

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTI-*Nelisseria gonorrhoeae*
DE EXTRACTOS VEGETALES POR UN METODO DE DILUCION EN AGAR**

INFORME FINAL DE TESIS

PRESENTADO POR

Dora Carolina De Matta Rodríguez

**Para optar al título de
Químico Biólogo**

Guatemala, Marzo del 2000

Dk

T(2041)

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

JUNTA DIRECTIVA

FACULTAD DE CC. QQ. Y FARMACIA

DECANA	LICDA. HADA MARIETA ALVARADO BETETA
SECRETARIO	LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA
VOCAL I	DR. OSCAR MANUEL COBAR PINTO
VOCAL II	DR. RUBEN DARIEL VELASQUEZ MIRANDA
VOCAL III	LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE
VOCAL IV	BR. DAVID ESTUARDO DELGADO GONZALEZ
VOCAL V	BR. ESTUARDO SOLORZANO LEMUS

ACTO QUE DEDICO A

- A DIOS Fuente inagotable de sabiduría. Mi refugio y fortaleza en todo momento.
- A MIS PADRES Florencio De Matta
María Luisa de De Matta
Por su ejemplo, amor y respaldo en todos los momentos de mi vida.
- A MI ESPOSO Roni Alfredo Donis
Por su valioso apoyo, amor y comprensión.
- A MIS HIJOS Evelin, Alfredo, Luis y Sara
Con amor.
- A MIS HERMANOS Irene, Juan Carlos y Herman
Por su incondicional apoyo.
- A MI AMIGA Ana Liz con cariño.

AGRADECIMIENTOS

Al Lic. Armando Cáceres por su asesoría y apoyo brindado durante la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Erwin Solórzano cuya valiosa colaboración hizo posible el presente trabajo.

Al Lic. Gustavo Gini, Licda. Eli Ocaña, Licda. Denya Guarán, Lic. Anibal Ventura, Licda. Claudia Morales por su colaboración y ayuda en el desarrollo de la parte experimental de la tesis.

Al Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos -FARMAYA- por permitirme el uso del equipo e instalaciones para el desarrollo de la parte experimental.

Al Hospital General de Enfermedad Común del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social y al personal que labora en Microbiología por permitirme trabajar en sus instalaciones.

A mis compañeras de trabajo, Virginia de Quiñones y María Concepción Solares, por su gran ayuda y apoyo.

A todas las personas que colaboraron en la realización de esta tesis.

INDICE

1.	Resumen	1
2.	Introducción	3
3.	Antecedentes	4
4.	Justificaciones	22
5.	Objetivos	23
6.	Hipótesis	24
7.	Materiales y métodos	25
8.	Resultados	30
9.	Discusión de resultados	34
10.	Conclusiones	37
11.	Recomendaciones	38
12.	Referencias	39
13.	Anexos	43

1 RESUMEN

La gonorrea es el prototipo de las enfermedades de transmisión sexual (ETS), causada por la bacteria *Neisseria gonorrhoeae*, está ampliamente distribuida en el mundo y se le reconoció desde tiempos bíblicos. Ha sido estudiada con mayor atención en los últimos 30 años en relación con sus aspectos clínicos, epidemiológicos, de diagnóstico, de terapéutica etc. Los expertos en epidemiología consideran que aunque el número de casos reportados de gonorrea ha disminuido principalmente en países industrializados, su incidencia real ha sido subestimada ya que principalmente en países en conflicto las ETS han aumentado aceleradamente. Este cambio se debe a razones sociales y económicas, ya que ha habido una continua disminución del ingreso que se refleja en desempleo, prostitución y drogadicción; teniendo estos factores efectos muy negativos en las enfermedades "sociales" como la tuberculosis, los trastornos psiquiátricos y las ETS. Estas últimas enfermedades en particular tienen consecuencias graves para la salud reproductiva y de los neonatos.

Desde la década de los años 70 se ha observado un aumento en la resistencia antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* por lo que se ha descontinuado el uso de penicilina en su tratamiento, contando en su lugar con una amplia variedad de opciones terapéuticas que incluyen: Ceftriaxona, cefixime, ciprofloxacina, norfloxacina, y espectinomicina.

Sin embargo, la medicina popular no ha dejado nunca de recurrir a las plantas medicinales y se ha esforzado en conservar viva una tradición terapéutica conocida desde la prehistoria. La Organización Mundial de la Salud, a finales de los años 70, recomendó a los países en vías de desarrollo la integración de estas medicinas en los programas de salud, estableciendo recomendaciones para la evaluación de su eficacia. Esto entraña una gran dificultad ya que se calcula en más de 20,000 las especies vegetales que se utilizan en el mundo con estos fines. Por todo lo anterior, ha sido muy importante fijar los linderos entre lo que es simple creencia y lo que es útil y eficaz, apoyándose en estudios científicos que se llevan a cabo actualmente a través de una red de colaboraciones.

La información escrita internacional incluye 101 plantas usadas para el tratamiento de gonorrea y en estudios nacionales se ha evaluado la actividad antigonorrea *in vitro* de extractos etanólicos de 44 plantas por el método de difusión de disco en agar, enfrentándolos contra varias cepas de *N. gonorrhoeae*. Solamente 10 han mostrado actividad antigonorrea, siendo la más interesante *Bixa orellana*, por lo que se incluyó en el presente trabajo con las variantes de utilizar extractos hexánico, clorofórmico, metanólico, acuoso y por el método de dilución en agar.

Este método de dilución en agar demostró ser confiable, reproducible y perfectamente adaptable a nuestras necesidades ya que algunos extractos tenían consistencia de miel lo que hizo más conveniente diluirlos en el medio de cultivo y no impregnarlos en discos de papel. Para el análisis estadístico de resultados se utilizó un análisis binomial consistiendo en observar inhibición o no inhibición del crecimiento de *N. gonorrhoeae* por el extracto utilizado.

De las plantas pendientes de demostrar su actividad anti-*N. gonorrhoeae in vitro*, se incluyó en este trabajo los extractos etanólicos de *Acalypha guatemalensis*, *Cassia alata*, *Crescentia cujete*, *Gouania lupuloides*, *Quassia amara* y extractos fraccionados de *Stachytarpheta cayennensis*. Su elección fue en base a su amplio uso popular para enfermedades de transmisión sexual, principalmente en Guatemala aunque son utilizadas en toda Mesoamérica que incluye el Sur de México, toda Centroamérica y el Caribe. Así mismo, se tomó en cuenta su abundancia en el país y posibilidad de obtención en la época del año en que se realizó este estudio.

El trabajo se dividió en dos etapas; la primera fue una fase de tamizaje para demostrar la actividad anti-*N. gonorrhoeae* de estas 7 plantas en total. De las cuales únicamente *B. orellana* y *S. cayennensis* demostraron tener actividad contra tres cepas de *N. gonorrhoeae* de diferentes sensibilidades, confirmándose así la hipótesis planteada y lográndose otro de los objetivos que era validar científicamente la actividad antigonorrea de las plantas que efectivamente la tuvieran. La segunda etapa consistió en establecer la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para cada extracto que mostró actividad.

Se confirmó la actividad anti-*N. gonorrhoeae* de *B. orellana* para los extractos obtenidos con hexano, cloroformo y metanol y la CIM obtenida fue de 0.25, 0.5 y 1.0 mg/ml respectivamente.

Los extractos obtenidos con hexano, cloroformo y metanol de *S. cayennensis* demostraron actividad anti-*N. gonorrhoeae* y la CIM obtenida fue de 0.7, 0.8 y 1.0 mg/ml respectivamente.

Las cinco plantas restantes no presentaron ninguna actividad anti-*N. gonorrhoeae*. Se alcanzaron así los objetivos específicos de este estudio.

2 INTRODUCCION

Las enfermedades de transmisión sexual (ETS), constituyen el grupo más frecuente de enfermedades infecciosas y de declaración obligatoria. Se presentan principalmente en personas sexualmente activas y tiene una magnitud a nivel mundial. Anualmente se producen unos 250 millones de casos de ETS (685,000 infectados diarios) en el mundo (1). En la actualidad se conocen más de veinte microorganismos patógenos que se transmiten por contacto sexual y que incluyen agentes bacterianos, virales, protozoarios, hongos y ectoparásitos (2).

La gonorrea es el prototipo de las ETS; asimismo es una de las infecciones que ha sido estudiada con mayor atención en los últimos 30 años en relación con sus aspectos clínicos, epidemiológicos, de diagnóstico, de terapéutica y desde diversos ángulos de la relación hospedero-parásito (3).

Aunque la incidencia reportada de gonorrea ha disminuido desde mediados de 1970 en algunos de los países industrializados, la resistencia antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* ha aumentado en el mismo periodo (4). Todo esto está sucediendo en un momento en que los recursos disponibles para la salud pública están aminorándose en los países ricos y también en los pobres (5).

En la población guatemalteca sucede que muchas personas al verse afectadas por este tipo de infección, en lugar de buscar asistencia médica y diagnosticarse correctamente, hacen consultas informales a boticarios, amigos o buscan remedios caseros, resultando todo esto en tratamientos inadecuados o incompletos, surgiendo así cepas resistentes. Por lo que probar científicamente el verdadero poder terapéutico de los "remedios caseros" es un factor justificativo en la búsqueda de alternativas terapéuticas. Actualmente se ve con renovado interés a las plantas medicinales, hay una vuelta a los medicamentos a base de principios vegetales, este redescubrimiento del mundo vegetal resulta más importante por el hecho que, a través de largas y cuidadosas investigaciones, se ha llegado a un mejor conocimiento de los principios activos contenidos en las plantas y de su mecanismo de acción (6).

En Mesoamérica en general, se utilizan empíricamente 101 plantas medicinales para el tratamiento de la gonorrea (7); por lo que es importante y necesario continuar las investigaciones pendientes y así lograr validar con bases científicas el uso de la totalidad de las plantas medicinales como agentes antibacterianos. Con esta alternativa terapéutica se disminuirá la dependencia de la utilización de productos importados con el consecuente beneficio para toda la población ya que los países se convertirían en productores de sus propios medicamentos, adecuándolos a sus necesidades de salud, recursos y tecnología (6, 7, 8).

El presente estudio pretende demostrar *in vitro* la actividad anti-*N. gonorrhoeae* de 7 plantas utilizadas popularmente en Guatemala como tratamiento contra gonorrea por el método de dilución en agar.

3 ANTECEDENTES

1. *Neisseria gonorrhoeae*

1.1 Historia

Gonorrea es la única infección cuya presencia ha sido documentada desde los primeros registros de la historia. La gonorrea fue descrita por los antiguos egipcios y hebreos. Hipócrates mencionó una descarga uretral y leucorrea en algunas enfermedades genitales. En 1554 Fernel describió la gonorrea como una infección de la vejiga diferente a la sífilis y en 1614 Sylvius enunciaba que la próstata era el lugar de la infección gonocócica. Como no había etiología demostrable, Ricord aceptaba que gonorrea podía ser resultado de irritación u otras causas. Esto fue antes de que el médico alemán Albert Neisser describiera esta enfermedad por primera vez en 1879. Él observó la presencia constante de una bacteria particular con morfología cocoide, en las descargas purulentas de los pacientes infectados. No sólo lo encontró en descargas vaginales o uretrales, sino incluso en exudado conjuntival y a este microorganismo lo llamó *Micrococcus gonorrhoeae* (9).

El aislamiento *in vitro* de la bacteria se realizó por primera vez en 1882 y lo llevaron a cabo Leistikow y Loeffler. En 1885 Bumm logró cultivos puros de este microorganismo y pudo demostrar la relación etiológica mediante la inoculación en personas voluntarias. En el mismo año Trevisan empleó el nombre definitivo de *N. gonorrhoeae* para esta bacteria. Más tarde el fisiólogo John Hunter llevó a cabo estudios que permitieron diferenciar a la gonorrea de la sífilis (3, 9).

1.2 Biología

La especie bacteriana *N. gonorrhoeae* es un parásito exclusivo del hombre, está constituida por diplococos Gram negativos no móviles, no esporulados, con un diámetro aproximado de 0.6 a 0.8 μm (de manera individual); estos cocos tienen forma de riñón o de grano de café. Al formarse en pares adyacentes sus lados pueden apreciarse al microscopio planos o cóncavos. El gonococo es un microorganismo muy lábil al calor, a temperaturas de refrigeración y a diversos antisépticos. También es sensible a la desecación; en condiciones ordinarias, puede resistir poco tiempo a la exposición al aire (10).

1.3 Aspectos clínicos

Los gonococos infectan las mucosas de las vías genitales, el recto y la faringe, dependiendo de las prácticas sexuales de los individuos, produciendo casos de infecciones

no complicadas o supuración aguda que puede culminar en invasión tisular, lo que ocasiona inflamación crónica y fibrosis (3). En los hombres aparece una secreción purulenta de la uretra anterior, con disuria, en el término de dos a siete días después de la exposición a la infección. La infección puede ser de curso limitado, o a veces ocasiona un estado de portador crónico. También puede darse el estado de portador asintomático limitado a la uretra anterior. En las mujeres, unos cuantos días después de la exposición, la infección primaria sucede en el endocérvix y se extiende hacia la uretra, la vagina y puede progresar hasta las trompas uterinas y producir salpingitis con fibrosis; la esterilidad ocurre en 20 por ciento de las mujeres que han sufrido salpingitis gonocócica. La cervicitis y la proctitis gonocócicas crónicas son a menudo asintomáticas.

Entre las complicaciones originadas por el gonococo en el hombre se encuentran cuadros locales que incluyen abscesos prostáticos, epididimitis y por consecuencia infertilidad. En mujeres puede causar enfermedad pélvica inflamatoria y subsecuentemente esterilidad. Es probable que aquella ocurra en 10 a 20 por ciento de mujeres con gonorrea; sin embargo, se han observado porcentajes más altos de mujeres con gonorrea con signos que sugerían infección del aparato genital superior. En la infancia puede producir vulvovaginitis por abuso sexual y la oftalmía del recién nacido (3, 10, 11).

1.4 Patogenia

La *N. gonorrhoeae* como patógeno genitourinario debe ser capaz de colonizar la superficie de la mucosa del tracto genital, crecer *in vivo* bajo condiciones de disponibilidad limitada de hierro y evadir la respuesta inmune del hospedero.

El gonococo expresa su primer nivel de patogenicidad al adherirse a la superficie de los epitelios uretral, endocervical, vaginal e incluso a los espermatozoides humanos y a las células epiteliales no ciliadas que recubren las trompas de Falopio. Un dato importante es la existencia de la proteína de superficie asociada con la adherencia de *N. gonorrhoeae* llamada pili y que se encuentra organizada como un multímero en forma de estructura capilar sobre la superficie de la bacteria. La bacteria piliada se adhiere con mayor eficiencia que la no piliada al epitelio del tracto urogenital; de hecho sólo las primeras son infecciosas (3, 9, 10).

La proteína I (PI) es otro componente estructural que se extiende por la membrana externa del gonococo, se encuentra en trímeros que forman poros en la superficie por los cuales entran en la célula algunos nutrientes. A la PI se le ha involucrado en la serovariedad específica de las cepas de gonococo, para fines de identificación y tipificación epidemiológica. La proteína II (PII) es transmembranal y participa en la adherencia de los gonococos, para su fijación a las células del hospedero; una parte de la molécula de PII se encuentra en la membrana gonocócica externa y el resto se encuentra sobre la superficie. La proteína III se conserva desde el punto de vista antigénico en todos los gonococos y se relaciona con la PI en la formación de poros en la superficie celular. Simultáneamente los gonococos pueden manifestar varias cadenas de lipopolisacárido (LPS) antigénicamente

diferentes en su pared celular Gram negativa y a sus efectos endotóxicos se debe la toxicidad de las infecciones gonocócicas (3, 12).

En el caso de las infecciones diseminadas, el microorganismo expresa resistencia estable al suero humano normal cuando la bacteria no manifiesta el antígeno de superficie (carbohidrato), que es el blanco de anticuerpos bactericidas de la clase IgG. La otra alternativa es la expresión de carbohidratos de superficie adicionales, que bloquean epítopes bactericidas relevantes para la acción del complemento sérico (3, 9).

1.5 Diagnóstico bacteriológico

Tradicionalmente, el diagnóstico bacteriológico de la gonorrea se lleva a cabo por una adecuada toma de las muestras biológicas de uretra, cérvix y algunas veces del recto, conjuntiva y faringe; en el caso de gonorrea diseminada se recomienda tomar muestras de sangre o de líquido sinovial en el caso de artritis. Para su identificación presuntiva, al microscopio se observan como diplococos Gram negativo con los lados adyacentes aplanados. Todos los miembros del género *Neisseria* son oxidasa y catalasa positivos.

Es un parásito difícil para su cultivo, microaerofílico/aerobio y requiere para su recuperación del material clínico un medio de cultivo enriquecido y la incubación con CO₂ (3-10%) (3,9,10). Se produce su crecimiento abundante en agar chocolateado complementado con extracto de levadura o un enriquecimiento similar, o en medio de Thayer-Martin modificado compuesto de base de agar GC, añadido de hemoglobina, polienriquecimiento y antibióticos (vancomicina, colistina y nistatina) que confieren selectividad al aislamiento de los microorganismos. Otros ejemplos de estos medios tradicionales son el de Martin-Lewis, New York City (NYC) entre otros, que incluyen variantes en su formulación antibiótica (3). Después de 20 horas de incubación en una jarra con candela a 35°C, aparecen colonias típicas en forma de pequeñas colonias (de 0.5 a 2 mm), blanco grisáceo, transparentes, elevadas y húmedas, con bordes enteros o lobulados. Por lo general son mucoides y tienden a desprenderse en conjunto cuando se las recoge de la superficie del agar. Los cultivos se tratarán inmediatamente ya que experimentan autólisis en ausencia de CO₂. Al observar las colonias en un medio claro, los tipos T1 y T2 reflejan la luz y parecen tener reflejos brillantes. Las colonias de T1 son pequeñas y elevadas, y las de T2 son ligeramente más grandes y presentan el centro abroquelado. Las colonias T3 y T4 son más grandes, más planas y menos opacas, y no reflejan la luz (10,12). Metaboliza únicamente la glucosa y produce ácido pero no gas (3, 9, 10).

Como se ha dicho el estándar de referencia para la detección de *N. gonorrhoeae* es el cultivo. Las mayores ventajas del cultivo son especificidad, se pueden realizar pruebas de susceptibilidad y además es relativamente económico (13). Sin embargo, también hay ciertas desventajas que incluyen al transporte de la muestra, requerimientos de almacenamiento y conservación del gonococo, periodo de incubación de 3 días o más antes de obtener resultados, y el mantenimiento de su viabilidad es especialmente difícil. Lo más significativo es que el cultivo para *N. gonorrhoeae* tiene una sensibilidad de un 70 a 90 por ciento en la mayoría de los casos. Debido a estas limitaciones del cultivo se han

desarrollado alternativas tecnológicas para el diagnóstico de laboratorio de gonorrea (14, 15, 16).

Los requerimientos nutricionales específicos varían de una cepa a otra, y algunos patrones de estos requerimientos se han observado en aislamientos clínicos. Estos patrones se han usado como un sistema de tipificación llamado Auxotipificación. Aunque relativamente es complicado y no utilizado ampliamente, la auxotipificación es el único sistema práctico disponible para tipificar al gonococo (10, 12, 16).

La auxotipificación se basa en la respuesta de crecimiento de las cepas en medios definidos químicamente. El medio básico está compuesto de sales inorgánicas, glucosa, etc. La cistina o cisteína es requerida por todos los gonococos pero no por meningococos; cepas que no tienen otros requerimientos además de éste son llamadas auxotipo cero (Pro- o Arg-), otras cepas requieren uno o más compuestos como prolina, arginina, etc. Hay patrones geográficos definidos, así como también existe correlación entre un auxotipo particular y el síndrome clínico del paciente (10,12,16)

Recientemente, Chit y colaboradores presentaron una caracterización fenotípica combinando el uso de la auxotipificación, caracterización serológica y pruebas de susceptibilidad. El esquema de clasificación Auxotipo-serotipo (A/S) es el método más ampliamente aceptado para la clasificación de cepas de gonococo, aunque con ciertas limitaciones (12).

1.6 Métodos modernos de confirmación

La confirmación de cepas de *N. gonorrhoeae* aisladas en medios selectivos es muy importante para médicos y pacientes. La diferenciación precisa y rápida con respecto a otras especies de *Neisseria* es particularmente importante para la evaluación de aislamientos no de áreas genitales y víctimas de abusos sexuales en casos medicolegales, en los cuales su diagnóstico es de gran repercusión (17). Por lo que en último decenio, se han desarrollado pruebas alternativas al cultivo, tales como Inmunofluorescencia Directa (DIF), Inmunoensayo Enzimático (EIA), pruebas de amplificación de ácido nucleico (PCR) y reacción de la cadena de ligasa (LCR), que prometen la eliminación de muchos de los problemas de obtención de muestra, transporte y diagnóstico de laboratorio (15).

Comercialmente disponibles están los reactivos de Anticuerpos de Fluorescencia Directa (DFA) que proporcionan medios fáciles y rápidos para la confirmación del gonococo, principalmente en el tamizaje de gran número de cepas (17).

Herrmann y colaboradores presentan un método de PCR modificado que proporciona altos grados de sensibilidad y especificidad. El método ha sido exitosamente aplicado a frotos en laminilla secadas al aire y almacenadas a temperatura ambiente permitiendo la detección de ADN hasta por un año y su límite de detección es de una célula de *N. gonorrhoeae*. Este método de almacenamiento facilita el transporte y análisis por técnicas de PCR aún cuando las condiciones de congelamiento no están disponibles (13).

LCR es una técnica de amplificación de ácido nucleico *in vitro*, su límite de detección para *N. gonorrhoeae* está entre 10 y 100 UFC/ml (18). Hasta hace poco el diagnóstico de gonorrea en mujeres se podía lograr solamente cuando se efectuaba examen pélvico lo que permitía tomar la muestra con espéculo. Las pruebas de PCR y LCR, con un costo y una necesidad de personal altamente especializado que limitan su amplia utilización, han proporcionado diagnósticos precisos y específicos de *N. gonorrhoeae* con muestras de orina así como muestras pélvicas (3, 15, 19). La muestra de orina, aunque requiere procedimientos adicionales como alícuotas y centrifugación, simplifica grandemente la toma de muestra para gonorrea particularmente cuando se dificulta el examen pélvico como en el caso de las clínicas en escuelas, centros de detención de adolescentes, centros comunitarios, lugares de mujeres trabajadoras del sexo y cárceles de mujeres (1, 19).

La ventaja de usar muestras obtenidas por el propio paciente para la detección exacta de *N. gonorrhoeae* proporciona la oportunidad de extender las pruebas de tamizaje para mejorar los esfuerzos en detectar infecciones asintomáticas reduciendo los riesgos tanto de complicaciones para el individuo infectado como la transmisión de la infección a las parejas sexuales (19).

Debido a que tanto *N. gonorrhoeae* como *Chlamydia trachomatis* son reconocidas como las dos ETS más prevalentes, en el mundo entero hay un estimado anual de 25 millones de casos de gonorrea y 50 millones de casos de Clamidia, los síntomas y las complicaciones de gonorrea son similares a las de Clamidia (20). Se han hecho esfuerzos para prevenir la expansión de estas enfermedades. Kimberli y colaboradores evaluaron una combinación de ensayo de PCR que amplifica simultáneamente y detecta tanto Clamidia y gonorrea en una sola muestra. A nuestro saber, este es el primer reporte en el cual se efectúa una prueba que combina la detección de Clamidia-gonorrea al mismo tiempo en una misma muestra, ya sea pélvica o de orina. Por los resultados altamente sensibles y específicos ha demostrado ser un buen método para el tamizaje tanto en individuos sintomáticos y asintomáticos para *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis* (14, 15, 20).

1.7 Métodos de conservación de *N. gonorrhoeae*

En la mayoría de laboratorio, las cepas bacterianas deben conservarse para controles de calidad, investigación, enseñanza, etc. Para lograrlo, se debe contar con los recursos para preservar estos microorganismos. Desafortunadamente, la mayoría de laboratorios tienen acceso solamente a unidades de temperaturas de congelación de -20°C y no la recomendada que es de -70°C ; por lo que ciertos microorganismos fastidiosos como *N. gonorrhoeae* no logran sobrevivir por mucho tiempo (21).

En cultivo, el gonococo permanece viable solamente cuando es resembrado cada 72 horas y no sobrevivirán mayor tiempo de incubación. Cultivos de especies de *Neisseria* son preservadas satisfactoriamente por liofilización o por congelamiento (10).

Entre los métodos que se sugieren para su preservación tenemos el que utiliza tubos con agar chocolate inclinado sobre el cual el microorganismo debe crecer, luego se cubre con aceite mineral hasta 2 cm sobre el borde del medio. Los tubos son bien tapados, cubiertos con cinta plástica y almacenados a -30°C (10). En otro método se suspende un cultivo abundante de *Neisseria* en un caldo Trypticase Soya (10, 21) o un medio similar con 10 o 15% de glicerol y se congela a -70°C y el método que utiliza una suspensión del cultivo en leche descremada al 10% y se congela a -70°C (4, 10).

Harbec en su estudio presenta una versión simplificada (medio de preservación LSPQ) del medio de Yamai que es un medio líquido con una base de gelatina que se usa para preparar discos de gelatina seca como medios de preservación. Y concluye demostrando que el medio LSPQ representa una buena alternativa para el almacenamiento de cepas de *Neisseria* a -20°C y por lo menos hasta un año. Tomando siempre en cuenta que temperaturas tan solo unos pocos grados más altos o menos que -20°C pueden acortar o alargar la vida de almacenamiento de la bacteria (21).

1.8 Mecanismos de transmisión y Epidemiología

N. gonorrhoeae es un patógeno exclusivamente humano cuya transmisión a otros se realiza por individuos que no tienen conocimiento de su propia infección (19). Aparte de la transmisión perinatal, el mecanismo fundamental de transmisión de la infección por *N. gonorrhoeae* es sexual (3, 9, 10). Para entender mejor el papel que juega la actividad sexual en la transmisión de la infección es necesario analizar los conceptos de endemidad y grupo reservorio. Para que un agente de transmisión sexual se reproduzca en la población necesita que un individuo infectado transmita con éxito la enfermedad al menos a una persona susceptible. Si el número de susceptibles es mayor que uno, la prevalencia de la infección aumenta en la población, pero disminuye en caso contrario (3).

Las características socioeconómicas y demográficas que influyen directa o indirectamente sobre la frecuencia con que un individuo adquiere nuevas parejas sexuales incluye: juventud, bajo nivel socioeconómico, educación, escaso acceso a los servicios de salud y drogadicción (3, 4, 19). El riesgo de infección por gonorrea difiere de acuerdo con el sexo de los individuos. Se ha estimado que el riesgo de transmisión de *N. gonorrhoeae* de una mujer infectada a la uretra de su pareja masculina es de aproximadamente 20 por ciento por cada exposición y se incrementa entre 60 y 90 por ciento después de cuatro exposiciones. En el hombre se estima que es de aproximadamente 30 por ciento por contacto sexual (3).

Aunque el número de casos reportados de gonorrea ha disminuido sustancialmente en algunos países industrializados y en Suecia la infección ha sido casi erradicada (13), mundialmente se observa un aumento creciente de la prevalencia de todos los tipos de cepas resistentes (11) y se estima que anualmente causa 78 millones de nuevas infecciones (13) pero la mayoría de los expertos creen que ésta es una subestimación de la verdadera incidencia (18), ya que muchos países carecen de un sistema nacional y uniforme de vigilancia para el monitoreo de rutina de las ETS (5).

Durante el periodo de 1980 a 1991 disminuyó en Europa occidental la incidencia de gonorrea, pero desde 1991 en adelante han aumentado aceleradamente las ETS en los nuevos estados independientes de la Europa oriental. En algunos países de la antigua URSS el aumento es de 15 a 30 veces las cifras anteriores. Como en otras situaciones de salud, este alarmante cambio se debe en último término a razones sociales y económicas. En países como Belarús, Moldova y Ucrania, la transición a un sistema de economía de mercado ha sido agitada y ha habido una continua disminución del ingreso que se refleja en desempleo, prostitución y drogadicción (22).

1.9 Mecanismos de Resistencia

Hay dos patrones de resistencia antimicrobiana que han sido observados en *N. gonorrhoeae*. El primero es la resistencia mediada por el ADN cromosomal; este tipo se debe a mutaciones en genes cromosómicos específicos y es responsable por el apareamiento de resistencia a la penicilina, la tetraciclina, las cefalosporinas, la espectinomicina y las quinolonas; por lo tanto estas cepas pueden ser resistentes a algunos de los tratamientos utilizados (4, 9, 10, 23).

La otra forma de la resistencia antimicrobiana gonocócica es la mediada por plásmidos, que son elementos extracromosomales de ADN. Este tipo se da por la adquisición de plásmidos que codifican la resistencia a la penicilina. Esta última resulta de la producción de enzima β -lactamasa capaz de hidrolizar el anillo β -lactámico de los fármacos penicilánicos y cefalosporinas de 1ª generación pero no afecta su susceptibilidad a cefalosporinas de 2ª y 3ª generación. A las cepas productoras de penicilinas se les conocen con la abreviatura PPNG y fueron reconocidas por primera vez en Estados Unidos, en 1976. Desde entonces ha aumentado la frecuencia hasta representar casi 3 por ciento de todos los aislamientos en ese país (4, 12, 16).

En 1985 en los Estados Unidos se reportó por primera vez la cepa de *N. gonorrhoeae* altamente resistentes a la tetraciclina (TRNG) cuya concentración inhibitoria mínima (CIM) (23) fue $> 16 \mu\text{g/ml}$ y desde entonces se han documentado en otros países. Se asoció su aparición al uso previo de las tetraciclinas como profilaxis o tratamiento de las ETS (16).

Debido a que estas resistencias conforman la mayoría de las encontradas hasta la fecha en el caso de *N. gonorrhoeae*, ya no se recomiendan las penicilinas para su terapia (4).

1.10 Definición de Susceptibilidad y Resistencia

Las definiciones de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana están basadas en criterios establecidos por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Si las cepas aisladas tienen una CIM mayor o igual a $2 \mu\text{g}$ de penicilina o tetraciclina/ml y mayor o igual a $128 \mu\text{g}$ de espectinomicina se dice que son resistentes al

correspondiente antimicrobiano. Se considera que las personas infectadas con estas cepas resistentes no responden a la terapia con estos antibióticos (4).

En años recientes ha habido varios reportes sobre la disminuida susceptibilidad del gonococo hacia las quinolonas aunque han sido utilizadas por más de 10 años. Esto ha sido como consecuencia de un incremento en general del uso de las quinolonas para el tratamiento de varias enfermedades infecciosas en la mayoría de los países (12, 16, 24). La guía NCCLS para las pruebas de susceptibilidad de *N. gonorrhoeae* a las quinolonas define únicamente como categoría de sensible y menos sensible para ciprofloxacina, enoxacina, lomefloxacina y ofloxacina (24, 25). Con las cepas resistentes a las quinolonas, es de esperarse que surja alguna resistencia cruzada con otras quinolonas disponibles actualmente (24).

1.11 Pruebas de Susceptibilidad Antibiótica

Las fallas en el tratamiento con penicilina y tetraciclina contra infecciones gonocócicas no complicadas aceleraron la necesidad de establecer más rutinariamente la susceptibilidad de estas especies (5). El reciente surgimiento de cepas con susceptibilidad disminuida a los tratamientos actualmente recomendados por el Centro de Control de Enfermedades y Prevención (CDC por sus siglas en inglés), incluyendo fluoroquinolonas y algunas β -lactamas ha marcado la necesidad de estandarizar métodos de susceptibilidad que sean confiables y reproducibles (26).

Los métodos más utilizados para la evaluación de la actividad antimicrobiana, incluyendo plantas medicinales, han sido los de difusión y dilución. En ambos casos existen factores tales como: composición del medio de cultivo, microorganismos de prueba, pH y otros, que pueden variar los resultados. Estas variaciones se han minimizado trabajando en condiciones estándar. En algunos estudios se han introducido ciertas modificaciones a los métodos, con el fin de mejorar los resultados, pero los principios básicos continúan siendo los mismos (7, 9, 13, 14).

Para el método de difusión se utilizan generalmente discos de papel filtro impregnados con las soluciones antimicrobianas a ensayar; éstos se aplican sobre placas de agar inoculadas con el microorganismo de prueba. Al ponerse en contacto los discos con el agar, absorben agua del medio, con lo cual se disuelve la solución y empieza a difundir a través de la capa de agar. Al mismo tiempo que el antibiótico va difundiendo ocurre la multiplicación bacteriana. Durante la fase de crecimiento logarítmico en la que la multiplicación bacteriana ocurre más rápidamente que la difusión del antibiótico las bacterias que no han sido inhibidas seguirán multiplicándose, hasta formar un halo alrededor del disco que puede visualizarse luego de cierto tiempo de incubación. No habrá crecimiento en el área donde el antibiótico esté en concentraciones inhibitorias, por lo tanto, mientras más susceptible sea el microorganismo el diámetro del halo será mayor (9, 10, 23).

Las pruebas de dilución son utilizadas principalmente para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de un extracto, aceite esencial o de una sustancia pura. El método consiste en que a un cultivo del microorganismo en estudio se le inoculan cantidades específicas del antibiótico, preparado en concentraciones decrecientes en caldo o agar por la técnica de dilución seriada. Este método de dilución en líquido, el indicador de inhibición es la turbidez del medio; cuando no existe crecimiento el medio permanece claro, es decir, el antibiótico inhibe al microorganismo; y cuando el antibiótico no tiene ningún efecto entonces hay crecimiento y el medio aparece turbio. El grado de inhibición se relaciona con la turbidez y ésta se mide por espectrofotometría. La concentración mínima del antibiótico que no muestre crecimiento es la medida del efecto bacteriostático del mismo sobre el microorganismo (10).

En el método de dilución en agar, se preparan diluciones de antibiótico y se mezclan con un determinado volumen de agar, para obtener las concentraciones deseadas. Luego se inoculan los microorganismos a estudiar en diferentes puntos de la placa con asa o aplicador. Se incuban las placas y se toma como punto límite la concentración mínima de antibiótico que produce inhibición completa del crecimiento. Este método tiene la ventaja de que es simple y pueden ensayarse agentes solubles e insolubles en agua; además en una caja de Petri pueden ensayarse con varios microorganismos a la vez (10, 23).

En los últimos avances realizados Mehaffey y Biedenbach demostraron, en estudios individuales, que el método Etest (que consiste en tiras manufacturadas por AB Biodisk y que son impregnadas con la suspensión bacteriana) es una prueba bien estandarizada, reproducible y exacta principalmente al evaluar ceftriaxona, cefotaxima, ciprofloxacina con *N. gonorrhoeae* (23, 26).

1.12 Prevención

Para hacer frente a los retos que plantean las ETS, la visión del siglo XXI es la de un mundo en continua vigilancia (5). Ante la carencia de una vacuna efectiva contra la gonorrea (4, 12) las formas de prevenirla tienen que partir desde una educación sexual a las comunidades que desaliente los encuentros sexuales ocasionales con desconocidos o, en su defecto, promueva limitar el número de parejas; entre sujetos promiscuos. Dicha educación les deberá recomendar la selección de parejas que carezcan de conductas sexuales riesgosas (3, 12, 22).

La otra esfera de prácticas preventivas de la gonorrea está mediada por el uso de microbicidas químicos durante la realización del acto sexual o el empleo del condón, que se ha demostrado como un componente reductor de las posibilidades de infección por diversos agentes etiológicos transmitidos por vía genital. A este respecto, se debe tener en mente que sólo los condones de látex han mostrado ser efectivos para impedir el paso del gonococo y otros agentes como Clamidia, treponema, herpes virus y el VIH. Para el caso de la gonorrea, la evidencia de la utilidad del condón para proteger de la bacteria se tiene desde finales de los años setenta y principios de los ochenta (3).

1.13 Tratamiento

Para los más de 400,000 casos anuales reportados solo en Estados Unidos (7, 18) y un estimado anual de 25 millones en todo el mundo (20), hay una amplia variedad de opciones terapéuticas (7) tanto para individuos infectados sintomáticos como asintomáticos (20); incluyendo ceftriaxona (dosis única intramuscular de 500 mg) o cefixima (400 mg), los cuales han sido recomendados por el CDC para tratar infección gonocócica no complicada (4, 11, 14).

Para los casos de infección gonocócica aguda no complicada, la espectinomicina es otra opción en una sola aplicación intramuscular de 2 g. Las quinolonas también han sido utilizadas con éxito en el tratamiento de la uretritis gonocócica y la cervicitis mucopurulenta agudas. Las dosis orales únicas de 500 mg de ciprofloxacina, o bien de 400 mg de norfloxacina o enoxacina han sido igualmente efectivas (todas en una sola dosis) en la erradicación de síntomas (curación clínica) y microorganismo (curación bacteriológica) (3, 4, 11).

Aunque el CDC ya no lo recomienda, el tratamiento para cepas antibiótico-sensibles del gonococo (criterio establecido por realización previa de antibiograma) sería a base de 4.8 millones de unidades de penicilina procaína intramuscular, en una sola dosis repartida en ambos glúteos (3).

1.14 Fitoterapia

Durante mucho tiempo los remedios naturales y sobre todo las plantas medicinales fueron el principal e incluso el único recurso de que disponía el médico. A principios de este siglo, el desarrollo de la química y el descubrimiento de complejos procesos de síntesis orgánica desembocaron en la puesta en marcha por parte de la industria farmacéutica, de una nueva producción de medicamentos. Sin embargo, las plantas medicinales y los remedios que se extraían de ellas no quedaron totalmente olvidados. Sus reservas de materias primas fueron y siguen siendo explotadas, para extraer de ellas sustancias, en algunos casos, insustituibles (27).

La realidad que el 80 por ciento de la población mundial utiliza medicinas tradicionales para el alivio de sus enfermedades es un hecho que adquirió importancia y a finales de los años 70 los países en vías de desarrollo iniciaron la integración de estas medicinas en los programas de salud, estableciendo recomendaciones para la evaluación de su eficacia.

Esta evaluación implica una gran dificultad ya que se calcula en más de 20,000 las especies vegetales que se utilizan en el mundo con estos fines. Ello ha dado lugar al nacimiento de una nueva disciplina, la etnofarmacología. Consiste en aunar los esfuerzos de la investigación sobre la tradición etnológica que recoge los usos populares de las plantas y analizar dichos usos mediante la aplicación de estudios farmacológicos de laboratorio con el objeto de establecer su auténtico grado de eficacia. Este enfoque ha

permitido confirmar en gran número de casos la acción terapéutica de las plantas medicinales que han formado parte de la herencia basada en la tradición médica de diferentes culturas. Son numerosos los trabajos relativos a la optimización del uso de las especies vegetales medicinales desde el punto de vista de sus aspectos tecnológicos tales como recolección, partes de la planta a utilizar, presentaciones galénicas y formas de administración (28).

Las dudas por otra parte razonables, mantenidas hasta el momento, sobre la eficacia de los fitofármacos van dejando paso, por la vía de la investigación científica y de la adecuación tecnológica, a un alto grado de certeza respecto de la utilidad terapéutica de estos productos.

Por todo ello, parece lógico pensar que las plantas medicinales están encontrando su lugar adecuado en el entorno de las terapias modernas, tanto para el tratamiento de determinadas patologías y normalización de funciones fisiológicas, como para complementar otras acciones terapéuticas (27, 28).

2. Plantas utilizadas en el tratamiento de gonorrea

La información escrita, tanto nacional como internacional, sobre plantas utilizadas para el tratamiento de gonorrea e informes sobre actividad antigonorrea de plantas es muy escasa. El Atlas de Plantas Medicinales de Morton (1981), que abarca Centro América, algunas islas del Caribe, Yucatán en el sur de México, Colombia y Venezuela entre algunos de los países de América del Sur incluye 101 plantas usadas para el tratamiento de gonorrea (33). Información adicional y reciente se ha obtenido por medio de proyectos de investigación aplicada, utilizando estudios de campo, encuestas, etc. (29, 30).

En Guatemala, la validación científica escasamente ha podido hacerse en 46 plantas desde 1991, de las cuales únicamente 10 han mostrado actividad anti-*N. gonorrhoeae* *in vitro* como son *Gliricidia septum*, *Hibiscus esculentus*, *Piper aduncum*, *Ageratum conyzoides*, *Cajanus cajan*, *Justicia spicigera*, *Bixa orellana*, *Eupatorium odoratum*, *Rhizophora mangle* y *Spondias mombin*. Estos estudios se efectuaron utilizando una modificación del método de Bauer y Kirby adaptado al tamizaje de la actividad antibacteriana de extractos vegetales. La metodología consistió en la impregnación de discos de papel secante con las maceraciones etanólicas de las plantas estudiadas y la actividad se confirmó en varias cepas aisladas de material clínico (7).

Para el presente estudio se utilizaron maceraciones etanólicas de 6 plantas no estudiadas anteriormente, escogidas en base a su amplio uso popular en Guatemala para el tratamiento de ETS, lo que justifica su comprobación científica para el tratamiento de gonorrea, también se tomó en cuenta su abundancia en el país, posibilidad de obtención y caracterización en esta época del año. Las plantas y la parte utilizada de cada una de ellas en este trabajo fueron: *Acalypha guatemalensis* (hoja), *Cassia alata* (hoja), *Crescentia cujete* (parte interior del epicarpio del fruto), *Gouania lupuloides* (hoja), *Quassia amara* (hoja), *Stachytarpheta cayennensis* (hoja) y se incluye una séptima planta, *Bixa orellana*

(hoja), conocida comúnmente como achiote (ver Anexo 1) y que demostró actividad contra *N. gonorrhoeae* en estudios preliminares que usaron mayores concentraciones, un extracto etanólico únicamente y el método de difusión en disco en agar, parámetros diferentes al presente estudio. El achiote, es una de las más interesantes ya que se ha cultivado por mucho tiempo, se produce tanto en latitudes altas como bajas, crece en forma silvestre en muchas áreas tropicales en algunas de las cuales se aprovecha para fines comerciales para la producción industrial de colorantes; por todo esto es necesario evaluarla con mayor profundidad para lograr el máximo aprovechamiento de las partes de la planta (7, 29, 30).

A continuación se presenta la información detallada de las plantas que se utilizaron en el presente estudio:

2.1	Familia:	Bignoniaceae
	Nombre científico:	<i>Crescentia cujete</i> L
	Nombre común:	Morro, Gñira, Hom, Jicara

2.1.1. Descripción botánica y habitat

Arbol de ramas numerosas, retorcidas, extendidas, 6-10 m de alto, 30 cm de diámetro. Hojas amontonadas, siempre verdes, espatuladas, varios tamaños, 6-26 cm de largo, simples, ovadas, sin peciolo. Flores olorosas, tallo corto, verde amarillento con estrías rosadas, cáliz bilabiado; 5 lóbulos cerosos, 5-8 cm de largo, en ramas o troncos, pistilos 3-4 cm de largo, ovario cónico redondeado. Fruta redonda, oval, 10-30 cm de ancho; cubierta delgada, leñosa; pulpa blanca, fibrosa, jugosa. Semillas, planas, café, 8 mm de largo. La madera es café-amarillenta, semidura, pesada (30). Es nativa del norte de Centro América y México. Cultivada en regiones tropicales debajo de 500 msnm. En Guatemala se encuentra en Alta y Baja Verapaz, Escuintla, Izabal, Petén, Quetzaltenango, Quiché, Retalhuleu, Santa Rosa, San Marcos y Suchitepequez (31).

2.1.2. Usos medicinales

Con la pulpa del fruto se prepara un jarabe que se usa por vía oral para tratar afecciones respiratorias (bronquitis, catarro, pulmonía, resfrío, tos, tos ferina) y gastrointestinales, inflamación y uretritis; por vía tópica se usa en dermatitis, golpes, leucorrea, hemorroides; raspones, tumores, expulsar la placenta y contra ponzoñas animales. El cocimiento de las hojas se usa para tratar diarrea, diabetes, indigestión, nerviosismo y palpitaciones (32, 33).

2.1.3 Actividad antibacteriana

Estudios antibacterianos *in vitro* demuestran que el extracto etanólico de las hojas tiene actividad contra *Salmonella typhi*, *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. Las semillas no presentan actividad antibiótica (31, 32, 34, 35).

2.1.4 Composición química

La pulpa cruda contiene ácidos orgánicos, alcaloides y polifenoles. El tamizaje fitoquímico demuestra alcaloides cuaternarios, cromóforos hidrofílicos, esteroides triterpénicos, flavonoides y polifenoles. Las semillas contienen azúcares, proteína y aceite fijo parecido al aceite de oliva, que consiste de ácidos oléico, linoléico y otros saturados. Las hojas contienen ácido caféico. La madera contiene naftoquinonas (34, 36).

2.2 Familia: Bixaceae
 Nombre científico: *Bixa orellana* L.
 Nombre común: Achiote, Aneto, Bija, Ox.

2.2.1 Descripción botánica y hábitat

Arbol o arbusto de 3-9 m de alto. Hojas siempre verdes, delgadas, acorazonadas u ovadas, 8-20 cm de largo, en punta. Flores 4-5 cm de ancho, 5 pétalos blancos o rosados, cáliz peludo. Cápsulas de semillas de 3-4 cm de largo, ovoides o cónicas, café-rojizo o amarillo, pequeñas espinas lisas; semillas numerosas en celdas de 5 mm de largo, cubiertas de fina pulpa rojo-naranja. En Guatemala se cultiva en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chiquimula, El Progreso, Escuintla, Izabal, Jutiapa, Quetzaltenango, Sacatepéquez, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa (31, 35).

2.2.2 Usos medicinales

La decocción de semillas se toma para combatir debilidad, diabetes, afecciones gastrointestinales (cólico, diarrea, estreñimiento, gastritis, inapetencia) respiratorias (asma, amigdalitis), hepáticas y gonorrea. La decocción de la raíz se usa para tratar ictericia, oliguria, diabetes y gonorrea. La goma de las hojas molidas se toma como diurético, purgante y gonorrea (31, 34, 35).

2.2.3 Actividad antibacteriana

Estudios antibacterianos demuestran que la tintura de raíz es activa contra *S. typhi*, no así contra *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella dysenteriae* y *Shigella flexneri*; las tinturas de corteza y hojas son activas contra *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *S. typhi* y *S. flexneri*; el extracto etanólico de semillas es inactivo contra bacterias; la tintura de hojas es activa contra *N. gonorrhoeae.*, la semilla es inactiva (31, 37).

2.2.4 Composición química

El extracto acuoso de semillas contiene 900-2,000 UI/g. de vit. A, carotenoides, aminos, flavonoides, leucoantocianinas, triterpenos y taninos. Las hojas contienen

alcaloides, flavonoides y sesquiterpenos. El análisis proximal de 100 g de semilla seca contiene: proteína, grasa y ceniza (29, 33).

- 2.3 Familia: Euphorbiaceae
 Nombre científico: *Acalypha guatemalensis* Pax & Hoffm.
 Nombre común: Hierba del cáncer, Ccul, Corrimiento, Gusanillo.

2.3.1 Descripción botánica y hábitat

Hierba perenne, erecta, hasta 1 m de alto, simple o ramificada, vellosa cuando joven. Hojas ovaladas, alargadas, margen festoneado. 4-7 cm de largo, membranosas, agujereadas por insectos o protuberancias rojizas. Flores numerosas en racimos rojo oscuro, densas, espigas axilares y terminales, 4-5 cm de largo, pedunculadas o subsésiles. Semillas ovoides suaves (32, 38). Es nativa de Guatemala y Honduras, común en terrenos removidos, secos o húmedos, en campos de cultivo y vegetación de 750-2500 msnm. En Guatemala se ha descrito en Baja Verapaz, Chimaltenango, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Quetzaltenango, Quiché, Santa Rosa, Sacatepéquez y Sololá (33, 34).

2.3.2 Usos medicinales

En Guatemala se vende como medicina ramas con hojas de ambas especies. El cocimiento de la planta se usa como tónico y diurético; por vía oral se usa para el tratamiento de afecciones gastrointestinales (amebiasis, diarrea, disentería, dolor de estómago, estreñimiento, gastritis), alergia, cáncer, dolor de cabeza y menstrual, enfermedades venéreas, reumatismo. Por vía tópica se aplica en compresa y emplasto para afecciones de la piel y en lavados para vaginitis, picadura de serpientes y pies cansados (33, 34, 37).

2.3.3 Actividad antibacteriana

Estudios antibacterianos *in vitro* demuestran que la maceración hidroalcohólica de las hojas inhiben el crecimiento de *S. aureus*, *S. typhi*, *S. flexneri*. (35, 38).

2.3.4 Composición química

Compuestos oxidables, sustancias reductoras, aldehidos y cetonas, enlaces dobles, alcoholes hidrocarbonados, fenoles (39).

- 2.4 Familia: Leguminosae
 Nombre científico: *Cassia alata* L.
 Nombre común: Barajo, Sambrano, Bruja, Sorocontil

2.4.1 Descripción botánica y hábitat

Arbusto o árbol de 2 a 4 m. Hojas compuestas, de 40 cm de largo, con 16 a 20 hojuelas de 5 a 12 cm de largo, peludas en el envés. Flores en inflorescencias largas y compactas con cinco sépalos, color naranja y 5 pétalos amarillos, de 1.5 cm de largo. Fruto en vaina, de 7 a 18 cm de largo, con dos alas. Se encuentra en regiones tropicales desde el sur de México hasta el norte de América del Sur (38).

2.4.2 Usos medicinales

La decocción de las hojas se utiliza para la diarrea y parásitos, así como para el tratamiento de enfermedades venéreas. La hoja machacada en cataplasma se usa en micosis interdigital (30,33). La planta se utiliza en el tratamiento de enfermedades parasíticas de la piel tales como prurito, eczema, pústulas. La infusión de la hoja seca se utiliza como purgante. También se usa como abortiva y en el trabajo de parto para apresurarlo. Se utiliza como antiinflamatorio, antifúngico, cicatriza heridas y tiene actividades antibacterianas (40).

2.4.3 Actividad antibacteriana

Un extracto de hoja seca mostró actividad bactericida contra gérmenes aislados de secreciones y por raspado, especialmente frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, los dermatofitos *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus niger* y la levadura *Candida albicans* (30).

2.4.4 Composición química

La planta contiene derivados antracénicos de aloemodina y reina. La hoja contiene las antraquinonas (aloe-emodina, ácido eusofánico, reina, dihidroximetil-antraquinona) taninos, haenferol, pero no contiene saponinas. El fruto contiene alcaloides, la hoja y la flor no contienen leucoantocianinas (30, 41, 42).

- 2.5 Familia: Rhamnaceae
 Nombre científico: *Gouania lupuloides* L.
 Nombre común: Bejuco amargo, Jaboncillo, Bejuco de Indio

2.5.1 Descripción botánica y hábitat

Arbusto trepador de hasta 10 m. Hojas aovadas a elípticas, agudas a acuminadas, de 4 a 10 cm, crenado-aserradas. Racimos de entre 5 y 10 cm, formando grandes panículas terminales; flores pequeñas, blancas, de hasta 3 cm. Fruto de 8 a 12 mm, glabro y 3-alado (30, 33, 37). Se encuentra de Chihuahua a Tamaulipas, Veracruz, Yucatán, Chiapas y Sinaloa y parte de Centro América (41).

2.5.2 Usos medicinales

La decocción de la hoja se utiliza contra gonorrea por la vía oral. El cocimiento de la planta se usa para fortalecer las encías y los tallos secos y en polvo se emplean para fabricar dentífricos, para lo cual se exportan a Europa. Las hojas se usan para la hidropesía y para las enfermedades del estómago (35).

2.5.3 Actividad

Las saponinas aisladas a partir de la planta mostraron actividad antimicrobiana *in vitro* contra gérmenes productores de afecciones odontopatógenas en el humano tales como *Actinobacillus*, *Actinomyces viscosum*, *Streptococcus mutans*, *S. aureus*, *S. pyogenes* (30).

2.5.4 Composición química

La planta contiene saponinas. La hoja contiene alcaloides (30, 43).

- 2.6 Familia: Simaroubaceae
 Nombre científico: *Quassia amara* L.
 Nombre común: Hombre grande, Limoncillo, Palo de hombre

2.6.1 Descripción botánica y hábitat

Arbusto grande o árbol pequeño, hasta 6 m de alto. Hojas grandes, 5 hojuelas, sésiles, membranosas, obovadas a oblongo-oblancoeladas, 9-15 cm de largo, agudas o corto acuminadas, largo atenuadas a la base, verde profundo encima, ligeramente pálidas abajo. Panículas delgadas, tan largas como las hojas, pocas flores, cáliz 2-3 mm de largo, segmentos ovados, obtusos, ciliados; pétalos 2.5-4.5 cm de largo, lineares, glabros, rojo o rosados; estambre más largos que la corola. Frutos en drupa oval y obovoide, 1.0-1.5 cm de largo, negros, toro rojo (31,44). Nativa o naturalizada en bosques secos o húmedos con poca penetración de luz, desde el sur de México hasta el norte de Sur América y Brasil en alturas hasta de 600 msnm, cultivada como ornamental en algunos lugares del Caribe y Sud

América, introducida en la India donde se cultiva como ornamental. En Guatemala se ha descrito en Izabal y Santa Rosa (31, 33).

2.6.2 Usos medicinales

El cocimiento del polvo de la madera se usa para tratar afecciones digestivas (diarrea, disentería, dispepsia, dolor de estómago), debilidad, diabetes, fiebre, gonorrea, malaria y durante la convalecencia, aplicado en forma de enema se usa para combatir parásitos intestinales como los oxiuros (31, 33, 36).

2.6.3 Actividad antibacteriana

Estudios antimicrobianos demuestran que la tintura de la madera seca de ramas finas provenientes de lugares soleados tiene actividad contra *C. albicans*, *S. typhi*, *S. aureus*, pero no contra *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. flexneri*; las ramas gruesas de la misma procedencia y las ramas finas y gruesas provenientes del sotobosque no mostraron actividad contra ningún microorganismo (30).

2.6.4 Composición química

La corteza contiene principios amargos del grupo de los cuasinoides, esteroides, alcaloides, aceite volátil, extracto gomoso, pectina, fibra, sales minerales. La corteza de la raíz contiene cuasina, aceite volátil, ácidos málico y gálico, tartrato de calcio y acetato de potasio (33, 42).

2.7 Familia: Verbenaceae
 Nombre científico: *Stachytarpheta cayennensis* L.
 Nombre común: Verbena, Cola de millo, Mozote, Verbena azul

2.7.1 Descripción botánica y hábitat

Hierba perenne de 6-12 cm de alto, algunas veces púrpura, pubescentes o glabras, tallo y ramas dicótomas, Hojas alternas u opuestas, algo carnosas cuando frescas, delgadas o membranosas, cuando secas oblongas a ovales u ovadas, 2-8 cm de longitud 1.2-5 cm de ancho. Espigas teretes, flores primero erectas, más tarde inmersas en las brácteas de la espiga. Corola hipocrateriforme azul, violeta o púrpura. Esta especie está distribuida en América tropical y subtropical, introducida en África, Asia y Oceanía (36, 44, 45, 47, 48). En Guatemala se encuentra en Alta Verapaz, Izabal, Petén (43).

2.7.2 Usos medicinales

La decocción de la planta se usa en disentería, vermífugo, inflamación. El jugo de la hoja se usa para lavados del ojo. En Alta Verapaz toman la decocción de la hoja como tratamiento para malaria y fiebres, diurético, gonorrea (33, 36, 47).

2.7.3 Actividad antibacteriana

No se encontró información.

2.7.4 Composición química

Se ha reportado la presencia de los siguientes compuestos ácido clorogénico, dopamina, N-dotriacontano, friedelina, hentriacontao e hispidulina. Las hojas contienen el ácido aminobutírico, ácido cafeico y dopamina (44, 45).

4 JUSTIFICACIONES

La gonorrea es una de las enfermedades de transmisión sexual con más incidencia en la población mundial por lo que es una de las enfermedades de declaración obligatoria más frecuentes en el mundo.

Un factor importante para el incremento de su prevalencia, es la aparición de cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a los antibióticos disponibles lo que justifica la búsqueda de nuevas drogas o medicamentos más efectivos y justificó en este trabajo, la utilización de tres cepas de *N. gonorrhoeae* de distintas sensibilidades y resistencias.

Como consecuencia del clima tropical y de la fertilidad de sus suelos, Guatemala posee una amplia variedad de flora de la cual sólo una pequeña parte se ha estudiado desde el punto de vista de su bioactividad.

Sabemos que la población guatemalteca utiliza plantas medicinales para el tratamiento de la gonorrea. El uso de estas plantas es tradicional, sin base científica pero existe confianza en ellas y su precio es mínimo. Por lo tanto, está justificado probar científicamente su verdadero poder terapéutico y así validar su uso; por lo que el presente estudio contribuye a determinar la actividad anti-*N. gonorrhoeae in vitro* de siete plantas utilizadas para el tratamiento tradicional de la misma.

Este estudio permite continuar las investigaciones iniciadas y así determinar sobre bases científicas el uso de las plantas medicinales como agentes antibacterianos. De validarse científicamente el uso de estas plantas, se logrará que en un futuro se use como una alternativa terapéutica que disminuya la dependencia de la utilización de productos importados.

5 OBJETIVOS

1. Generales

1.1 Validar científicamente la actividad anti *N. gonorrhoeae* de siete plantas usadas popularmente para el tratamiento de gonorrea.

2. Específicos

2.1 Adaptar una metodología de dilución en agar para demostrar la susceptibilidad *in vitro* de *N. gonorrhoeae* contra extractos vegetales.

2.2 Demostrar la actividad anti-*N. gonorrhoeae* de extractos de las plantas: *A. guatemalensis*, *C. alata*, *C. cujete*, *G. lupuloides*, *Q. amara* y *S. cayennensis*, usadas popularmente para el tratamiento de gonorrea en Guatemala.

2.3 Confirmar la actividad anti-*N. gonorrhoeae* en extractos con disolventes de polaridad decreciente de hojas de *B. orellana*, que demostró bioactividad en estudio previo.

2.4 Determinar la concentración inhibitoria mínima de los extractos vegetales que demuestren actividad.

6 HIPOTESIS

De las 7 plantas utilizadas para el tratamiento de enfermedades de transmisión sexual, al menos una inhibirá el crecimiento *in vitro* de *N. gonorrhoeae*.

7 MATERIALES Y METODOS

1 Universo de trabajo

Ciento una plantas utilizadas popularmente en Mesoamérica en el tratamiento de enfermedades de transmisión sexual.

2 Muestra

- 2.1 Percolaciones etanólicas de seis plantas utilizadas frecuentemente en el tratamiento de enfermedades de transmisión sexual, no estudiadas previamente y que estaban en flor en el momento de recolección, siendo éstas: *Acalypha guatemalensis*, *Cassia alata*, *Crescentia cujete*, *Gouania lupuloides*, *Quassia amara*, *Stachytarpheta cayennensis*. Y extractos hexánico, clorofórmico, metanólico y acuoso de una séptima planta, *Bixa orellana*, que demostró actividad contra *N. gonorrhoeae* en estudios preliminares.
- 2.2 Tres cepas de *N. gonorrhoeae* aisladas de pacientes del Dispensario Municipal # 3, proporcionadas por el Dr. Erwin R. Solórzano y tipificadas en el Hospital General de Enfermedad Común del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social, que mostraban diferentes patrones de resistencia a los antibióticos.

3 Recursos

3.1 Humanos

Investigadora: Dora Carolina De Matta Rodríguez
Asesor: Lic. Armando Cáceres Estrada

3.2 Institucionales

Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos FARMAYA, S.A.
Hospital General de Enfermedad Común del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social.
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

4 Materiales

4.1 Equipo

Balanza analítica
Campana bacteriológica
Autoclave
Rotavapor

Incubadora
Refrigeradora
Estufa eléctrica
Mechero bunsen

Gradillas	Asa de nicromo
Papel filtro Whatman No. 1	Tamiz
Pipetas automáticas de 5-40 y 40-200 µl	Pipetas graduadas de 2, 3, 5 y 10 ml

4.2 Materiales de laboratorio

Cajas cuadriplate de petri	Agitadores de vidrio
Embudo de vástago corto	ErlenMeyer de 250 y 500 ml
Jarra de vidrio con candela	Tubos de tapón de rosca
Frascos de color ámbar de 3 onzas	Beaker de 100, 500 y 1000 ml
Algodón	Papel filtro
Gasa	

4.3 Reactivos

Etanol al 35%	Hexano
Cloroformo	Metanol
Caldo tripticasa soya	Agar Muller-Hinton
Sangre de carnero desfibrinizada al 5%	Solución salina estéril
Suplemento I y II de Merck	Cristal violeta
Vaselina sólida	Solución de lugol
Safranina	H ₂ O ₂ al 30 %
Alcohol acetona	Agua desmineralizada

5 Procedimiento

5.1 Se investigó la información escrita, nacional e internacional, de las plantas utilizadas para el tratamiento de gonorrea en Mesoamérica en general y Guatemala en particular. Se detectaron 101 plantas, de las cuales 46 han sido analizadas previamente y siete que se escogieron según lo descrito anteriormente.

5.2 Preparación de las plantas

Se recolectaron, herborizaron y clasificaron las plantas. Se cortaron, lavaron, escurrieron y colocaron en secadores especiales los órganos específicos de las siete plantas identificadas que se utilizan en el tratamiento contra la gonorrea según lo informa la literatura y puede observarse en el Anexo 1. Se cortaron en trozos pequeños y/o molieron hasta obtener una consistencia uniforme. En el caso del morro se utilizó la parte interior del pericarpio del fruto fresco. Por último, se almacenó en bolsas plásticas, se selló e identificó.

5.3 Obtención de las tinturas vegetales

Para la obtención de la tintura vegetal por percolación se utilizó 10 g de la materia seca vegetal (Anexo 1) y se mezcló con 100 ml de etanol al 35 por ciento durante 24 horas. Se llevó a cabo la extracción en un percolador plástico de medio litro improvisado. En la boca del percolador se puso algodón y papel filtro para evitar el paso de material sólido al percolado. Al término de las 24 horas, se destapó y dejó gotear. Por último se esterilizó por filtración con membranas de papel filtro Whatman No. 1 para obtener el percolado final y se guardó en refrigeración. Siguiendo el mismo procedimiento se obtuvo el percolado de todas las plantas a excepción del morro, del que se utilizó la parte interior del pericarpio del fruto ya que ésta es la parte utilizada de la planta que la literatura informa y la forma como se usa popularmente. Para el procesamiento del morro, se preparó un cocimiento de 10 g de la parte interior del pericarpio del fruto con 100 ml de agua desmineralizada. Se hirvió durante 5 minutos y luego se filtró.

Para la confirmación de la actividad de *B. orellana* (achiote) se realizó una extracción a temperatura ambiente por percolación con disolventes de diferentes polaridades, como son hexano, cloroformo, metanol y agua. En el caso de *S. cayennensis*, se usaron esos extractos por contarse con ellos de un estudio anterior basado en otros microorganismos. Por la toxicidad y efectos farmacológicos de estos disolventes fue preciso concentrar los extractos, evaporando el disolvente a presión reducida y temperatura controlada (rotavapor) hasta alcanzar un estado de miel. En el caso del extracto acuoso se concentró por medio de liofilización.

De cada una de las tinturas y extractos se preparó una solución madre de 10 mg/ml y a partir de ésta se ensayó tres diluciones finales 2, 1 y 0.5 mg/ml con el medio de cultivo.

5.4 Preparación del inóculo

Se obtuvo tres cepas de *N. gonorrhoeae* procedentes de pacientes sintomáticos del Dispensario Municipal # 3. Se sembró en medio Thayer Martin, se incubó 72 horas a 35° C hasta obtener crecimiento. Se efectuaron pruebas confirmatorias; se observó el crecimiento bacteriano al microscopio con la coloración de Gram, se efectuó prueba de catalasa con H₂O₂ al 30 por ciento y se confirmó su género y especie por medio del sistema API NH. Este sistema está formado por 10 microtubos conteniendo sustratos de forma deshidratada, para realizar 12 pruebas de identificación (reacciones enzimáticas y fermentaciones de azúcares), así como la investigación de una penicilinas. Se efectuó el antibiograma a cada una de las cepas, se seleccionó tres cepas: una cepa sensible a la penicilina, otra resistente a la penicilina, y una tercera resistente a penicilina y tetraciclina. Se resembró en Agar Chocolate cada 72 horas. Para su conservación se preparó leche descremada al 10% estéril con un inóculo abundante individualmente para cada Neisseria, luego se congelaron alícuotas a -70° C. Por aparte, con cada una de las cepas se preparó 0.5 mililitros de solución salina estéril y a ésta se le agregó un inóculo abundante del cultivo para tener una suspensión concentrada y uniforme del gonococo listo para el ensayo de actividad antimicrobiana.

5.5 Establecimiento del Bioensayo

En todo el estudio se utilizó el medio Thayer Martin con suplemento I (contiene Vancomicina, Colistina y Trimetoprim como agentes selectivos para la inhibición de la flora perturbadora) y suplemento II (enriquecedores que favorecen el crecimiento de *Neisseria*) asegurando así un crecimiento puro. El método de dilución en agar para evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* se estableció de la siguiente forma:

- 5.5.1 Se preparó el medio Thayer Martin, (TM), en tubos de 4 ml, a estos se les agregó la suspensión de Penicilina para obtener tres diferentes concentraciones finales (10, 5 y 2.5 µg/ml), se mezcló bien. A éste le llamamos Agar-Antibiótico.
- 5.5.2 Se prepararon las cajas cuadriláteras, se depositó en un cuadrante únicamente el medio TM y en los otros tres cuadrantes el Agar-Antibiótico, cada dilución en un cuadrante. Se dejó enfriar y solidificar el medio. Se incubó las cajas por 24 horas como prueba de esterilidad. Luego se guardaron en bolsa plástica en refrigeración hasta el momento de su uso.
- 5.5.3 Se sembró por estrías la suspensión de *N. gonorrhoeae*, se incubó 48 horas en jarra con candela a 35° C, se observó el crecimiento en cada uno de los cuadrantes, y se interpretaron los resultados.

5.6 Reto Antibacteriano

- 5.6.1 Se preparó el medio TM en tubos de 4 ml, se agregó la tintura de la planta a ensayar en las diluciones correspondientes para obtener las concentraciones finales de 2, 1 y 0.5 mg/ml, a éste le llamamos Agar-Planta.
- 5.6.2 Se vertió en un cuadrante medio TM sin extracto como medio de control del crecimiento de la *N. gonorrhoeae*; en el caso de los extractos de hexano, cloroformo y metanol, se le agregó al medio de control 20 µl del solvente Dimetilsulfóxido (DMSO) que se utilizó como vehículo para los extractos que se encontraban en estado de miel. En los tres cuadrantes restantes, se vertió una dilución en cada uno. Se dejó enfriar y solidificar el medio. Se incubó las cajas por 24 horas como prueba de esterilidad, se guardaron en bolsa plástica en refrigeración hasta el momento de su uso.
- 5.6.3 La suspensión de cada una de las tres cepas de *N. gonorrhoeae* se sembró por estrías, en triplicado, se dejó reposar durante 5 a 10 minutos, se incubó 48 horas en jarra con candela a 35°C y se observó el crecimiento o inhibición del gonococo.

5.7 Interpretación de resultados

Se observó el crecimiento en las zonas de inoculación y se interpretó de la siguiente forma:

Hay inhibición del crecimiento:	Actividad positiva (+ = positivo)
No hay inhibición del crecimiento:	Actividad negativa (- = negativo)
Presencia de microorganismos fuera de la inoculación:	Contaminación

5.8 Determinación de la CIM

Se ensayó las primeras diluciones 2, 1 y 0.5 mg/ml y se continuó sucesivamente hasta 0.062 mg/ml.

5.8.1 Se preparó el medio TM en tubos de 4 ml, se agregó el extracto de la planta en las diluciones correspondientes para obtener las concentraciones finales.

6 Diseño Estadístico

La parte experimental se inició con el tamizaje de la tintura de cada planta. Cada extracto vegetal fue la unidad experimental en tres diferentes dosis que fueron las diluciones. Cada cepa de *N. gonorrhoeae* representó un tratamiento el cual se efectuó en triplicado. Y por último se determinó la CIM de los extractos que mostraron actividad inhibitoria.

Los resultados se analizaron por medio de una prueba binomial.

Ho: El extracto si tiene efecto inhibitorio.

Ha: El extracto no tiene efecto inhibitorio.

Análisis de Resultados:

Variable binomial: Éxito = inhibición (+)
Fracaso = no inhibición (-)

8 RESULTADOS

En base a la información bibliográfica, de las 101 plantas utilizadas popularmente en el tratamiento de gonorrea, se seleccionaron 6 aún no estudiadas y se escogieron por su amplio uso popular a nivel nacional e internacional para el tratamiento de gonorrea, abundancia en el país y posibilidad de obtención y caracterización en la época del año en que se efectuó el ensayo para demostrar su actividad anti-*N. gonorrhoeae*. Se obtuvieron tinturas etanólicas de las siguientes plantas: *A. guatemalensis*, *C. alata*, *C. cujete*, *G. lupuloides* y *Q. amara*. Se trabajó con extractos obtenidos fraccionadamente con disolventes de diferente polaridad de *S. cayennensis*.

Para confirmar su actividad se incluyó, bajo el mismo método de dilución en agar de este trabajo, a la séptima planta *B. orellana*, que ya había presentado actividad anti-*N. gonorrhoeae*. En el presente trabajo se utilizaron los extractos obtenidos fraccionadamente.

El método de dilución en agar utilizado en el presente estudio consistió en preparar el medio de cultivo, TM, y agregarle la tintura o extracto (todo en diferentes volúmenes según el ensayo a efectuar), mezclar bien y verterlo en el cuadrante que corresponde de la caja cuadrilata. El objeto de adaptar este método fue justificado porque las técnicas de difusión son útiles únicamente cuando las moléculas bioactivas son solubles en agua y por consiguiente difunden en el agar; un método de dilución evidenciará tanto moléculas solubles en agua como insolubles. Por otro lado, la consistencia de miel de los extractos obtenidos por fraccionamiento impide su adecuada impregnación en los discos de papel secante. Esta miel al entrar en contacto con el medio de cultivo caliente y agitación suave por inversión, se dispersó homogéneamente lo que aseguró resultados confiables y reproducibles. Esto se evidenció de la siguiente forma: se sembraron las cepas de *N. gonorrhoeae* en diferentes puntos de la caja de cultivo; en el caso de las plantas inhibidoras no hubo crecimiento en ninguna de las siembras; por el contrario, los extractos no inhibidores permitieron el crecimiento de *N. gonorrhoeae* en todas las inoculaciones. Esto dio la seguridad de haber obtenido una buena difusión del extracto vegetal en el medio.

Ya obtenidas las tinturas y extractos se procedió a la obtención de las cepas de *N. gonorrhoeae* a utilizar. Todas las cepas se aislaron en el medio TM, se seleccionaron en base a su sensibilidad a los antibióticos. De un promedio de 25 cepas de *N. gonorrhoeae* obtenidas desde el inicio del trabajo, se determinó que un 80% fueron productoras de β -lactamasa como lo demostraron las pruebas confirmatorias API NH efectuadas, ya que éstas investigan también la presencia de penicilinas. Se seleccionaron tres cepas por tener patrones de antibiograma diferentes, cuyos resultados se presentan en el cuadro siguiente.

ANTIBIOGRAMA DE LAS CEPAS USADAS DE *N. gonorrhoeae*

Número de Cepa	Antibióticos utilizados, diámetro de inhibición en milímetros						
	P	Te	CXM	CAZ	CRO	NOR	CTX
Cepa 1	0	2	35	34	37	30	38
Cepa 2	0	19	40	38	38	40	37
Cepa 3	24	26	42	36	38	34	36

P: Penicilina, Te: Tetraciclina, CXM: Cefuroxime, CAZ: Ceftazidima, CRO: Ceftriaxone, NOR: Norfloxacin, CTX: Cefotaxime.

Para lograr el objetivo de adaptar una metodología de dilución en agar para demostrar la susceptibilidad *in vitro* de *N. gonorrhoeae* se procedió al establecimiento del Bioensayo, se preparó el medio de TM, dejando un control sin antibiótico y los tres cuadrantes restantes con su respectiva concentración de 10, 5 y 2.5 µg/ml de penicilina y se procedió a sembrar por estrías en triplicado las suspensiones bacterianas; los resultados fueron los siguientes:

ESTABLECIMIENTO DEL BIOENSAYO ANTINEISSERIA

Número de Cepa	Inhibición del crecimiento de <i>N. gonorrhoeae</i> por la Penicilina			
	Medio TM Control	Medio TM 10 µg/ml P	Medio TM 5 µg/ml P	Medio TM 2.5 µg/ml P
Cepa 1	-	-	-	-
Cepa 2	-	-	-	-
Cepa 3	-	+	+	+

Hay inhibición del crecimiento: +

No hay inhibición del crecimiento: -

Seguidamente se procedió a efectuar el reto antibacteriano o sea la determinación de la acción anti-*N. gonorrhoeae* de las tinturas y extractos, usando las concentraciones de 2.0, 1.0 y 0.5 mg/ml de los extractos en el medio TM con tres repeticiones, tomando como positivos los extractos que inhibieron completamente el crecimiento de *N. gonorrhoeae* con relación al control de crecimiento (medio TM sin extracto), los resultados se presentan en el siguiente cuadro.

INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE *N. gonorrhoeae* EN EL AGAR-PLANTA

Tintura o Extracto	Parte usada	Disolvente de extracción	Control	Inhibición del crecimiento de <i>N. gonorrhoeae</i> en el Agar-Planta		
				Agar-Pl 2 mg/ml	Agar-Pl 1 mg/ml	Agar-Pl 0.5mg/ml
<i>A. guatemalensis</i>	Hoja	Etanol 35%	-	-	-	-
<i>B. orellana</i>	Hoja	Etanol 35%	-	-	-	-
		Hexano	-	+	+	+
		Cloroformo	-	+	+	+
		Metanol	-	+	+	-
		Agua	-	-	-	-
<i>C. aiara</i>	Hoja	Etanol 35%	-	-	-	-
<i>C. cufete</i>	Fruto	Etanol 35%	-	-	-	-
		Cocimiento	-	-	-	-
<i>G. lupuloides</i>	Hoja	Etanol 35%	-	-	-	-
<i>Q. amara</i>	Hoja	Etanol 35%	-	-	-	-
<i>S. cayennensis</i>	Hoja	Hexano	-	+	+	-
		Cloroformo	-	+	+	-
		Metanol	-	+	+	-
		Agua	-	-	-	-

Hay inhibición del crecimiento: +

No hay inhibición del crecimiento: -

Como puede observarse, los resultados fueron los mismos en las tres repeticiones, los extractos de *B. orellana* y *S. cayennensis* confirmaron y demostraron actividad anti-*N. gonorrhoeae*, respectivamente. En la última fase del estudio se determinó la CIM de los extractos positivos, disminuyéndose la concentración hasta que el extracto no presentó acción. Los resultados se observan en el cuadro siguiente:

**DETERMINACION DE LA CIM
DE LOS EXTRACTOS DE *B. orellana* Y *S. cayennensis***

Concentración del extracto mg/ml	<i>B. orellana</i>			<i>S. cayennensis</i>		
	Hexano	Cloroformo	Metanol	Hexano	Cloroformo	Metanol
1.0	+	+	+	+	+	+
0.9	+	+	-	+	+	-
0.8	+	+	-	+	+	-
0.7	+	+	-	+	-	-
0.6	+	+	-	-	-	-
0.5	+	+	-	-	-	-
0.4	+	-	-	-	-	-
0.3	+	-	-	-	-	-
0.25	+	-	-	-	-	-
0.125	-	-	-	-	-	-
0.062	-	-	-	-	-	-

Hay inhibición del crecimiento: +

No hay inhibición del crecimiento: -

9 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La gonorrea es el prototipo de las ETS y aunque la situación socioeconómica actual pareciera favorecer el aumento de esta enfermedad, los informes de gonorrea han disminuido principalmente a nivel de centros de salud y dispensarios municipales de la ciudad capital y Escuintla. Esto se observó durante el desarrollo del presente trabajo ya que por este motivo fue difícil obtener las diferentes cepas de *N. gonorrhoeae*.

Con una visión optimista, lo anterior podría deberse a que efectivamente los casos de gonorrea si han disminuido, a causa probablemente de las recomendaciones que incansablemente se han dado por la enfermedad del SIDA y que por cambios en las prácticas sexuales, otras son las enfermedades que han aumentado su incidencia como por ejemplo herpes.

Es necesario aclarar que la obtención de las muestras para este estudio se efectuó en el Dispensario Municipal # 3 en donde la mayoría de pacientes con gonorrea son mujeres trabajadoras del sexo. También se visitó periódicamente otros Centros de Salud y el Centro de Salud de Escuintla al cual acuden un promedio de 200 mujeres trabajadoras del sexo a la semana para su examen obligatorio de profilaxia. Basados en su trabajo, la opinión de estos médicos es que las trabajadoras del sexo no acuden al médico para su tratamiento y se automedican con la ayuda de los dependientes de farmacias. En el caso de las trabajadoras del sexo que acuden a los centros de salud para obtener su permiso de trabajo, se sospecha que antes del examen ellas se hacen duchas vaginales que dan resultados falsos negativos en los exámenes. De allí se origina una dificultad en la obtención de cepas de *N. gonorrhoeae* para estudio como sucedió en el presente trabajo.

En la búsqueda de las cepas de diferentes sensibilidades se observó que en mayor porcentaje se obtuvieron cepas productoras de β -lactamasa o sea resistentes a la penicilina, lo que confirma que la resistencia antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* ha aumentado principalmente a la penicilina. Sin embargo, no se obtuvieron cepas resistentes a los actuales tratamientos de elección como se evidenció en los antibiogramas realizados, lo que confirma que éstos son altamente efectivos, seguros y prácticos por su corta duración.

Entre las observaciones que se efectuaron en el aislamiento y manejo de las cepas de *N. gonorrhoeae*, podemos mencionar que: el medio de TM en tubo se conserva por más tiempo que en caja, pero el aislamiento de la bacteria se favorece más en caja ya que crece más abundante por condiciones de espacio. Hay cepas tan resistentes al ambiente que aún sin incubar la muestra tomada en las primeras 24 horas, todavía crecieron al tercer día de incubación. Sin embargo, también hay cepas que con todos los cuidados se aíslan colonias muy pequeñas y no se logra su resiembra.

En los diferentes Agar-Planta de extractos no inhibidores, las cepas de *N. gonorrhoeae* crecieron en igual forma sin diferencia entre ellas, con respecto a su sensibilidad particular a la penicilina y tetraciclina.

El método de dilución en agar, demostró ser reproducible y confiable. Por tener los extractos obtenidos con hexano, cloroformo y metanol consistencia de miel y ser insolubles en agua fue adecuada esta técnica, ya que esta miel, favorecida por la temperatura del medio, se dispersó homogéneamente en el mismo y con mayor razón los extractos etanólicos. La inhibición o no del crecimiento de *N. gonorrhoeae*, dependiendo del extracto que se ensayó, es igual en cualquier punto de siembra.

Ninguno de los extractos etanólicos y acuosos de las plantas estudiadas (*A. guatemalensis*, *B. orellana*, *C. alata*, *C. cujete*, *G. lupuloides*, *Q. amara* y *S. cayennensis*) presentaron actividad anti-*N. gonorrhoeae*. Sugiriéndose que el uso de estas plantas en el tratamiento de la gonorrea se deba a que puedan aliviar algunos síntomas de la enfermedad por medio de otras propiedades atribuibles a dichas plantas, es decir, que pudieran ser diuréticas o antiinflamatorias.

Al preparar el Agar-Planta con los extractos obtenidos con hexano, cloroformo y metanol se utilizó DMSO como un medio para solubilizar el extracto, ya que estos tienen consistencia de miel lo que dificulta su manejo. Para descartar cualquier influencia en el crecimiento de *N. gonorrhoeae* por parte del DMSO, se le agregó al medio del control. El crecimiento de *N. gonorrhoeae* en este medio fue normal.

Los extractos hexánicos tanto de *B. orellana* como de *S. cayennensis* fueron los que demostraron mayor actividad anti-*N. gonorrhoeae*. La CIM para *B. orellana* fue de 0.25 mg/ml y 0.7 mg/ml para *S. cayennensis*.

El extracto clorofórmico fue el segundo con mayor actividad para ambas plantas, siendo la CIM de 0.5 mg/ml para *B. orellana* y 0.8 mg/ml para *S. cayennensis*.

Por último, el extracto con metanol tuvo la menor actividad, con una CIM de 1.0 mg/ml para las dos plantas.

De lo anterior se deduce que las moléculas bioactivas son solubles en disolventes polares lo que indica que ésta es su naturaleza química. Dada la mayor actividad en los disolventes polares, podría concluirse que los principios activos son aceites esenciales, grasas u otros compuestos insolubles en agua.

La actividad anti-*N. gonorrhoeae* de las plantas *B. orellana* y *S. cayennensis* demuestran que pueden tener un espectro de inhibición amplio, ya que mostraron actividad contra cepas tanto sensibles a la penicilina y tetraciclina como resistentes a estos antibióticos.

Los resultados de la presente investigación confirmaron la hipótesis y objetivos planteados en vista que dos plantas demostraron actividad anti-*N. gonorrhoeae*. Estos hallazgos preliminares son estimulantes para continuar con un fraccionamiento bioguiado de los extractos que demostraron actividad, con el fin de elucidar la estructura molecular del compuesto responsable de la actividad anti-*N. gonorrhoeae*.

Los resultados permiten demostrar que el uso popular de algunas de estas plantas en el tratamiento de gonorrea, realmente tienen una actividad inhibitoria que podría justificar su uso y eventualmente propiciar la búsqueda de nuevos medicamentos para combatir este flagelo de la humanidad.

X CONCLUSIONES

1. Los extractos etanólicos de *A. guatemalensis*, *C. alata*, *C. cujete*, *G. lupuloides*, *Q. amara* y *S. cayennensis* no presentaron actividad anti-*N. gonorrhoeae* en ninguna de las dosis, 2.0, 1.0 y 0.5 mg/ml.
2. Se confirmó la actividad anti-*N. gonorrhoeae* de las hojas de *B. orellana* para los extractos obtenidos con hexano, cloroformo y metanol y la CIM obtenida fue de 0.25, 0.5 y 1.0 mg/ml respectivamente. Con los extractos etanólicos y acuosos no se obtuvo actividad.
3. Los extractos obtenidos con hexano, cloroformo y metanol de hojas de *S. cayennensis* demostraron actividad anti-*N. gonorrhoeae* y la CIM obtenida fue de 0.7, 0.8 y 1.0 mg/ml respectivamente. El extracto acuoso no presentó actividad.
4. El 100 % de cepas de *N. gonorrhoeae* utilizadas fueron sensibles a los extractos activos de hojas de *B. orellana* y *S. cayennensis*.
5. Los resultados obtenidos proporcionan validez científica al uso popular de *B. orellana* (achiote) y *S. cayennensis* (verbena) contra la gonorrea, pero aún hacen falta más estudios.

11 RECOMENDACIONES

1. Efectuar estudios epidemiológicos para determinar la verdadera incidencia de gonorrea en Guatemala.
2. Determinar el grado de resistencia a los antibióticos adquirida por las cepas de *N. gonorrhoeae* en Guatemala.
3. En vista de la labilidad de las cepas de *N. gonorrhoeae*, se recomienda perfeccionar los métodos de conservación de esas cepas.
4. Al resembrar un cultivo puro de *N. gonorrhoeae* se recomienda el medio TM pero solo con el suplemento II (enriquecedor)
5. Utilizar el método de dilución en agar para evaluar la actividad anti-*N. gonorrhoeae* de las plantas pendientes de estudio.
6. Realizar fraccionamiento bioguiado para elucidar el principio activo anti-*N. gonorrhoeae* de los extractos de *B. orellana* y *S. cayennensis*.
7. Efectuar ensayos pre-clínicos de los extractos que mostraron actividad anti-*N. gonorrhoeae* en el presente estudio, para evaluar la toxicidad, efectos secundarios, teratogénicos, diuréticos y otros.

12 BIBLIOGRAFIA

1. Hernández M. Grupos vulnerables de enfermedades sexualmente transmisibles en México. *Salud Pub. de México* 1995;37(5):510-513.
2. Valdespino-Gómez JL. Las enfermedades de transmisión sexual y la epidemia de VIH/Sida. *Salud Pub. de México* 1995;37(6):549-555.
3. Conde-González CJ. Gonorrea: la perspectiva clásica y la actual. *Salud Pub de México* 1997;39(6):573-579.
4. Gorwitz R, Nakashima, A. Sentinel Surveillance for Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* -United States, 1988-1991 *MMWR* 1993;42(3):29-39.
5. WHO Día mundial de la salud de 1997: las enfermedades infecciosas emergentes. *Rev Panam Salud Publica* 1997;1(6):476-481.
6. Síntes J. *Cúrate con las plantas medicinales; Prontuario de Medicina Vegetal.* Barcelona: Editorial Síntes, 1976. 954p.
7. Cáceres A. *et al.* Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. *J. Ethnopharmacol.* 1995;48:85-88.
8. *Tramil. Hacia una farmacopea caribeña.* Fort de France, Martinica Editorial Emile Desormeaux. 1995. 696p.
9. Holmes K. *et al* *Sexually transmitted diseases* Seattle, USA:McGraw Hill, 1984. 1079p.
10. Lennette E. *Manual of clinical microbiology.* 4 ed. Washington, D.C.:1985;1149p.
11. Benenson A. *Manual para el control de las enfermedades transmisibles.* 16 ed. Washington: Publicación Científica OPS, 1997;2:564-541.
12. Chit L, Vandana R, Tapsall J. Genetic Diversity of *Neisseria gonorrhoeae* IB-2 and IB-6 isolates revealed by whole-cell repetitive element sequence-based PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1996;34(2):292-295.
13. Herrmann B, Nystrom T, Wessel H. Detection of *Neisseria gonorrhoeae* from Air Dried Genital Samples by Single-Tube Nested PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1996;34(10):2548-2551.

14. Iwen P. *et al.* Evaluation of Nucleic Acid-Based Test (PACE 2C) for simultaneous Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Endocervical Specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1995;33(10):2587-2591.
15. Bassiri M. *et al.* Multiplex Amplicolor PCR Screening for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Women attending non-sexually transmitted disease clinics. *J. Clin. Microbiol.* 1997;35(10):2556-2559.
16. Koay A, Rohani M, Cheong Y. Auxotypes and Serogroups of Tetracycline-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* Isolated in Malaysia. *J. Clin. Microbiol.* 1996;34(7):1863-1865.
17. Kim R. *et al.* Prevalence of Fluorescent Monoclonal Antibody-Nonreactive *Neisseria gonorrhoeae* in Five North American Sexually Transmitted Disease Clinics. *J. Clin. Microbiol.* 1996;35(6):1551-1552.
18. Ching S. Ligase Chain Reaction for Detection of *Neisseria gonorrhoeae* in Urogenital Swabs. *J. Clin. Microbiol.* 1995;33(12):3111-3115.
19. Hook E. Diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* Infections in Women by Using the Ligase Chain Reaction on Patient-Obtained Vaginal Swabs. *J. Clin. Microbiol.* 1997;35(8):2129-2132.
20. Kimberly A. Detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in Genitourinary Specimens from Men and Women by a Coamplification PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 1997;35(6):1536-1540.
21. Harbec P, Turcotte P. Preservation of *Neisseria gonorrhoeae* at -20°C . *J. Clin. Microbiol.* 1996;34(5):1143-1146.
22. Gromyko AI. Sexually transmitted diseases (STDs) epidemic in eastern Europe: a call for help! *OPS. Revista Panamericana de la Salud Pública.* 1997;1(5):330-332.
23. Mehaffey P. *et al.* Evaluation of *In Vitro* Spectra of Activity of Azithromycin, Clarithromycin, and Erythromycin Tested against Strains of *Neisseria gonorrhoeae* by Reference Agar Dilution, Disk Diffusion, and Etest Methods. *J. Clin. Microbiol.* 1996;34(2):479-481.
24. Kam K. *et al.* Detection of Quinolone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.* 1996;34(6):1462-1464.
25. Deguchi T. *et al.* Rapid Screening of Point Mutations of the *Neisseria gonorrhoeae* *parC* Gene Associated with Resistance to Quinolones. *J. Clin. Microbiol.* 1997;35(4):948-950.

26. Biedenbach D, Jones R. Comparative Assessment of Etest for Testing Susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* to Penicillin, Tetracycline, Ceftriaxone, Cefotaxime, and Ciprofloxacin: Investigation Using 510 (k) Review Criteria, Recommended by the Food and Drug Administration. *J. Clin. Microbiol.* 1996;34(12):3214-3217.
27. Volak J, Stodola J. *El gran libro de las plantas medicinales*. 5 ed. Madrid, España: Susaeta Ediciones, 1995. 319p.
28. Arteche A. *et al.* *Fitoterapia: Vademecum de Prescripción*. Bilbao, España: Cita Publicaciones y Documentación, 1992. 835p.
29. Cáceres A. *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Guatemala: Editorial Universitaria, 1996. 402 p.
30. Tramil. *Hacia una Farmacopea Caribeña*. Fort de France, Martinica Editorial Emile Desormeaux. 1996. 661p.
31. Standley PC. *Flora of Yucatan*. Chicago: Field Museum of Natural History, 1930. 492p.
32. Weniger B, Robineau L. *Elementos para una Farmacopea caribeña*. La Habana, Cuba: Seminario TRAMIL 3, Enda Caribe. 1988. 318p.
33. Morton JF. *Atlas of Medicinal Plants of Middle America, Bahamas to Yucatán*. Illinois, USA: Charles C. Thomas Publisher, 1981. 1420p.
34. Díaz JL. *Usos de las plantas medicinales de México*. México: IMEPLAN, 1977. 329p.
35. Martínez MA. *Las plantas medicinales de México*. 4ª ed. México: Ediciones Botas 1959. 657p.
36. Standley PC. *Flora of Guatemala*. Fieldiana: Botany, 1952. 490p.
37. Mendieta RM, Del Amo S. *Plantas medicinales del estado de Yucatán*. México: Compañía Editorial Continental. 1981. 428p.
38. Handy C, Sutherland N. *Plantas comunes de Honduras*. Tegucigalpa, Honduras: Editorial Universitaria. 1986. 438p.
39. Villar R. *et al.* Screening of 17 Guatemalan Medicinal Plants for Platelet Antiaggregant Activity. *Phytotherapy Research*. 1997;11:441-445.

40. Ogunti EO, Aladesammi A.J, Adesanya S. A. Antimicrobial Activity of *Cassia alata*. *Fitoterapia*. 1991;62:333-337.
41. Chonsoy F. Flora Salvadoreña. 2ª ed. El Salvador: Editorial Universitaria, 1976. Tomo 1 Vol 2 100p.
42. Núñez E. Plantas medicinales de Costa Rica y su folklore. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica. 1986. 520p.
43. Arvigo R. Rainforest remedies, One hundred healing herbs of Belize. Belize: Lotus Press. 1993 221p.
44. House P, Lagos-Witte S. Manual popular de 50 plantas medicinales de Honduras. Honduras Litografía López. 1989. 134p.
45. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Editor Gupta Mahabir. 1995. 617p.
46. Longworth C. The Vegetation of Petén. Washington, USA: Carnegie Institution Ed, 1937. 244p.
47. Mesia S. *et al.* Inhibition of Gastric Acid Secretion by the Aqueous Extract and Purified Extracts of *Stachytarpheta cayennensis*. *Planta Medica*. 1997;63:36-39.
48. Moreno N. Glosario Botánico Ilustrado. México: Editorial Continental. 1984. 300p.

ANEXOS

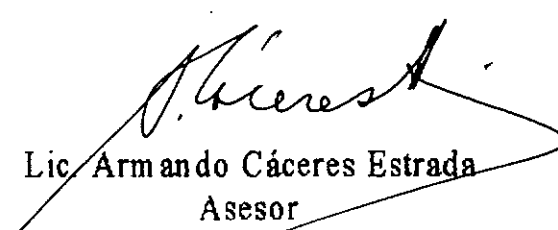
ANEXO I

PLANTAS SELECCIONADAS Y LA PARTE UTILIZADA EN EL ESTUDIO

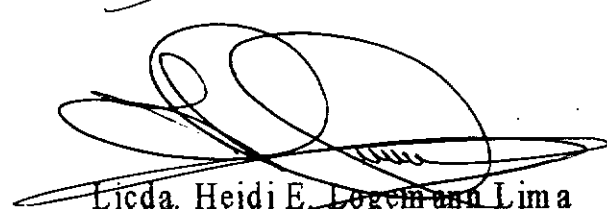
NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE POPULAR	PARTE UTILIZADA	NUMERO DE HERBARIO
<i>Acalypha guatemalensis</i> P.	Hierba del Cáncer, Ccul, Corrimiento, Gusanillo	Hoja	400
<i>Bixa orellana</i> L.	Achiote, Aneto, Bija, Ox	Hoja	344
<i>Cassia alata</i> L.	Barajo, Sambrano, Bruja, Sorocontil	Hoja	154
<i>Crescentia cujete</i> L.	Morro, Güira, Jicara, Hom	Parte interior del epicarpio del fruto	610
<i>Gouania lupuloides</i> L.	Bejuco amargo, Jaboncillo, Bejuco de indio	Hoja	Pendiente
<i>Quassia amara</i> L.	Hombre grande, Limoncillo, Palo de Hombre	Hoja	480
<i>Stachytarpheta cayennensis</i> L.	Verbena, Cola de millo, Mozote, Verbena azul	Hoja	501



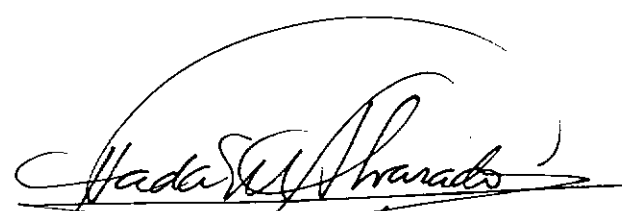
Dora Carolina De Matta Rodríguez
Autora



Lic. Armando Cáceres Estrada
Asesor



Licda. Heidi E. Logemann Lima
Directora



Licda. Hada M. Alvarado Beteta
Decana

