

Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos y aceites esenciales de especies del género *Lippia* spp. frente a *Aeromonas hydrophila*.

11.2 Discusión de resultados

11.2.1 Rendimientos de extractos etanólicos y aceites esenciales obtenidos de plantas del género *Lippia* spp.

Se aprecian los resultados obtenidos de la extracción del material vegetal seco de especies de *Lippia* spp. con etanol al 70%. El mayor rendimiento de extracción se obtuvo para *L. chiapasensis*, con 13.62%, superior a *L. dulcis* para la que se obtuvo un rendimiento de extracción de 14.64% y a *L. salamensis* para la que se obtuvo un rendimiento de 11.21% (Tabla 2). En cuanto al aceite esencial, puede observarse en la que el mayor rendimiento de extracción se obtuvo para *L. graveolens* colectado en la aldea El Carrizal (LGC) con 1.95%, seguido por *L. salamensis* colectada en Rabinal, Baja Verapaz (LS3) con 1.66% y por *L. salamensis* colectada en el campus de la Universidad de San Carlos, con 1.44%. El menor rendimiento de extracción de aceite esencial de las plantas de estudio se observó para *L. dulcis*, con 0.03% (Tabla 3).

11.2.2 Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos y aceites esenciales de especies de *Lippia* spp. frente a *Aeromonas hydrophila*.

Tanto los extractos etanólicos de tres plantas (*L. chiapasensis*, *L. dulcis* y *L. salamensis*) como los aceites esenciales de tres de las cuatro plantas de estudio, con excepción del aceite esencial de *L. dulcis*, mostraron actividad inhibitoria contra *A. hydrophila*. En el caso de las tres plantas de estudio para las que se obtuvieron extractos etanólicos (*L. chiapasensis*, *L. dulcis* y *L. salamensis*), el extracto etanólico mostró mayor efecto inhibitorio, con diámetros de inhibición bacteriana entre 11.18 y 11.78 mm.

Entre los extractos etanólicos, fue el de *L. salamensis* el que presentó mayor diámetro de inhibición promedio contra *A. hydrophylla* (11.78 mm), sin embargo, ya que el extracto de *L. chiapasensis* presentó un diámetro de inhibición medio de 11.28 mm, y el mayor rendimiento de extracción (31.62%) entre las plantas de estudio, doblando por lo menos el rendimiento de las otras dos especies, puede considerarse como la especie con el extracto más promisorio para su utilización en acuicultura. Debe considerarse el fraccionamiento cromatográfico de los extractos etanólicos de las plantas de estudio para separar los metabolitos que puedan presentar la actividad antibacteriana. Para *L. dulcis*, cuyo rendimiento de aceite esencial fue bajo (0.03%), es importante considerar que el extracto etanólico presentó actividad antibacteriana similar a los extractos etanólicos de *L. salamensis* y *L. chiapasensis*. De esta forma, para *L. dulcis*, es el extracto etanólico el que presenta potencial de uso como nutraceutico y no su aceite esencial, ya que no presentó actividad contra *A. hydrophylla*. No fue obtenido el extracto etanólico de *L. graveolens*, por lo que no pudo determinarse la actividad antibacteriana que puede presentar.

En el caso de los aceites esenciales, el aceite de *L. graveolens* colectado en San Agustín Acasaguastlán, El Progreso, presentó la mayor actividad frente a *A. hidrophyla*, con un diámetro medio de inhibición bacteriana de 28.98 mm, que cuatriplica el diámetro medio de los aceites de *L. salamensis* y *L. chiapasensis*. Son conocidas las propiedades antibacterianas de los compuestos fenólicos como el timol, principal componente del aceite esencial de *L. graveolens* procedente de San Agustín Acasaguastlán (Pérez et al., 2012), por lo que la actividad de este aceite contra *A. hidrophyla*,

puede atribuirse a este compuesto. En el caso del aceite esencial de *L. dulcis* y *L. salamensis* de Guatemala, no se han encontrado fenoles en su composición en estudios previos (Pérez et al., 2007; Pérez et al., 2017). El efecto inhibitorio y el alto rendimiento de extracción mostrados por el aceite esencial de *L. graveolens*, posicionan a este aceite como el más promisorio para su uso en acuicultura. Deben completarse los ensayos con los otros aceites obtenidos en el estudio, así como establecer su composición química, para poder establecer si los diferentes quimiotipos de *L. graveolens* presentan diferencias de actividad antibacteriana. En comparación con el uso de antibióticos de uso comercial en acuicultura y los diversos productos de *Lippia* spp., se observa que no existe diferencia significativa cuando se compara con el aceite esencial de *L. graveolens*, lo que indica que ambos poseen el mismo efecto antimicrobiano.

De esta forma en el presente estudio se estableció que el extracto etanólico de *L. chiapasensis* y *L. salamensis*, y el aceite esencial de *L. graveolens* presentan potencial para su uso como nutraceuticos en la prevención de enfermedades producidas por patógenos en la acuicultura guatemalteca.

12 Referencias

- Abad, M.J., Sánchez, S., Bermejo, P., Villar, A., & Carrasco, L. (1995). Antiviral activity of some medicinal plants. *Methods and Findings* 17 (Suppl. A), 108.
- Agexport. (2018). Acuicultura y pesca. Recuperado de <http://acuiculturaypescaenguatemala.com/estadisticas-2018/>
- Agexport. (2019). Acuicultura y pesca. Recuperado de <http://acuiculturaypescaenguatemala.com/estadisticas-2019/>
- Cáceres, A. (1996). Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria.
- Compadre, C.M., Hussain, R.A., Lopez de Compadre, L., Pezzuto, J.M., & Kinghorn, A.D. (1987). The intensely sweet sesquiterpene hernandulcin: Isolation, synthesis, characterization, and preliminary safety evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35, 273-279.
- CONAP. (2012). Guatemala y su biodiversidad: Un enfoque histórico, cultural, biológico y económico. Consejo Nacional de Áreas Protegidas. Oficina Técnica de la Biodiversidad. Editorial Serviprensa: Guatemala.

- Conroy. (2010). Principales enfermedades en Tilapia. Recuperado de <http://es.slideshare.net/guestbf1ae6/enfermedades-tilapias>
- FAO. (2019). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Departamento de Pesca y Acuicultura. Recuperado de http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_guatemala/es
- Figueiredo, H.C.P., Carneiro, D.O., Faria, F.C., & Costa, G.M. (2006). *Streptococcus agalactiae* asociado a meningoencefalite e infecção sistêmica em tilapia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58, 678-680.
- Fisher, U., Franz, Ch., Lopez, R., & Pöll, E. (1997). Variability of the essential oils of *Lippia graveolens* H.B.K. from Guatemala. Proceedings of 27th International Symposium on Essential Oils. Edits., Ch. Franz, A. Mathé and G. Buchbauer. Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL, 266-269.
- Hatha, M., Vivekanandhan, A.A. (2005). Christol. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. *International Journal of Food Microbiology*, 98, 131-134.
- Gasquet, M., Delmas, F., Timón-David, P., Keita, A., Guindo, M., Koita, N.,... Doumbo, O. (1993). Evaluation in vitro and in vivo of a traditional antimalarial, 'Malarial-5'. *Fitoterapia*, 64, 423-426.
- Immanuel, G., Vincybai, V.C., Sivaram, V., Palavesam, A., & Marian, M.P. (2004). Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. *Aquaculture*, 236, 53-65.
- Jayes, P., Pérez, F., de León, J.L., Farfán, C., & Mérida, M. (2006). Aceites esenciales de nueve plantas nativas de Guatemala, familias Verbenaceae y Lauraceae (Informe final). Dirección General de Investigación, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Kavitha, M., Raja M., Kamaraj, C., Karthik Raja, R., Balasubramaniam, V., Balasubramani, G., & Perumal, P. (2017). In vitro antimicrobial activity of *Azadirachta indica* (leaves) against fish pathogenic bacteria isolated from naturally infected *Dawkinsia filamentosa* (blackspot barb). *Medicinal & Aromatic Plants*, 6 (3), 1-7. doi: 10.4172/2167-0412.1000294
- Klueger, P.A., Daros, M.R., Silva, R.M., Farias, M.R., De Lima, T.C.M. (1997). Neuropharmacological evaluation of crude and semipurified extracts from *Lippia alba* Will. N.E Br.

- (Verbenaceae). Abstracts. International Joint Symposium. Chemistry. *Biological and Pharmacological Properties of Medicinal Plants from the Americas*. Poster Session, 2, B23.
- Lin, L. Z., Mukhopadhyay, S., Robbins, R. J., & Harnly, J.M. (2007). Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 361-369.
- López, A.A.M., Rojas, H.N.M., Jiménez, M.C.A., (1979). Plants extracts with cytostatic properties growing in Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 31, 105-111.
- Marroquín-Mora, D.C., & García-Pérez, J.R. (2015). Evaluación in vitro de extractos de plantas medicinales y probióticos como posibles agentes antimicrobianos para el control de las infecciones bacterianas más comunes en tilapia *Oreochromis* spp. (Informe final). Dirección General de Investigación, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Masithoh, D.A., Kusdarwati, R., & Handijatno. (2019). Antibacterial activity of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf extract against *Aeromonas hydrophila*. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 236. doi:10.1088/1755-1315/236/1/012096
- Mérida, M., Cáceres, A., Pérez, F., & Navas, P. (2012). Composition and yield of essential oil from *Lippia chiapasensis* growing wild in the highlands of Guatemala. *Acta Horticulturae*, 964, 65-70.
- Morton, J. (1981). Atlas of medicinal plants of middle America. Springfield:USA, 1, 745-750.
- Pérez Sabino, J.F., Farfán Barrera, C.D., Mérida Reyes, M., Cáceres, A., Cruz, S., da Silva, J.R. (2009). Composition of the essential oil of *Phyla dulcis* of Guatemala by GC-MS. Book of Abstracts of 40th International Symposium on Essential Oils (ISEO), 6-9 September 2009, Savigliano, Italy. Bicchi, C., & Rubiolo, P., Editors.
- Pérez Sabino, J.F., Mérida Reyes, M., da Silva, A.J. (2010) Chemical composition of the essential oil of *Lippia substrigosa* Turcz. growing wild in Guatemala. *Journal of Essential Oils Research*, 22, 107-108.
- Pérez Sabino, J. F., Farfán Barrera, C., Oliva Hernández, B.E., Jayes Reyes, P. G., Mérida Reyes, M.S., & Muñoz Wug, M. (2012). Determinación de los flavonoides en seis plantas del género *Lippia* (Verbenaceae) nativas de Guatemala como posibles fuentes de nutraceuticos (Informe final). Dirección General de Investigación, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

- Pérez Sabino, J. F., Mérida Reyes, M., & Farfán Barrera, C. D. (2012). Análise e discriminação de quimiotipos de *Lippia graveolens* H.B.K. da Guatemala por microextração em fase sólida, CG-EM e análise multivariada. *Quimica Nova*, 35(1), 97-101.
- Pérez Sabino, F.P., Muñoz, M., Mérida, M., Oliva, B., Taracena, E., Gaitán, I.,... Ribeiro da Silva, A. (2017). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia salamensis* Loes. from Guatemala. Book of Abstracts of 48th International Symposium on Essential Oils, 10-13 September 2017, Pécs, Hungary. Horváth, G., President of the ISEO 2017 Local Organising Committee. OOK-Press Ltd., Veszprém, Hungary, 167.
- Pérez-Sabino, J.F., Mérida-Reyes, M.S., Muñoz-Wug, M.A., Oliva-Hernández, B.E., Orozco-Chilel, R.M., García-Pérez, J.E., Caravantes-Alvarado, Z. (2021). Biological activity of the ethanolic extracts and essential oils of four species of the genus *Lippia* from Guatemala, against the aquaculture pathogen *Aeromonas hydrophyla*. *Planta Medica*, 87, 1263.
- Plumb & Hanson, (2010). *Health Maintenance and Principal Microbial Diseases of Cultured Fishes*. (3rd Edition). Iowa, United States of America: Wiley-Blackwell.
- Poloni, H.C., Brandão, M.A.F., & Raposo, N.R.B. (2014). A natural broad-spectrum sunscreen formulated from the dried extract of Brazilian *Lippia sericea* as a single UV filter. *RSC Advances*, 4, 62,566-62,575. doi: 10.1039/c4ra11577e
- Portillo-Ruiz, M.C., Avila-Sosa, R., Viramontes Ramos, S., Torres Muñoz, J.V., & Nevárez-Moorillón, G.V. (2012). Antifungal effect of mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil on a wheat flour-based medium. *Journal of Food Science*, 77(8), 441-445. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02821.x
- Rastrelli, L., Cáceres, A., Morales, C., De Simone, F., Aquino, R. (1998). Iridoids from *Lippia graveolens*. *Phytochemistry*, 49, 1829-1832.
- Sharma, M., Mandloi, A.K., Pandey, G., & Sahni, Y.P. (2012). Antimicrobial activity of some medicinal plants against fish pathogens. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(4), 28-30.
- Slowing Barillas, K.V. (1992). Estudio de la actividad antiinflamatoria de diversas especies de la Flora de Guatemala. Facultad de Farmacia. Memoria Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Standley, P., Williams, L., & Gibson, D. (1970). Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(9), 208-213.

Sujeewa, A.K.W., Abdullah Sani, N., & Laina, M. (2009). Prevalence of toxic genes of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimps (*Penaeus monodon*) and culture environment. *International Food Research Journal*, 16(1)

Terblanché, F.C., & Kornelius, G. (1996). Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) – A literatura review. *Journal of Essential Oil Research*, 8, 471-485.

13 Apéndice

13.1 Fotografías de colecta en campo



Fotografía 1. a) Max Mérida seleccionando partes aéreas de *L. salamensis* en la Cumbre del Chol, Baja Verapaz. Fotografía por Francisco Pérez Sabino. b) Francisco Pérez Sabino colectando partes aéreas de *L. salamensis* en la Cumbre del Chol, Baja Verapaz. Fotografía por Max Mérida.



Fotografía 2. a) Max Mérida colectando partes aéreas de *L. graveolens* en aldea El Subinal, Guastatoya, El Progreso b) Detalle de hojas y flores de *L. graveolens*. Fotografías por Rodolfo Orozco

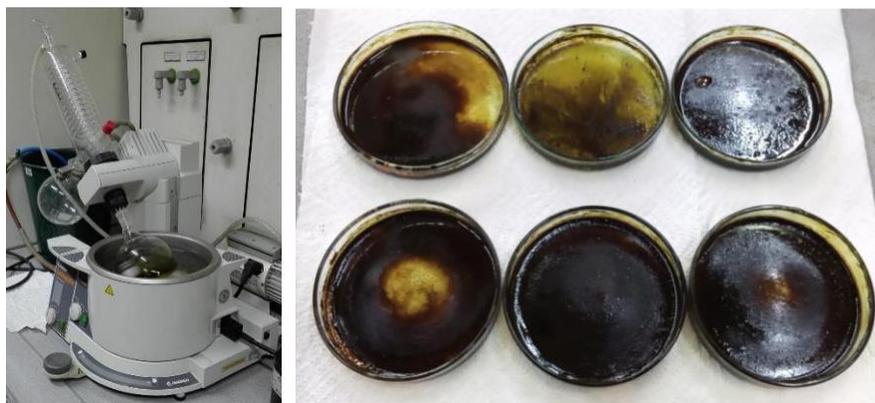


Fotografía 3 . Partes aéreas de *L. chiapasensis* en aldea Patachaj, San Cristobal Tonicapán, Tonicapán. Fotografía por Max Mérida

13.1 Fotografías de obtención de extractos en laboratorio

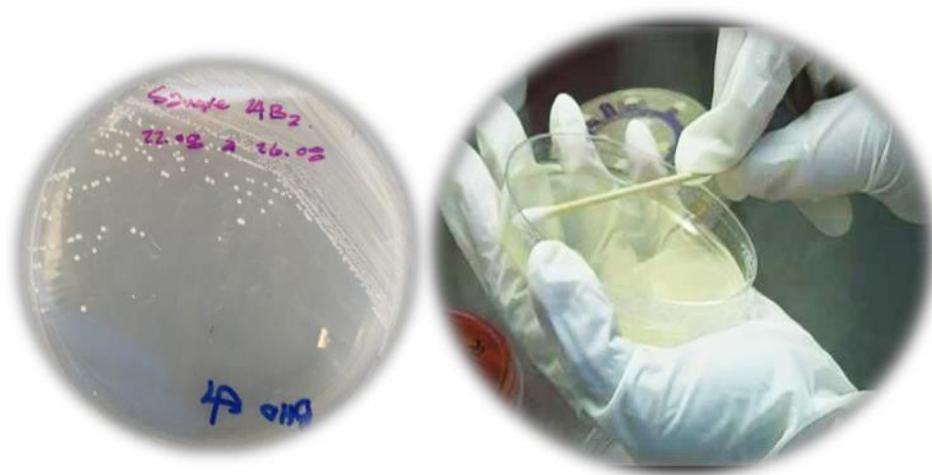


Fotografía 4. a) Extracción simultánea de aceite esencial de hojas de *L. chiapasensis* en aparatos Clevenger. b) Aceite esencial obtenido de hojas de *L. chiapasensis* pesado y etiquetado. Fotografías por Max Mérida.



Fotografía 5. a) Rotaevaporación de macerado etanólico 70% de hojas de *L. chiapasensis* de Tonicapán. b) Extractos desecados de hojas de *L. chiapasensis* de Tonicapán. Fotografías por Max Mérida.

13.1 Fotografías de ensayo antimicrobianos



Fotografía 6. Cultivo y siembra de *Aeromonas hydrophila* en el Laboratorio de Sanidad Acuícola del CEMA. Fotografías por Zonia Caravantes Alvarado



Fotografía 7. a) Colocación del aceite esencial de *L. graveolens* sobre sensidiscos en blanco. b) Zonia Caravantes colocando los sensidiscos en las placas de agar de *A. hydrophila* Fotografías por Rodolfo Orozco

14 Aspectos éticos y legales (si aplica)

Se tramitó y obtuvo las licencias de colecta y de investigación del Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP), para la investigación de especies del género *Lippia* spp. de Guatemala.

15 Vinculación

La unidad de investigación proponente ha mantenido los vínculos académicos con el Instituto de Pesquisas Naturales de Universidad Federal de Río de Janeiro específicamente con el apoyo para la determinación de compuestos químicos de extractos de plantas nativas de Guatemala.

16 Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual

Los resultados de esta investigación se presentaron en la conferencia virtual de la GA - 69th Annual Meeting llevada a cabo con la ciudad de Bonn, Alemania del 5 al 8 de septiembre de 2021 y también fueron publicados en el número 87 de la revista *Planta Medica* con el título “Biological activity of the ethanolic extracts and essential oils of four species of the genus *Lippia* from Guatemala, against the aquaculture pathogen *Aeromonas hydrophyla*”

Disponible en:

[\(PDF\) Biological activity of the ethanolic extracts and essential oils of four species of the genus *Lippia* from Guatemala, against the aquaculture pathogen *Aeromonas hydrophyla* \(researchgate.net\)](#)

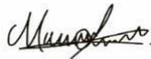
17 Aporte de la propuesta de investigación a los ODS:

La presente investigación contribuye al Objetivo de Desarrollo Sostenible 2, “Poner fin al hambre” específicamente en la meta 2.3 “Para 2030, duplicar la productividad agrícola y los ingresos de los productores de alimentos en pequeña escala, en particular las mujeres, los pueblos indígenas, los agricultores familiares, los pastores y los pescadores, entre otras cosas mediante un acceso seguro y equitativo a las tierras, a otros recursos de producción e insumos, conocimientos, servicios financieros, mercados y oportunidades para la generación de valor añadido y empleos no agrícolas”, así como al objetivo 15. “Proteger, restaurar y promover la utilización sostenible de los ecosistemas terrestres, gestionar de manera sostenible los bosques, combatir la desertificación y detener y revertir la degradación de la tierra, y frenar la pérdida de diversidad biológica” específicamente con las metas 15.6 “Promover la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos y promover el acceso adecuado de los recursos, como se ha convenido internacionalmente”. Esto se pretende evaluando el potencial de aprovechamiento de las especies del género *Lippia*, propias de Guatemala, por medio de la identificación la actividad biológica de los extractos de cuatro especies del género, contra patógenos que afectan a la acuicultura, para promover el uso sostenible de estas plantas que en la actualidad han sido subutilizadas y con las cuales se busca desarrollar alternativas de ingresos para las comunidades del área rural.

Informe final proyecto de investigación 2022

Dirección General de Investigación –DIGI-

18 Orden de pago final (incluir únicamente al personal con contrato vigente)

Nombres y apellidos	Categoría (investigador /auxiliar)	Registro de personal	Procede pago de mes (Sí / No)	Firma
Lcdo. Max Mérida Reyes	Investigador	20060419	No	
Br. Zonia Alejandra Caravantes Alvarado	Auxiliar de Investigación I	20201109	No	

19 Declaración del Coordinador(a) del proyecto de investigación

El Coordinador de proyecto de investigación con base en el *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación*, artículos 13 y 20, deja constancia que el personal contratado para el proyecto de investigación que coordina ha cumplido a satisfacción con la entrega de informes individuales por lo que es procedente hacer efectivo el pago correspondiente.

Dr. Juan Francisco Pérez Sabino
Coordinador del Proyecto



Fecha: 17 / 07 / 2023

20 Aval del Director(a) del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario

De conformidad con el artículo 13 y 19 del *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación* otorgo el aval al presente informe final de las actividades realizadas en el proyecto “**Actividad biológica de fracciones preparativas de extractos de seis plantas del género *Lippia* nativas de Guatemala contra patógenos acuícolas**” en mi calidad de Directora del Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas, mismo que ha sido revisado y cumple su ejecución de acuerdo a lo planificado.

Informe final proyecto de investigación 2022

Dirección General de Investigación –DIGI-

<p>Vo.Bo. Dra. María Eunice Enríquez Cotton Directora del Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas – IIQB-</p>	
<p>Fecha: 17 / 07 / 2023</p>	

21 Visado de la Dirección General de Investigación

<p>Vo. Bo. Inga. Liuba María Cabrera Coordinadora del Programa Universitario de Investigación en Desarrollo Industrial -PUIDI-</p>	
<p>Fecha: 17 / 07 / 2023</p>	

<p>Vo. Bo. Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar Coordinador General de Programas Universitarios de Investigación</p>	 <p>Ing. MARN Julio Rufino Salazar Pérez Coordinador General de Programas de Investigación, Digi-Usac</p>
<p>Fecha: 17 / 07 / 2023</p>	

