

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD CONTRA *Campylobacter jejuni*  
POR EXTRACTOS ETANÓLICOS DE CINCO PLANTAS  
UTILIZADAS POPULARMENTE PARA EL TRATAMIENTO DE  
AFECCIONES GASTROINTESTINALES EN REGIONES CÁLIDAS  
DE GUATEMALA**

Christian Samuel Álvarez Privado

Químico Biólogo

Guatemala, Mayo de 2007

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD CONTRA *Campylobacter jejuni* POR  
EXTRACTOS ETANÓLICOS DE CINCO PLANTAS UTILIZADAS  
POPULARMENTE PARA EL TRATAMIENTO DE AFECCIONES  
GASTROINTESTINALES EN REGIONES CÁLIDAS DE GUATEMALA**

Informe de Tesis

Presentado por

Christian Samuel Alvarez Privado

Para optar al título de

Químico Biólogo

Guatemala, Mayo de 2007

## **JUNTA DIRECTIVA**

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urízar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Ángel Damián Reyes Valenzuela	Vocal IV
Br. Ángel Jacobo Conde Pereira	Vocal V

## **ACTO QUE DEDICO**

**A Dios.** Ser supremo y creador de todas las cosas, quien nos envía al mundo con un propósito especial.

**A mis padres.** A quienes amo profundamente, ejemplos incansables de honradez, rectitud, trabajo y determinación, todo lo que soy, lo soy por ellos, y este triunfo se los dedico especialmente a ellos.

**A mi hermano.** Por ser un ejemplo en mi camino, le agradezco sus consejos, apoyo y cariño.

**A mi familia en general.** Agradezco por estar en todo momento conmigo, gracias por apoyarme y ser parte de mi vida.

**A mis amigos.** Por su amistad, apoyo y por compartir buenos y malos momentos.

**A Puerto Barrios.** Tierra bendita que me vió nacer, y hoy es un orgullo para mi dedicar este triunfo.

**Y a todas las personas.** Que han estado conmigo y me han brindado incondicionalmente todo su apoyo, cariño y bondad, también va dedicado este triunfo.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Universidad de San Carlos de Guatemala.** Bendita casa de estudios, la cual me enorgullece profundamente haber estado en esta institución.

**A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.** Agradezco la formación que se me dio. Me enorgullece también el haber estado en sus aulas, y espero poner en alto el nombre de tan prestigiosa facultad.

**A mis catedráticos.** Por su dedicación, apoyo, entrega y ejemplo de buenos profesionales.

**Al Departamento de Citohistología.** A todo el personal les agradezco su apoyo, confianza y amistad.

**A la asesora. M.A. Margarita Paz de Ramírez.** Por haberme guiado en el desarrollo de esta investigación, por su dedicación y confianza depositada en mi persona.

**A los revisores: Licda. Rosario Hernández y Licda. Isabel Gaitán.** Por su valiosa colaboración en la revisión de éste documento, y por el apoyo brindado.

## INDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	2
III.	ANTECEDENTES	
	A. Clasificación	4
	B. Características microbiológicas y bioquímicas	4
	C. Fisiología microbiana y estructura	5
	D. Mecanismos de patogenicidad	5
	E. Períodos de la infección	6
	F. Epidemiología	6
	G. Manifestaciones clínicas	7
	H. Diagnóstico	9
	I. Terapéutica	11
	J. Resistencia de <i>Campylobacter</i> a los antibióticos	11
	K. Uso popular de plantas	12
	1. Sustancias con acción antimicrobiana	12
	2. Utilización de plantas medicinales	13
	3. <i>Bixa orellana</i> L.	14
	4. <i>Chrysophyllum cainito</i> L.	16
	5. <i>Crataegus pubescens</i> (Kunth) Steudel	18
	6. <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.	21
	7. <i>Lippia graveolens</i> HBK	23
	L. Búsqueda de actividad contra <i>Campylobacter spp.</i>	25
IV.	JUSTIFICACIÓN	27
V.	OBJETIVOS	28
VI.	HIPÓTESIS	29
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	30
VIII.	RESULTADOS	38
IX.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	41

X.	CONCLUSIONES	43
XI.	RECOMENDACIONES	44
XII.	REFERENCIAS	45
XIII.	ANEXOS	51

## I. RESUMEN

Las infecciones por *Campylobacter jejuni* son una de las causas más frecuentes de diarreas bacterianas en niños y personas inmunosuprimidas, en quienes se hace necesario el tratamiento con agentes antimicrobianos. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos agentes ha llevado a una creciente tasa de resistencia a los mismos. Es por esta situación, sumado al creciente número de infecciones por este microorganismo, que hace necesaria la investigación de alternativas terapéuticas que sean accesibles, seguras y eficaces.

El presente estudio propuso evaluar la actividad anti-*C. jejuni* de la hoja de *Bixa orellana* L. (achiote), *Chrysophyllum caimito* L. (caimito), *Guazuma ulmifolia* Lam. (caulote) y *Lippia graveolens* HBK (orégano), así también del fruto de *Crataegus pubescens* (Kunth) Steudel (manzanilla), plantas que son encontradas regularmente en regiones cálidas de Guatemala y que se utilizan popularmente para el tratamiento de afecciones gastrointestinales.

La metodología empleada para estimar la actividad anti-*C. jejuni* fue un bioensayo basado en la técnica de difusión en agar con discos impregnados con los extractos vegetales descrito por Fernández; utilizando para el ensayo la cepa ATCC 33291 de *C. jejuni* y dos aislamientos clínicos de la misma bacteria. Así mismo, se validó el método empleado mediante una curva de susceptibilidad, enfrentando el microorganismo a diferentes concentraciones del antimicrobiano de elección (eritromicina).

Los resultados de los ensayos mostraron ausencia de actividad inhibitoria contra la cepa ATCC y aislamientos clínicos de *C. jejuni* en los cinco extractos de plantas que fueron estudiados ( $p < 0.05$ ). Los resultados no favorecen el uso de dichas plantas para que sean utilizadas como alternativa terapéutica en infecciones por *C. jejuni*. Sin embargo se recomienda continuar con la búsqueda de actividad antimicrobiana con otras plantas utilizadas popularmente como antidiarreicas y que aún no han sido evaluadas.

## II. INTRODUCCIÓN

En Guatemala las enfermedades diarreicas continúan siendo un problema de salud pública que aqueja a la mayoría de la población, particularmente a la infantil, debido a que en nuestro país las condiciones sanitarias y nutricionales son deficientes, haciendo propicia la propagación de diferentes agentes patógenos que provocan infecciones gastrointestinales. Los agentes etiológicos bacterianos de la diarrea son varios, entre ellos: *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* y *Campylobacter sp.* (1).

Las infecciones por *Campylobacter jejuni* son de las causas más frecuentes de diarrea bacteriana en países en vías de desarrollo y su tasa de infección ha aumentado, con cifras que exceden muchas veces a los casos de salmonelosis y shigelosis (2).

La infección por *Campylobacter* es autolimitante en la mayoría de los casos de adultos y generalmente no se recomienda aplicar terapia antimicrobiana. Sin embargo, en niños menores de 5 años y en pacientes inmunosuprimidos, en quienes la infección puede ser severa, se hace necesaria la administración de agentes antimicrobianos, como eritromicina, tetraciclina y ciprofloxacina. No obstante, a causa del uso indiscriminado de éstos, la tasa de resistencia desarrollada por *C. jejuni* ha aumentado, existiendo varios reportes alrededor del mundo sobre tal incremento en los últimos años (1,3).

Ante este problema, en Guatemala se ha planteado a la etnomedicina y el uso de plantas medicinales como alternativa terapéutica. Investigaciones realizadas por Cáceres y colaboradores, han demostrado la actividad antimicrobiana de extractos de plantas utilizados popularmente para tratar infecciones por microorganismos enteropatógenos (4).

En la actualidad se desconoce el poder inhibitorio contra *Campylobacter* de una diversidad de plantas que son utilizadas popularmente como antidiarreicas, debido a la falta de estudios sobre el tema principalmente por la dificultad que representa su aislamiento (3).

El presente trabajo pretendió investigar la actividad de las plantas: *Bixa orellana* L. (achiote), *Chrysophyllum caimito* L. (caimito), *Crataegus pubescens* (Kunth) Steudel (manzanilla), *Guazuma ulmifolia* Lam. (caulote) y *Lippia graveolens* HBK (orégano), frente al crecimiento de *C. jejuni*.

Se determinó la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos etanólicos de las cinco plantas por el método de difusión en agar, en dos aislamientos clínicos y una cepa ATCC de *C. jejuni* (3).

### III. ANTECEDENTES

#### A. CLASIFICACIÓN

Los miembros del género *Campylobacter* son bastoncillos curvos Gram negativos con rasgos similares a las de los géneros *Arcobacter*, *Flexispira*, *Helicobacter* y *Wolinella*. Este género ha sido objeto de amplia investigación en los últimos años y ha pasado de ser un género con cinco especies, descritas en el Manual de Bergey en 1984, a uno con trece especies reconocidas oficialmente en la actualidad: *C. fetus* subesp. *fetus*, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lariidis*, *C. pyloridis*, *C. concisus*, *C. sputorum* subesp. *sputorum*, las cuales han sido relacionadas con el hombre, y *C. sputorum* subesp. *bulbulus*, *C. mucosalis*, *C. nitrofigilis*, *C. hyointestinalis*, *C. cryaerophil* y *C. fetus* subesp. *veneralis* (2,5,6).

#### B. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS

Las especies de *Campylobacter* son microaerófilas y cada microorganismo tiene un solo flagelo polar, por lo que son móviles. Los microorganismos se cultivan en medios especiales a 42°C con atmósfera de 5% de oxígeno, 10% de dióxido de carbono, y 85% de nitrógeno (6).

Microscópicamente, estas bacterias son bacilos Gram negativos, curvos, espiralados, en forma de S, o “alas de gaviota”, de 0.2-0.9 µm de ancho por 0.5-5 µm de largo, lo cual significa que es mucho más delgado que la mayoría de las bacterias que aparecen en las heces. Además no son esporoformadores. En cultivos viejos, aireados y en condiciones subóptimas, toman forma esférica o cocoide. En agar selectivo tienen apariencia húmeda y son de color gris-blanco o gris-cremoso (3,7).

Las distintas especies de *Campylobacter* se diferencian por su actividad de catalasa, producción de ácido sulfhídrico, susceptibilidad al ácido nalidíxico y a la cefalotina, hidrólisis del hipurato y resistencia al cloruro de trifeniltetrazolio. No fermenta ni oxida los carbohidratos. Las especies más comúnmente asociadas a enfermedad diarreica en humanos son las termófilas, que crecen a 42-43°C y 37°C, pero no a 25°C. (3,6).

Son bacterias zoonóticas y sus principales reservorios son animales tales como conejos, roedores, aves silvestres, ovejas, vacas, cerdos, aves de corral y mascotas domésticas (6).

### **C. FISIOLÓGÍA MICROBIANA Y ESTRUCTURA**

La estructura de la pared del *Campylobacter* es típica de un bacilo Gram negativo. El antígeno principal de este género es el lipopolisacárido de la membrana externa. La heterogeneidad serológica de *C. jejuni* no es rara, ya que se conocen más de 60 antígenos polisacáridos O somáticos y 50 antígenos capsulares o flagelares. De acuerdo con las características morfológicas y el análisis de los ácidos grasos celulares (8).

### **D. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD**

La patogénesis de la enfermedad gastrointestinal producida por *C. jejuni* aún no ha sido bien definida. La enfermedad se caracteriza por la destrucción de las superficies mucosas del yeyuno (tal y como indica su nombre), íleon y colon. La superficie mucosa aparece edematosa y sanguinolenta. El examen histológico muestra ulceración de la superficie mucosa, abscesos crípticos en las glándulas epiteliales e infiltración de la lámina propia, con neutrófilos, células mononucleares y eosinófilos. Este proceso inflamatorio indica la invasión del tejido intestinal por el organismo (8).

Este microorganismo debe penetrar por vía oral, estimándose la dosis infectante en  $10^5$  unidades formadoras de colonia (UFC), a pesar de que 500 microorganismos ingeridos con leche pueden conducir a las manifestaciones clínicas. No obstante la ingestión de  $10^4$  UFC por voluntarios les ocasiona raramente alteraciones intestinales. Sin duda, la dosis infectiva estará condicionada por el alimento o líquido que lo vehícula, y por la fisiología gástrica del individuo (2).

La diarrea acuosa se debe a que *C. jejuni* produce una enterotoxina termolábil, semejante a la colérica, cuyo control genético es plasmídico. También se han aislado toxinas citopáticas de este microorganismo (2,8).

La presencia de sangre y leucocitos en las heces diarreicas indica que *C. jejuni* tiene capacidad enteroinvasiva y que hay afectación cólica. Konkel propuso un modelo de

invasión celular que propone que *C. jejuni* se une a las células del hospedero por factores de adhesión (CadF y PEB1). Según este modelo de internalización después de la adhesión ocurre una síntesis de unas 14 nuevas proteínas, seguida de la entrada de la bacteria a la célula entérica y un rearrreglo en el citoesqueleto de la misma. Luego hay una secreción y translocación de algunas de las proteínas nuevas en el citoplasma de la célula, agregación de receptores de integrina en su citoplasma, iniciando una cascada de eventos de señalización en el hospedero: liberación de citocinas, especialmente la interleucina-8 (IL-8) y una migración de linfocitos y células fagocíticas al sitio de infección (2,3,9).

## **E. PERÍODOS DE LA INFECCIÓN**

La enteritis tiene un período de incubación de dos a cinco días, aunque puede llegar a 10 u 11 y suele ser autolimitante. Existe un período prodrómico que dura de algunas horas a pocos días y se caracteriza por manifestaciones inespecíficas con malestar, dolor de cabeza, fiebre, anorexia, mialgias y artralgias, que aparecen en la mitad de los casos, fundamentalmente en los agudos (2).

El período diarreico o agudo se caracteriza por la aparición de una diarrea profusa, que se acompaña de dolor abdominal, malestar y fiebre. Las heces son líquidas o acuosas y a los dos o tres días pueden contener sangre. Pueden existir vómitos, y en los niños la fiebre y el dolor suelen ser menos frecuentes (2).

En el período de recuperación puede haber deshidratación si la diarrea ha sido intensa y ésta desaparece en dos o tres días, quedando el paciente debilitado. A veces queda un dolor abdominal persistente, que va desapareciendo (2).

## **F. EPIDEMIOLOGÍA**

Las campilobacteriosis constituyen una zoonosis de distribución mundial, que afecta con mayor incidencia a los países en vías de desarrollo. Es probable que las campilobacterias constituyan la principal causa de gastroenteritis en el hombre, por delante incluso de salmonelas y shigelas (2).

La mayor parte de las infecciones por *Campylobacter* se adquiere por ingerir leche no tratada, productos de ave y agua contaminada con heces de animales pero también por manipuladores portadores, además se ha demostrado que la madre transmite el microorganismo al feto y recién nacido por vía placentaria o vaginal. Aunque la leche no tratada es fuente común de infecciones por *C. jejuni* y *Salmonella*, los microorganismos *Campylobacter*, a diferencia de los microorganismos *Salmonella*, no se multiplican en la leche. Investigaciones que se realizaron en Estados Unidos con pollos muertos almacenados demostraron que cerca de 33% está infectado con *Campylobacter* y sólo 3.5% lo está con *Salmonella*. La carne de res y de puerco no se infecta con *Campylobacter* tal vez porque el microorganismo se desarrolla mejor a temperaturas corporales altas, como las que presentan las aves (2,6,10,11).

Los seres humanos con infección activa por *Campylobacter* son fuente de infección. En Estados Unidos los portadores son poco frecuentes. Sin embargo en países en vías de desarrollo hasta un 40% de los niños de una muestra portan *C. jejuni* sin síntomas de diarrea (6).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), en Guatemala la tasa de aislamiento de esta bacteria en niños menores de cinco años es de 12.1%, tasa similar a la encontrada hace veinte años por Cruz y Torres en diferentes lugares del país. Estos resultados son comparables con otros estudios similares en Latinoamérica; la frecuencia mundial de aislamientos a partir de coprocultivos varía del 4 al 30%. Sin embargo, debido a que su aislamiento requiere de un medio de cultivo y condiciones de incubación especiales, su búsqueda no se efectúa rutinariamente, lo cual debería realizarse debido a su importancia epidemiológica (12,13,14).

## **G. MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

La enteritis producida por este microorganismo se caracteriza por dolor abdominal, cólico, diarrea sanguinolenta, escalofríos y fiebre. Durante el punto álgido de la enfermedad, pueden producirse diez o más deposiciones diarreicas al día y aparecer además sangre en las heces. El cuadro entérico, puede manifestarse con otros componentes sindrómicos, si bien con más rareza. El cuadro de dolor abdominal con o sin fiebre y sin

diarrea, es similar a un cuadro de apendicitis aguda (pseudoapendicitis), enfermedad inflamatoria intestinal, adenitis mesentérica o perforación intestinal. En otras ocasiones se manifiesta como una colitis aguda. A veces, la sintomatología se manifiesta tan sólo por fiebre (2,5,8).

Aunque la enteritis y los síndromes diarreicos aún son las manifestaciones más frecuentes de las infecciones producidas por *Campylobacter*, en los últimos años han surgido otras enfermedades. Se publicaron casos de artritis séptica, meningitis y proctocolitis producidos por *C. jejuni* (5).

Existen varias comunicaciones que asocian la infección por *C. jejuni* con el síndrome de Guillain-Barré (SGB), enfermedad desmielinizante aguda de los nervios periféricos, caracterizado por una parálisis flácida aguda. El mecanismo propuesto es una similitud molecular entre los lipopolisacáridos bacterianos y ciertos epitopos relevantes en el tejido nervioso periférico. Los datos provenientes de estudios serológicos y de cultivo muestran que entre el 20% y el 40% de los pacientes con SGB se infectaron con *C. jejuni* entre una y tres semanas antes de la aparición de los síntomas neurológicos. No existe relación entre la gravedad de los síntomas gastrointestinales y la probabilidad de desarrollar SGB después de la infección por *C. jejuni*; en efecto, incluso las infecciones asintomáticas pueden desencadenar un SGB (3,5).

Los pacientes con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida (SIDA), cursan a menudo con diarrea y bacteremia asociadas a *Campylobacter* spp. Las especies aisladas incluyen a *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, *Arcobacter butzleri*, *Helicobacter fennelliae* y *H. cinaedii*. Así mismo se han observado crecientes cifras de resistencia antibiótica y de infecciones recurrentes en estos grupos de pacientes. Por la creciente incidencia de VIH/SIDA en los países en desarrollo y el aumento de casos en niños menores de 5 años, este grupo se encuentra a riesgo, entre otros, de una enteritis por *Campylobacter*. De igual manera, el número de casos de campilobacteriosis en la población adulta con inmunidad alterada va en aumento a causa de la epidemia VIH/SIDA (3,16).

## **H. DIAGNÓSTICO**

### **1. Muestras**

Las muestras habitualmente utilizadas en los procedimientos diagnósticos son las heces o hisopos rectales. Cuando se sospeche bacteremia, se toma sangre y las muestras adecuadas en infecciones localizadas. Por la susceptibilidad de *C. jejuni* a condiciones de estrés ambiental, tales como temperatura ambiente (20-25°C), oxígeno y deshidratación, las muestras de donde se desea aislar deben ser manejadas apropiadamente y examinadas lo más pronto posible (2,3).

### **2. Identificación presuntiva en heces**

Es posible hacer un diagnóstico presuntivo de enteritis por *Campylobacter* si se observan las características: formas curvas, Gram negativas, en forma de S, en ala de gaviota o en largas espirales en preparados teñidos con Gram, realizados a partir de heces diarreicas. Se debe buscar además leucocitos polimorfonucleares y eritrocitos. En fresco, se observa la movilidad del microorganismo debida al flagelo polar (2,5).

La visión de abundantes leucocitos junto a bacilos Gram negativos pequeños y curvos sugiere la existencia de una enteritis por *Campylobacter* (2).

### **3. Cultivo**

El aislamiento de *C. jejuni* se realiza mediante el enriquecimiento de medios selectivos que contengan sangre y diversos antibióticos: Agar desoxicolato carbón y cefoperazona (CCDA), medio Campy BAP, agar Butzler, agar Skirrow, agar Preston, agar Columbia con 7.5% de sangre de carnero, e incubado a 42°C y a 37°C en condiciones microaerofílicas por 40 a 48 horas, aunque la incubación puede requerir 24 horas más (3,17,18).

En el 2001, Gonzáles describió que el método de filtración por membrana es de gran ayuda para obtener una mejor recuperación del microorganismo a partir de muestras clínicas, además de ser un método muy sensible, no requiere de medios de cultivo selectivos para efectuarlo, ni tampoco de incubadoras con temperatura de 42°C (1).

#### **4. Morfología colonial**

Las colonias de *Campylobacter* en agar sangre o en agar para anaerobios fastidiosos son de apariencia traslúcida y húmeda. En medio CCDA son grises blanquecinas y húmedas. Pueden aparecer como una capa de crecimiento sobre la superficie del agar (3,17,18).

#### **5. Identificación**

La identificación primaria se hace por su apariencia microscópica: bacilos móviles en forma de tirabuzón, Gram negativos, curvos, espiralados o en forma de "S". Como colorante de contraste debe usarse carbol-fucsina al 10%, en vez de safranina (3,17,18).

La siguiente prueba es la de oxidasa, ya que las especies de *Campylobacter* son positivas a esta prueba. Si una colonia fenotípicamente parece *Campylobacter* pero es oxidasa negativa, debe hacerse un subcultivo y repetir la prueba 24 horas después de incubación (3,17,18).

Las pruebas bioquímicas para la identificación de *C. jejuni* se basan en las siguientes características: incapacidad de fermentar u oxidar la glucosa, habilidad de hidrolizar el hipurato y reducir los nitratos, incapacidad de crecer en cloruro de sodio (NaCl) al 3.5%, producción de ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) en medio con cisteína y actividad de catalasa (3,17,18).

Además, ésta especie es resistente a la cefalotina y sensible al ácido nalidíxico. Hebert y colaboradores han agrupado *C. jejuni* en ocho biotipos sobre la base de la hidrólisis del hipurato, la hidrólisis del ácido desoxiribonucleico (ADN) y el desarrollo en medio carbón-extracto de levadura. Esta separación puede tener valor clínico limitado en casos particulares, pero puede ser importante para el rastreo de brotes epidemiológicos (5).

En 1994 se realizó en Guatemala la ribotipificación de los diferentes aislamientos provenientes de pacientes pediátricos con episodios diarreicos y no diarreicos. De 75 cepas de *C. jejuni*, obtuvo ocho diferentes categorías de ribotipos: R1 a R8. Los patrones más comunes fueron los ribotipos R3, R2, R4 y R1 (19).

## **I. TERAPÉUTICA**

El uso de antibióticos es controversial, algunos estudios muestran que la eritromicina elimina rápidamente *Campylobacter* de las heces sin afectar la duración de la enfermedad, aunque por su uso imprudente, se ha provocado un creciente desarrollo de resistencia microbiana. Los estudios en niños con disentería debida a *C. jejuni* han mostrado el beneficio del tratamiento temprano con eritromicina. Los síntomas severos pueden responder a un tratamiento con antibióticos como azitromicina, ciprofloxacina, eritromicina o fluoroquinolona y pueden acortar la duración de los síntomas si se les da pronto después de manifestarse la enfermedad, el tratamiento de elección es la eritromicina (250 mg/6 horas) o ciprofloxacina en dosis de 500 mg/12 horas durante 10 días. El fármaco de elección para las formas extraintestinales es la gentamicina, y en las infecciones del sistema nervioso central se asocia el cloranfenicol (2,3,6,7,20).

Las medidas de auto-cuidado para evitar la deshidratación consisten en ingerir soluciones de electrolitos para reponer los líquidos perdidos por la diarrea. Las personas con diarrea que no pueden tomar líquidos por vía oral debido a las náuseas pueden necesitar atención médica y líquidos por vía intravenosa, especialmente si se trata de niños (7).

## **J. RESISTENCIA DE *Campylobacter* A LOS ANTIBIÓTICOS:**

La infección por *Campylobacter* es autolimitante en la mayoría de los casos, pero en otros se recomienda la administración de agentes antimicrobianos, sin embargo la tasa de resistencia a éstos agentes ha ido en aumento, especialmente en países en vías de desarrollo a causa del uso indiscriminado de los mismos (1,3).

Un estudio realizado por el National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) en Estados Unidos determinó que ninguno de los 297 aislamientos de *Campylobacter* realizados durante el período de 1980 a 1990 era resistente a ciprofloxacina. Sin embargo de 1997 a 2001, 13% de 1,553 aislamientos de *Campylobacter*, fue resistente a ciprofloxacina y 2% a eritromicina (21).

En Guatemala, González evaluó la resistencia de *Campylobacter jejuni* a cuatro agentes antimicrobianos de elección. Examinó 106 cepas aisladas en el país, 100 obtenidas durante 1987-1989 y seis durante 1998-2000. Los resultados mostraron que las cepas aisladas durante 1987-1989 no presentan rangos de resistencia tan elevados como los que presentan las cepas aisladas de 1998-2000. En el primer grupo se encontró un 3% de cepas resistentes a eritromicina, 1% a ciprofloxacina y tetraciclina y 2% a ampicilina. En las cepas aisladas entre 1999 y 2000 se observó un 16.7% de resistencia a eritromicina, 33.3% a ciprofloxacina y 50% a tetraciclina y ampicilina. Estos hallazgos confirman el creciente desarrollo de resistencia a los agentes antimicrobianos originado por el uso imprudente de los mismos (1).

## **K. USO POPULAR DE PLANTAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES**

La medicina tradicional es el conjunto de conocimientos y prácticas terapéuticas generadas en el seno de la comunidad, transmitidas generacionalmente y que basadas en un saber empírico ofrecen o intentan ofrecer soluciones a diversas manifestaciones de enfermedad buscando propiciar la salud de la población. Su rasgo característico es su íntima relación con la cultura de la comunidad (22,23).

### **1. Sustancias con acción antimicrobiana procedentes de plantas**

Globalmente las plantas producen más de 100,000 productos naturales de bajo peso molecular, conocidos como metabolitos secundarios, que se diferencian de los primarios en que no son esenciales para la vida de la planta. Esta diversidad tan rica resulta, en parte, de un proceso evolutivo conducido por la selección para adquirir una mejor defensa contra los ataques de microorganismos, insectos y otros depredadores (24).

Estas sustancias se dividen básicamente en dos grandes grupos: fitoanticipinas, que están presentes de forma constitutiva en las plantas, y fitoalexinas, cuya presencia aumenta de forma considerable en respuesta a la invasión microbiana (25).

## **2. Utilización de plantas medicinales contra las infecciones en Guatemala**

En el país se utilizan por lo menos 623 plantas para tratar infecciones, de acuerdo a encuestas etnobotánicas, realizadas entre 1978 y 1982. Desde 1987 se han establecido los procedimientos y se han realizado investigaciones para determinar la actividad de algunas plantas. Ya en 1996 se había tamizado la actividad de 1,022 extractos de 243 plantas, de las cuales 19.5% mostró tener actividad contra las bacterias patógenas ensayadas (27,28,29,30).

Investigaciones realizadas por Cáceres y colaboradores, han demostrado la actividad antimicrobiana de extractos de plantas que se utiliza popularmente para tratar afecciones gastrointestinales sobre microorganismos enteropatógenos. En un estudio que se realizó con 84 plantas seleccionadas, del 40-48% de las plantas fue capaz de inhibir *in vitro* el crecimiento de al menos una enterobacteria. (4).

De acuerdo a los resultados de estudios hechos para la validación de su uso popular, así como los realizados por bioprospección, son varias las especies nativas que son necesarias de investigar por su actividad contra especies de *Campylobacter* (3).

Las cinco plantas de estudio seleccionadas para determinar la actividad contra *Campylobacter jejuni* fueron: *Bixa orellana* L., *Chrysophillum caimito* L., *Crataegus pubescens* (Kunth) Steudel, *Guazuma ulmifolia* Lam., *Lippia graveolens* HBK, las cuales son encontradas regularmente en regiones cálidas de Guatemala y se utilizan generalmente para tratar afecciones gastrointestinales.

### 3. *Bixa orellana* L.

#### a. Nombres populares

Achiote, Aneto, Bija, Ox

#### b. Familia

*Bixaceae*

#### c. Descripción botánica

Es una planta arbustiva perenne que alcanza 3 y 5 m. de altura, siendo su copa baja y extendida. Su tallo es oscuro y ramificado a poca altura del suelo. Las hojas simples, grandes, de color verde claro, persistentes alternas, de bordes lisos, forma acorazonada y con largos pecíolos. Las flores están dispuestas en ramilletes terminales y son hermafroditas, de colores blanco a rosado según las variedades. El fruto es una cápsula de color rojo, erizada de pelos gruesos. En cada valva se encuentra un número variable de semillas, desde 10 hasta 40, en relación con el tamaño de la cápsula; aunque en promedio se puede tomar como 20 semillas por cápsula en los ejemplares espontáneos. Las semillas son parecidas a la de la vid pero de mayor tamaño y algo comprimidas; su tegumento está recubierto por una sustancia viscosa de color rojo vivo (22).

#### d. Habitat

En Guatemala se cultiva en los departamentos de Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chiquimula, El Progreso, Escuintla, Izabal, Jutiapa, Quetzaltenango, Sacatepéquez, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa (22).

#### e. Agricultura

Requiere clima húmedo (600-1,400 mm/año) y suelo franco-limoso o arcillo-humífero, neutro, profundo, drenado. Se propaga por estaca o semilla; se prefiere la semilla cuya germinación es rápida (10-15 días); al inicio de las lluvias (20 cm de altura) se trasplanta a distancias de 4x3 m. A partir del tercer año una plantación produce 500 a 2,500 Kg de semilla/hectárea (22).

#### f. Usos medicinales atribuidos

Se utiliza como antiinflamatorio, antictérico, antiespasmódico. El aceite en gargarismos se utiliza para curar la tos ferina. El aceite de achiote o las semillas machacadas y aplicadas localmente se consideran un remedio en caso de quemaduras.

Las cataplasmas y los emplastos con infusión de semillas en aceite o leche caliente, se utilizan fríos contra inflamaciones producidas por golpes, esguinces y torceduras. La decocción en leche de las semillas es utilizada para curar personas con astenia y debilidad. Las semillas se emplean para tratar bronquitis y hemorroides, además es hepatotrópico, tónico, vulnerario, digestivo, laxante suave, diurético, purgativo, antiemético, estomáquico, antiasmático, febrífugo, antidiabético, expectorante, afrodisíaco y repelente de insectos especialmente de mosquitos y zancudos.

La decocción de las raíces es considerada como diurética, antidisentérica, antivenérea y antidiabética.

La decocción de las hojas, se emplea como desinflamatorio en las inflamaciones de boca y garganta y como emenagogo, hepatotropo, diurético, purgativo, antivenéreo, antiemético y reanimante después de las fiebres intermitentes (31,32).

#### g. Otros usos populares

Las semillas se utilizan como colorante en la industria de alimentos y textiles (22).

#### h. Farmacología

Experimental: Estudios antibacterianos demuestran que la tintura de raíz es activa contra *Salmonella typhi*, no así contra *S. enteritidis*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* y *S. flexneri*. Las tinturas de corteza y hojas son activas contra *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphilococcus aureus*, *S. typhi* y *S. flexneri*; el extracto etanólico de semillas es inactivo contra bacterias; la tintura de hojas es activa contra *Neisseria gonorrhoeae*, la semilla es inactiva; mejor disolvente etanol, con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 5 mg/mL. La tintura de hojas y corteza es activa contra *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium gypseum* y *Trichophyton rubrum*; siendo el mejor disolvente el etanol al 99%, CIM 10 mg/mL. La infusión de hojas es activa contra *Tricomonas vaginalis*; el fruto contra virus vaccinia. El extracto acuoso de raíz relaja el ileon de cobayo (1 mg/kg); *in vivo* (50 mg/kg) produce en ratas hipotensión y antisecreción (400 mg/kg) y en ratones (21 mg/kg) deprime el sistema nervioso central. Extractos acuoso y clorofórmico de semillas inducen hipoglicemia no insulino dependiente en perros. La decocción de semilla y hojas no tiene actividad cardiotónica en tejido cardíaco de cobayo (320 mg/mL). No es antiinflamatoria porque el extracto etanólico

inhibe 4% la inflamación podal de la rata y 1,000 mg/Kg de infusión oral un 22%. El extracto acuoso y etanólico inhibe la proliferación de células de linfoma Mol<sub>4</sub> (22).

i. Composición química

El extracto acuoso de semillas contiene 9,000-2,000 UI/g de Vitamina A, carotenoides ( $\beta$ -caroteno, bixina, norbixina), aminos, flavonoides, leucoantocianinas, triterpenos y taninos. Las hojas contienen alcaloides, flavonoides y sesquiterpenos. El análisis proximal de 100 g de semilla seca contiene: 13.1 g de proteína, 5 g de grasa y 5.4 g de ceniza; 100 g de planta fresca contiene: 54 calorías, 84.4 g de agua, 0.3 g de grasas, 14.3 g de carbohidratos, 0.5 g de fibra, 1.0 g de ceniza, 7 mg de calcio, 10 mg de fósforo, 0.8 mg de hierro, 90  $\mu$ g de caroteno, 0.005 mg de riboflavina, 0.3 mg de niacina y 2 mg de ácido ascórbico (22).

j. Farmacognosia

La materia médica es la semilla, hay propiedad farmacológica en hojas y raíces. El contenido de vitamina A podría explicar su acción en afecciones dérmicas y quemaduras (22).

k. Indicaciones terapéuticas

El uso popular y la farmacología experimental demuestran que la raíz es hipoglucemiante y la hoja es antigonorreica, deben evaluarse clínicamente para indicar su uso en estas afecciones. Por los hallazgos preliminares puede recomendarse la tintura o el extracto de las hojas. De las semillas por su resistencia a la acción de los agentes químicos, pero no a los efectos del sol, se emplea para ungüentos y pomadas como un sustituto del azafrán (22).

#### **4. *Chrysophillum caimito* L.**

a. Nombres populares

Caimito, cainito, caimo morado, caimo, canje.

b. Familia

*Sapotaceae*

c. Descripción botánica

Árbol de 30 metros de alto, tronco de 1 m de diámetro, contiene látex; ramas cubiertas de pelos cafés. Hojas siempre verdes, alternas, ligeramente cuerudas, elípticas, hasta 15 cm de largo, verdes, cubiertas con pelillos finos, sedosos, dorados. Flores amarillo pálido, púrpura o blanco, pequeñas agrupadas en la axila de la hoja. Frutas redondas, hasta 10 cm de ancho; cáscara gruesa, humosa, púrpura oscuro, carnoza granular, purpúrea-blanquecinas, gelatinosa, incolora, dulzona pero insípida. Semillas grandes, de color café oscuro, aplanadas, en celdas radiales (33).

d. Habitat

Nativa de las indias Occidentales, ampliamente cultivada en los trópicos de América. Introducida en Guatemala y cultivada en lugares de tierra caliente en elevaciones no mayores de 1,000 metros sobre el nivel del mar (msnm.) (33).

e. Agricultura

Este frutal requiere alta temperatura todo el año; así mismo un elevado porcentaje de humedad ambiental. No es exigente en suelos, crece bien en suelos arenosos poco profundos y en suelos arcillosos profundos. No tolera bien periodos de inundación por lo que requiere suelos con muy buen drenaje. El árbol de caimito se adapta bien a climas poco calurosos y tropicales y a una gran diversidad de suelos: desde los fértiles y profundos hasta los ligeros y arenosos, si estos están bien fertilizados. La fertilización debe tener una considerable porción de potasio para la obtención de buenas muestras de fructificación (33).

f. Usos medicinales atribuidos

La decocción de las hojas y cáscara del fruto se utiliza para el tratamiento de fiebre y catarro; las hojas y corteza se utilizan para tratar gonorrea, retención urinaria y angina. Se le atribuyen propiedades astringentes, pectorales, diuréticas, tónicas y febrífugas. En las afecciones gastrointestinales se utiliza para tratar diarrea, disentería y pérdida de apetito (33).

g. Otros usos populares

La madera es fuerte y pesada, por lo que se utiliza para la construcción (33).

#### h. Farmacología

Vallejo y García (1982), concluyeron que *Chrysophyllum caimito* presenta acción curativa en la papilomatosis canina, en una dosis recomendada de 2 mL con el extracto etanólico (33).

#### i. Composición química

Toda la planta es rica en taninos. El análisis proximal de 100 g del fruto fresco indica que contiene 65 calorías, 81.5 g de agua, 1.0 g de proteínas, 0.7 g de grasa, 16.4 g de carbohidratos totales, 2.0 g de fibra, 0.4 g de ceniza, 17 mg de calcio, 16 mg de fósforo, 0.4 g de hierro, 5 mg de sodio, 140 mg de potasio, 0.01 mg de tiamina, 0.02 mg de riboflavina, 0.9 mg de niacina y 8 mg de ácido ascórbico (33).

### **5. *Crataegus pubescens* (Kunth) Steudel**

#### a. Nombres populares

Karhashi, Manzanilla, Manzanita, Tejocote, Tejocote cimarrón.

#### b. Familia

*Rosaceae*

#### c. Descripción botánica

Es un árbol espinoso de hasta 10 m de altura. Con las hojas en forma ancha en la parte media y en los extremos angostas, de color verde oscuro en el haz y verde pálido en el envés y su borde dentado. Las flores son solitarias y blancas. Sus frutos son amarillo-anaranjado como pequeñas manzanas y las semillas son lisas y de color café (34).

#### d. Habitat

A menudo cultivado en los huertos familiares o a las orillas de los terrenos de cultivo. Habita en bosques de encino, pino, pino-encino y abies; frecuentemente en comunidades secundarias, además es ruderal y puede prosperar en lugares adversos o con cierto grado de perturbación, se le encuentra entre los 1800 a 3000 msnm, en diferentes tipos de suelo. En Guatemala se cultivan en varias zonas del país, preferentemente en zonas templadas pero soleadas hasta 3,900 msnm, naturalizada en campos de cultivo de 1,300-2,500 msnm en Alta Verapaz, Chimaltenango, Jalapa, Quetzaltenango, Sacatepéquez, San Marcos, Sololá y Zacapa (22).

#### e. Agricultura

Es una especie con variedad de formas. Crece en terrenos templados, pH 7-9 relativamente áridos, pero requiere agua para germinar, la germinación principia a los 6-7°C, pero la óptima es a 20-25°C, 1,000 semillas pesan 0.142 g, germina el 72% en 28 días, requiere de mucha luz solar, particularmente para la floración y producción de aceite esencial. Se propaga por semilla en viveros de tierra gumífera, la época de siembra depende de cada zona (35).

#### f. Usos medicinales atribuidos

El fruto hervido es empleado en enfermedades respiratorias como la tos, pulmonía, bronquitis, resfrío y dolor del pulmón. También es útil en algunas enfermedades del aparato digestivo como diarrea, amebas y en casos de disentería (la que se considera muy peligrosa, acompañada de dolores estomacales y vómito). Además se utiliza en padecimientos de los riñones, para adelgazar, mejorar la circulación coronaria, moderar las contracciones en caso de taquicardia, y como diurético y antiespasmódico. En la medicina maya se utiliza cuando hay dolor de abdomen o lombrices (oxiuros), con tal motivo se da el té de manzanilla con otras yerbas. La raíz se utiliza como antidiabética, en cocción, machacada y remojada en alcohol o bien en infusión (34).

#### g. Otros usos populares

El tallo se utiliza en la construcción de herramientas y utensilios. El árbol se cultiva con fines decorativos y de sombra por lo atractivo de sus frutos. Los frutos se utilizan en algunas partes para decoraciones en época navideña. La infusión o loción de la flor se utiliza para dar color rubio al cabello. El aceite tiene aplicación como fragancia en cremas, detergentes, lociones, jabones, perfumes y como saborizante en bebidas, dulces, gelatinas y licores (22, 35).

#### h. Farmacología

Estudios antimicrobianos demuestran que la tintura de hojas es inactiva contra agentes causales de infección dérmica (*C. albicans*, *E.coli*, *P. aereuginosa* y *S. aureus*). El aceite esencial es activo contra *C. albicans*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhimurium* y *S. aureus*. Estudios farmacológicos demuestran que la decocción de hojas por vía oral produce aumento del volumen urinario en ratas. El extracto etéreo por vía intraperitoneal

en rata (40, 80 g/Kg) inhibe simultáneamente el desarrollo de edema por dextrán y los niveles plasmáticos de kininógeno, así mismo tiene efecto espasmolítico; el aceite esencial (100 ppm) disminuye el tono y peristalsis de intestino delgado de rata aislado, por vía oral (0.1 mL/Kg) en perros o gatos aumenta la secreción biliar y los niveles de colesterol en la bilis. El extracto acuoso retarda el apareamiento de convulsiones inducidas por picrotoxina (6 mL/Kg) inoculada intraperitonealmente en ratones y disminuye significativamente la mortalidad (22,34).

#### i. Composición química

Las hojas y flores contienen aceite esencial (0.2-0.6%) compuesto por azuleno (26-46%), camazuleno (1-15%), guajazuleno, bisabol, bisabolol, cadineno, colina, cumarinas (herniarina, umbeliferota), farneseno y furfural, sesquiterpenoides, bisabolóxidos A, B y C, además glucósidos flavonoides (apigenina, apiina, patuletrina, rutina, luteol, luteolina, quercetol, quercimeritrina), triacontano, antemidina, ácido antémico, spiroeter, taninos, mucílago urónico (10%), ácidos grasos, principio amargo, azúcar y sales minerales (22).

#### j. Farmacognosia

La materia médica son las flores secas con aroma característico. El azuleno tiene actividad antiflogística; la camilina y epigenina son espasmolíticas; el camazuleno es anodino, antiinflamatorio, antimicrobiano, espasmolítico y vulnerario; algunos estudios demuestran que la umbeliferota es fungistática. La herniarina tiene actividad antifúngica que se manifiesta por inhibición del crecimiento hifal, furcación apical, alteración de la morfología nuclear, deposición de vesículas densas en el citoplasma, anormalidades mitocondriales y engrosamiento de la pared celular. El  $\alpha$ -bisabolol, camazuleno, apigenina y luteolina inhiben la inflamación experimental aguda y crónica, manifestándose una potencia similar a la indometacina; el cispairoeter es más abundante que bisabolol y tiene actividad en el edema inducido por dextrán, pero no en los edemas inducidos por serotonina, histamina y bradiquinina. El principio amargo es responsable de su actividad aperitiva, digestiva y colerética (22).

#### k. Indicaciones terapéuticas

Por su propiedad antiinflamatoria, carminativa, espasmolítica y sedante está indicada por vía oral en gastritis, úlcera duodenal, colitis, espasmos, inapetencia, digestiones lentas,

meteorismo, náusea, vómitos, disquinecia biliar, nerviosismo e insomnio. Por su propiedad antiinflamatoria y antiséptica, está indicada por vía tópica en blefaritis, conjuntivitis, eczema, heridas, contusiones, inflamaciones locales, hemorroides, estomatitis y vaginitis (22).

## **6. *Guazuma ulmifolia* Lam.**

### a. Nombres populares

Caulote, caca de mico, contamal, chicharrón, guácima, pixoy, tapaculo, Xuyuy.

### b. Familia

*Sterculiaceae*

### c. Descripción botánica

Arbusto o árbol de 2-20 m, hojas oblongas a anchamente aovadas, de 3-15 cm, agudas a acuminadas, aserradas, estrellado-tomentosas; flores amarillentas, fragantes, en cimas axilares pequeñas; cáliz estrellado mentoso, pétalos de 3 mm, fruto leñoso, globoso u oval, de 2-4 cm, con tubérculos duros (22,36).

### d. Habitat

Nativo de México hasta América del Sur y el Caribe, en pastos y bosques secundarios hasta 1,200 msnm; introducida en los trópicos de Asia y Africa. En Guatemala se ha descrito en la mayoría de departamentos del país (22,36).

### e. Agricultura

Especie de clima cálido, semihúmedo o húmedo, crece en suelo ácido o alcalino, calizo, bien drenados. Se propaga por estaca o semilla; la primera es fácil pero la planta es endeble y se pudre, las semillas son abundantes (22,36).

### f. Usos medicinales atribuidos

El cocimiento de frutos se utiliza para tratar diarrea, resfrío y problemas renales; la infusión y cocimiento de corteza se utiliza para tratar malaria, sífilis, calvicie, gonorrea, fracturas, elefantiasis y afecciones respiratorias (gripe, tos, sarampión); las hojas se utilizan para tratar afecciones del hígado y riñones, asma, bronquitis, fiebre y gonorrea. La corteza de raíz se utiliza contra hemorroides y disentería. El cocimiento de corteza se utiliza tópicamente para tratar afecciones dermatomucosas (estomatitis, lepra, piodermia,

quemaduras), fracturas e inflamaciones. Se le atribuye propiedad antiinflamatoria, aperitiva, depurativa, digestiva, diurética, febrífuga, lipolítica, sudorífica, tónica y vulneraria (22,36).

#### g. Otros usos populares

La madera es rosada, sin olor y poco sabor, textura burda, fácil de trabajar, poco durable; tiene múltiples usos en carpintería, para fabricar herramientas, para construcción y leña; el jugo de tronco se utiliza para clarificar la miel en la fabricación de azúcar; las semillas se utilizan para elaborar bebidas refrescantes; la corteza fibrosa se utiliza para fabricar cuerdas. La fruta se come cruda o cocida, se utiliza para alimentar pollos. El mucílago se utiliza para fijar peinados y repellar paredes (22).

#### h. Farmacología

Estudios antimicrobianos demuestran que la tintura de hojas es poco activa contra *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae* y *S. aureus*, es inactiva contra *P. aeruginosa*, *C. albicans* y *A. niger*; no se confirmó la actividad contra enterobacterias en ningún extracto con diferentes disolventes. El extracto etanólico es inactivo contra *Entamoeba histolytica*. La hoja es activa contra herpesvirus, pero no contra polio. El extracto etanólico de raíz y tallo no tiene actividad citotóxica contra células KB, el extracto de hojas es potente inhibidor. Estudios farmacológicos demuestran que la decocción de hojas no tiene actividad diurética ni hipotensora en ratas (22).

#### i. Composición química

El tamizaje fitoquímico indica que la hoja no tiene compuestos mayores salvo cafeína. La corteza contiene bufadienólicos, cardenólicos, esteroides insaturados, flavonoides, leucoantocianinas y  $\beta$ -sitosterol y terpenoides. Las flores contienen flavonoides. El análisis proximal de 100 g del fruto contiene: 429 calorías, 10.0 g de agua, 6.5 g de proteína, 3.0 g de extracto etéreo, 3.7 g de ceniza, 28.0 g de fibra, 48.6 g de carbohidratos, 548 mg de calcio, 156 mg de fósforo; contiene aminoácidos como ácido aspártico 0.64 g, 0.12 g de treonina, 0.86 g de ácido glutámico, 0.34 g de lisina, y otros (22,37).

#### j. Farmacognosia

La materia usada medicamente son hojas y corteza secas, deben tener las características fisicoquímicas y sanitarias de la materia prima usada en la elaboración de productos

fitofarmacéuticos. Los flavonoides de las flores son kampferol, kampferitina y quercetina, los de la corteza son betulina y friedelina (22).

k. Indicaciones terapéuticas

TRAMIL indica el uso para tratar afecciones digestivas y respiratorias (22).

## **7. *Lippia graveolens* HBK**

a. Nombres populares

Orégano, mejorana, orégano de monte

b. Familia

*Verbenaceae*.

c. Descripción botánica

Arbusto delgado de hasta 2 m de alto, las ramas con pubescencia corto-pilosa; hojas con pecíolos de 5-10 cm de largo, las láminas oblongas a elípticas u ovado a ovado-oblongas, 2-4 cm de largo, usualmente obtusas o redondeadas en el ápice, algunas veces agudo, redondeadas o subcordadas en la base, densamente suave-pilosas en el haz, suave al tacto (22).

d. Habitat

*L. graveolens* es nativa del sur de Texas a Nicaragua, se encuentra en bosques secos y montes espinosos subtropicales, en pendientes pedregosas muy secas, en matorrales húmedos o secos y planicies hasta 350 msnm. En Guatemala se ha descrito en los departamentos de El Progreso, Petén y Zacapa (22).

e. Agricultura

*L. graveolens* es principalmente recolectada en sus lugares de crecimiento silvestre, se recomienda su manejo y siembra comercial para garantizar su aprovisionamiento sostenido. Se propaga por semilla o estacas de madera suave. Las hojas se colectan en plena floración y se secan a la sombra (22).

f. Usos medicinales atribuidos

La decocción o infusión de hojas se utiliza por vía oral para tratar anemia, afecciones gastrointestinales (amebiasis, antiséptico intestinal, cólico, diarrea, disentería, dispepsia, estreñimiento, indigestión) y respiratorias (asma, bronquitis, catarro, influenza, laringitis,

pleuresía, resfrío, tos, tos ferina, tuberculosis), hidropesía, ictericia, en vino se toma como expectorante y tónico.

La decocción en leche se utiliza para tratar asma y bronquitis; un jarabe de las hojas secas se utiliza para tratar diabetes, disentería, catarro y resfríos. Tópicamente la decocción se aplica para la cicatrización de heridas, llagas e inflamaciones de la garganta.

La planta fresca macerada en aceite se aplica en los dolores reumáticos; la maceración alcohólica contra “ataques”.

Se les atribuye propiedad antioxidante, antiséptica, aromática, calmante, carminativa, cicatrizante, desinflamante, diaforética, digestiva, diurética, emenagoga, espasmolítica, estimulante, estomáquica, expectorante, pectoral, sudorífica y tónica (22).

#### g. Otros usos populares

Por su sabor, aroma y valor nutritivo las hojas secas se utilizan para sazonar carne, pescado, embutidos, ensaladas, guacamol, pozol, salsas y licores; además se usa como planta de jardín aromática, cosmética y para preparar arreglos florales. El aceite esencial tiene uso en perfumería, jabonería y cosmética. Las semillas se utilizan para extracción industrial de ácidos grasos, con un rendimiento de 29.2% (22).

#### h. Farmacología

Estudios antibacterianos demuestran que la tintura de hojas de *L. graveolens* es activa contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. flexneri*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*, pero inactiva contra *Haemophilus influenzae*; la infusión de hojas demostró actividad contra los mismos microorganismos. Estudios antifúngicos demuestran que los extractos con diclorometano y etanol son activos contra *C. albicans*, *A. flavus*, *E. floccosum*, *M. gypseum* y *T. rubrum*, pero inactivos contra *Cryptococcus neoformans* (22).

#### i. Composición química

El tamizaje fitoquímico de hojas de *L. graveolens* contiene: aceite esencial (1.8%), glicósidos saponínicos, taninos y triterpenos, celulosa, pigmento y elementos minerales; la corteza y raíz contienen glicósidos saponínicos, aceite esencial y taninos. Las hojas contienen además flavononas (pinocembrina, naringenina) y lapachenol (22).

j. Farmacognosia

La materia médica son las hojas y sumidades floridas secas, que deben reunir las mismas características fisicoquímicas y sanitarias de la materia prima usada para la elaboración de productos fitofarmacéuticos (22).

k. Indicaciones terapéuticas

Por su acción antiséptica, digestiva y expectorante está indicado su uso por vía oral en el tratamiento de inapetencia, digestión lenta, meteorismo, tos, faringitis, sinusitis, bronquitis y amenorrea. Tópicamente se aplican inhalaciones húmedas y aerosoles para tratar afecciones respiratorias. Por sus propiedades antisépticas y cicatrizantes la infusión y esencia en pomadas están indicadas para tratar heridas, tinea y dolores reumáticos; la cataplasma se aplica en los abscesos varias veces al día (22).

**L. Búsqueda de actividad contra *Campylobacter* en especies vegetales.**

Existen varios estudios alrededor del mundo realizados con plantas de uso tradicional en busca de actividad contra *Campylobacter* spp.

La raíz de *Terminalia macroptera* es usada en África Occidental para el tratamiento de diversas infecciones. Se ensayó un extracto etanólico de la planta contra cien cepas de *Campylobacter* sp., encontrándose una CIM similar a cotrimoxazol y mayor que sulfametoxazol, los resultados sugieren un potencial importante para el tratamiento de enfermedades entéricas, particularmente de campilobacteriosis (38).

*Cryptolepis sanguinolenta*, otra planta africana de uso medicinal tradicional, de la cual se obtiene el alcaloide criptolepina. Se ensayó la actividad de los extractos etanólicos, acuosos y de la criptolepina, contra 65 aislamientos de *C. jejuni* y 41 de *C. coli* de casos de gastroenteritis en Portugal, Angola y Brasil. La CIM del extracto etanólico contra las cepas de *Campylobacter* fue de 25 µg/mL, mayor que cotrimoxazol y sulfametoxazol y la criptolepina fue activa igual que la ampicilina con una CIM de 12.5 µg/mL (39,40).

En Tailandia recientemente se usaron 32 aceites esenciales en un ensayo de difusión contra agentes enteropatógenos, incluyendo *C. jejuni*. Se encontró actividad antibacteriana promisoriosa en *Zingiber cassumuna*, *Cinnamomum bejolghota*, *Mentha arvensis* var. *piperacens*, *Cymbopogon citratos* y *Ocimum basilicum* var. *citratum* (3).

En México, investigaciones realizadas en la Universidad Autónoma de Nuevo León, demostraron la actividad inhibitoria del crecimiento de *C. coli*/*C. jejuni* en extractos de plantas comestibles, específicamente la rosa de jamaica (*Hibiscus sabderifa*) y el tamarindo (*Tamarindos indicus*) (40).

En un estudio realizado por Paz en 2005, no se encontró actividad antimicrobiana en 10 plantas usadas popularmente en Guatemala, para el tratamiento de afecciones gastrointestinales, a pesar de que algunas han mostrado tener actividad contra patógenos entéricos. Sin embargo se recomienda la búsqueda de actividad anti-*Campylobacter* con otras plantas usadas popularmente como antidiarreicas (3).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

*Campylobacter jejuni* es una bacteria enteropatógena, la que se ha reconocido como uno de los más importantes agentes etiológicos causantes de diarrea aguda en todo el mundo, particularmente en países en vías de desarrollo.

Las condiciones socioeconómicas en las que vive la mayor parte de la población en Guatemala son propicias para la propagación de este microorganismo, cuya tasa de infección de hace más de diez años era de 12.1% en pacientes sintomáticos. Dicha cifra va en constante aumento y está convirtiéndose en un inminente problema de salud pública.

La infección por *C. jejuni* suele ser autolimitante, pero el cuadro clínico es severo en niños menores de 5 años y en personas inmunosuprimidas, lo que hace necesaria la administración de agentes antimicrobianos. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos agentes, conlleva a una creciente tasa de resistencia a los mismos, existiendo varios reportes alrededor del mundo, acerca del incremento en la resistencia de *C. jejuni* hacia los antibióticos de elección. Esta situación sumada a los efectos secundarios que provocan algunos fármacos sintéticos, los altos costos y el creciente número de infecciones por este microorganismo, hace necesaria la investigación de alternativas terapéuticas que sean accesibles, seguras y eficaces para combatirlos.

La medicina popular tradicional guatemalteca, considera a las plantas como una fuente natural para el tratamiento de diversas enfermedades y entre ellas las gastrointestinales. Sin duda, Guatemala posee un territorio con variedad de flora y una herencia cultural en el uso de plantas medicinales, lo que hace importante la evaluación de la actividad contra *C. jejuni* de extractos de plantas medicinales empleadas para el tratamiento de afecciones gastrointestinales en la población guatemalteca, con el fin de establecer nuevas opciones para el tratamiento de esta infección.

## V. OBJETIVOS

### A. GENERAL

Determinar la actividad anti-*Campylobacter jejuni* en extractos de plantas utilizadas popularmente para tratar afecciones gastrointestinales en regiones cálidas de Guatemala.

### B. ESPECÍFICOS

1. Investigar la susceptibilidad de las cepas y aislamientos de *C. jejuni* con los extractos etanólicos de la hoja de *Bixa orellana*, *Crataegus pubescens*, *Guazuma ulmifolia*, *Lippia graveolens* y el fruto de *Chrysophillum caimito*.
2. Comparar actividad antimicrobiana de *C. jejuni* de los cinco extractos etanólicos de las plantas.
3. Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos que resulten positivos.

## VI. HIPÓTESIS

Al menos uno de los extractos etanólicos de *Bixa orellana*, *Chrysophillum caimito*, *Crataegus pubescens*, *Guazuma ulmifolia*, *Lippia graveolens* posee actividad antimicrobiana contra *Campylobacter jejuni*.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. UNIVERSO

Plantas medicinales utilizadas en Guatemala para tratar afecciones gastrointestinales.

### B. MUESTRA

1. Extractos etanólicos de cinco plantas utilizadas para el tratamiento de afecciones gastrointestinales en regiones cálidas de Guatemala: *Bixa orellana* L. (hoja), *Chrysophillum caimito* L. (hoja), *Crataegus pubescens* (Kunth) Steudel (fruto), *Guazuma ulmifolia* Lam. (hoja), *Lippia graveolens* HBK (hoja).
2. Cepa de *C. jejuni*. ATCC 33291
3. Aislamientos clínicos de *C. jejuni*.

### C. RECURSOS

#### 1. Humanos

Tesista: Br. Christian Samuel Alvarez Privado

Asesora: MA. Ana Margarita Paz Morales

#### 2. Institucionales

Laboratorio de Bioensayos, del Departamento de Citohistología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

Laboratorio de productos farmacéuticos FARMAYA.

#### 3. Equipo

- Autoclave
- Balanza analítica
- Cajas de Petri de 9 cm de diámetro

- Campana bacteriológica
- Campana de flujo laminar
- Centrífuga
- Congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$
- Incubadoras a  $36$  y  $42^{\circ}\text{C}$
- Jarra Gas-Pak
- Mechero Bunsen
- Microscopio de luz blanca
- Refrigerador a  $4^{\circ}\text{C}$
- Sonicador
- Viales
- Vortex

## **1. Materiales y reactivos**

- $\alpha$ -naftilamida
- Acido sulfanílico
- Algodón
- Agua destilada
- Asas de nicromo
- Bata
- Caldo nitrado
- Caldo Tripticasa Soya
- Caldo Tripticasa Soya y glicerol al 15%
- Cinta adhesiva
- Cinta testigo
- Colorantes de Gram (cristal violeta, lugol, carbol fucsina)
- Discos de ácido nalidíxico ( $30\ \mu\text{g}$ )
- Discos de cefalotina ( $30\ \mu\text{g}$ )
- Discos de eritromicina ( $15\ \mu\text{g}$ )

- Discos estériles
- Espátulas
- Estándar de MacFarland 0.5
- Etanol al 50% y 95%
- Gradilla
- Guantes
- Hipurato de Sodio
- Hisopos
- Láminas cubreobjetos
- Láminas portaobjetos
- Marcador indeleble
- Medio de cultivo Columbia (Oxoid™) con sangre de carnero al 7.5%.
- Membranas de nitrato de celulosa con 45 µm de diámetro
- Ninhidrina
- Peróxido de Hidrógeno al 3%
- Pinzas
- Pipetas automáticas de 10 a 100µL y de 100 a 1000µL
- Reactivo de oxidasa
- Sobres para crear sistema microaerofílico (Campy-pak BBL™).
- Solución de eritromicina.
- Solución salina al 0.85%
- Tubos pequeños con tapón de rosca estériles

## **E. MÉTODOS (PROCEDIMIENTO)**

### **1. Resiembras de *Campylobacter jejuni* (3).**

De la cepa de *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 y aislamientos clínicos procedentes del departamento de Guatemala, almacenados en el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología:

- a. Se realizaron resiembras en medio de cultivo Columbia-agar sangre al 7.5%; A partir de cepas almacenadas a -80°C. Se incubó a 36°C por 48 horas, observándose colonias mucoides, planas y extendidas sobre la superficie del medio (efecto de swarming), y colonias pequeñas de color blanco grisáceo en forma de gotas de rocío.
- b. Se comprobó la identidad de las colonias con tinción de Gram, prueba de oxidasa, prueba de catalasa e hidrólisis de hipurato.
- c. Las bacterias se almacenaron nuevamente en viales con Tripticasa soya y glicerol al 15%, hasta el momento de realizar el ensayo de actividad antimicrobiana.

## **2. Aislamientos clínicos de *Campylobacter jejuni* (1,3).**

- a. Se recolectaron muestras diarreicas en niños menores de cinco años de la comunidad Machaquitas chiclero y del Hogar del Niño “Santa María de Guadalupe”, de Puerto Barrios, Izabal.
- b. Se tomaron datos generales del paciente (nombre, edad, lugar de procedencia), datos clínicos y epidemiológicos.
- c. Se identificaron las muestras con datos generales del paciente y un número correlativo asignado.
- d. Posteriormente se transportaron las muestras tomando una cantidad significativa con un hisopo estéril y colocado en medio de transporte Cary Blair, sellándolo adecuadamente. Se mantuvo por 24 horas en refrigeración a temperatura entre 4-6°C, hasta su siembra.
- e. El aislamiento se realizó por medio del método de filtración por membrana:
  - i. Se suspendió 1 gramo de heces en 20 mL de solución salina.
  - ii. Previo a centrifugar, se agitó vigorosamente la muestra.
  - iii. Luego se agregó de 4 a 5 mL. del sobrenadante en la membrana de nitrato de celulosa con filtro de 45 µm, que se coloca en la superficie del medio Columbia enriquecido con 7.5% de sangre de carnero.

- iv. Se incubó a 42°C en una atmósfera microaerofílica con aproximadamente 85% de nitrógeno, 10% de dióxido de carbono y 5% de oxígeno durante 48 horas.
- v. Luego de la incubación, se buscó en el medio de cultivo colonias no hemolíticas con la siguiente morfología: mucoides, planas y extendidas sobre la superficie del medio (efecto de swarming), blanco-grisáceas.
- vi. A las colonias con ese tipo de características, se realizaron las pruebas de identificación respectivas para *C. jejuni*: Tinción de Gram, prueba de oxidasa, prueba de catalasa, hidrólisis del hipurato, susceptibilidad al ácido nalidíxico, susceptibilidad a la cefalotina.

### 3. Curva de susceptibilidad (3).

Se realizó una curva para evaluar la susceptibilidad de la cepa ATCC 33291, frente al antimicrobiano de elección: eritromicina.

- a. Preparación soluciones de eritromicina
  - i. Se realizó a diferentes concentraciones de eritromicina la evaluación de susceptibilidad antimicrobiana: 0.78 mg/mL, 1.56 mg/mL, 3.125 mg/mL, 6 mg/mL, 12.5 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL.
  - ii. Se impregnaron en discos estériles 50 µL de cada concentración de eritromicina.
  - iii. Se enfrentó la cepa ATCC 33291, a las diferentes concentraciones de eritromicina, en Agar Columbia-sangre al 7.5%, incubado por 48 horas en ambiente microaerofílico.
  - iv. Se leyeron los halos de inhibición.
  - v. Se procedió a realizar la curva de susceptibilidad.

#### **4. Obtención de extractos vegetales (42,43).**

##### **a. Selección de plantas**

Los criterios utilizados para seleccionar las plantas a evaluar fueron los siguientes.

- i. Plantas populares utilizadas para tratar afecciones gastrointestinales.
- ii. Encontradas regularmente en regiones cálidas.
- iii. Disponibilidad de los extractos etanólicos en el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología

Los extractos vegetales de las plantas a evaluar, ya habían sido preparados, por el método de extracción continua por percolación y concentrados en rotavapor.

#### **5. Ensayo de actividad contra *Campylobacter jejuni*, por extractos de plantas (3).**

Se realizó el ensayo de actividad antibacteriana *in vitro* por el método de difusión en agar. Este consiste en enfrentar la bacteria, con los extractos de plantas mediante discos impregnados por los mismos, utilizando el medio de agar Columbia-sangre.

##### **a. Preparación de dilución del extracto a concentración conocida (1mg/mL)**

- i. Se pesó 1 mg de los extractos a evaluar y se disolvió en 1 ml de etanol al 50%, colocándolo en viales debidamente limpios. (se utilizó el sonicador para disolver bien el extracto en el disolvente).

##### **b. Impregnación de discos de difusión con el extracto**

- i. Se impregnó 10 µl diarios de cada uno de los extractos etanólicos a una concentración de 1mg/ml por 5 días.

##### **c. Preparación del inóculo de microorganismos**

- i. Se tomó de 3 a 5 colonias de *Campylobacter jejuni* en un tubo con 1 mL de caldo tripticasa soya.
- ii. Se incubó a 36°C por 30 minutos, se verificó que la turbidez fuera aproximadamente igual al estándar de McFarland 0.5.
- iii. Al alcanzar la turbidez deseada; se inoculó con un hisopo estéril en cuatro direcciones sobre las cajas de agar sangre.

- iv. Cuando el medio absorbió la carga microbiana (5 a 15 minutos después de colocar el inóculo) se procedió a colocar los discos impregnados con las plantas, colocándose un máximo de 6 discos por caja, incluyéndose como controles positivos discos de ácido nalidíxico, cefalotina y eritromicina de 30  $\mu\text{g}$  y como control negativo discos impregnados únicamente con etanol al 50%.
- d. Interpretación de resultados  
Se consideró que un extracto es activo si presentaba un halo de inhibición  $\geq 20$  mm. Si el extracto presentaba un halo de inhibición  $< 20$  mm. o no presentaba inhibición alguna se consideró como extracto inactivo.

## 6. Diseño estadístico

- a. Tipo de estudio  
El diseño del presente estudio es de experimentación completamente aleatorizado. De los extractos positivos (aparición de halo de inhibición), se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM). El número mínimo de repeticiones para cada ensayo con los extractos fue de 5, según la tabla de la función de distribución acumulada de la probabilidad binomial, para un nivel  $\alpha=0.05$ .
- b. Variables
  - i. Variable independiente: Extractos etanólicos de 5 plantas medicinales utilizadas popularmente para tratar afecciones gastrointestinales en Guatemala.
  - ii. Variable dependiente: Actividad contra *C. jejuni* de los extractos de plantas.
- c. Análisis de resultados  
Se realizó una prueba de hipótesis binomial, donde  $H_0: p \leq 0.5$  (No tiene efecto) y  $H_a: p > 0.5$  (Sí tienen efecto). Señalando lo siguiente.  
Si la hipótesis nula no se rechaza, se dirá que los datos sobre los cuales se basa la prueba no proporcionan evidencia suficiente que cause el rechazo,

para efectos de investigación, esto significa que para rechazar la hipótesis nula y referir que el extracto tiene efecto, se debe tener 5 éxitos, al nivel  $\alpha=0.05$  seleccionado. La hipótesis alterna se creará cierta si los datos de la muestra llevan al rechazo de la hipótesis nula.

El ensayo para la CIM hubiese consistido en diluciones seriadas a partir de 1 mg/dl, utilizando la misma metodología de difusión en agar con discos impregnados.

## VIII. RESULTADOS

Inicialmente se efectuaron resiembras de la cepas ATCC 33291 y un aislamiento clínico de *C. jejuni* que se encuentran almacenados en el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Facultad de CC.QQ. y Farmacia, con el fin de mantener activa a la bacteria previo al ensayo. Además se realizaron pruebas de identificación y confirmación de *C. jejuni*, tales como tinción de Gram, oxidasa, catalasa, hidrólisis del hipurato, urea y test de susceptibilidad, como control de calidad para asegurar la viabilidad de la bacteria.

Posteriormente se procedió a realizar aislamientos clínicos de la bacteria, en una guardería y la aldea Machaquitas chiclero del Municipio de Puerto Barrios en el departamento de Izabal. Para ello se solicitó una muestra de heces a la madre y/o encargados de niños menores de 5 años que participaron en el estudio. En cuanto a las características de la mayoría de las muestras, éstas fueron diarreicas y en su examen microscópico se observaron parásitos, de los cuales los más frecuentes fueron *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichiuria*, presentes en las muestras en las que se aisló *C. jejuni*. Las madres indicaron en la ficha epidemiológica que sus hijos presentan diarreas constantes; así mismo se observó que en la mayoría de los hogares las condiciones sanitarias eran deficientes, ya que no cuentan con los servicios básicos de vivienda. Así, también refirieron que la mayoría viven con pollos, los alimentos son preparados por las madres, y el agua que utilizan para consumo es abastecida por pozos o ríos de la comunidad.

En un total de 20 muestras evaluadas, se obtuvieron 6 (30%) aislamientos sugestivos de *C. jejuni*. Al evaluar por medio de las pruebas de identificación, se confirmó que únicamente una de las cepas aisladas correspondió a *C. jejuni* (5%); los 5 aislamientos restantes (25%) se identificaron como *Campylobacter* sp.

Se realizó una curva de susceptibilidad con eritromicina a la cepa ATCC 33291, con el fin de validar el método del ensayo basado en la difusión en agar, por medio de discos impregnados, como una adaptación del método de Bauer-Kirby. En Tabla 1, se muestra la

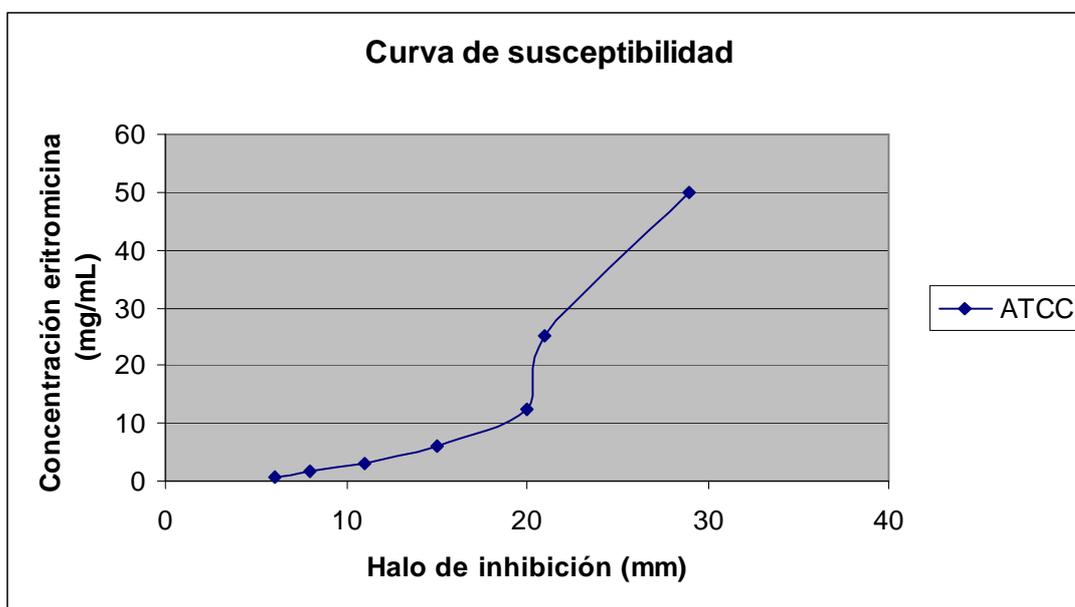
medida del halo de inhibición a las diferentes concentraciones de eritromicina evaluadas para obtener la curva de susceptibilidad (Gráfica 1).

Tabla 1. Medición del halo de inhibición a diferentes concentraciones de eritromicina

Concentración Eritromicina mg/mL	Halo de inhibición mm
0.78	< 6
1.56	8
3.125	11
6	15
12.5	20
25	21
50	29

Fuente: Datos experimentales.

Gráfica 1. Curva de Susceptibilidad de *C. jejuni* ATCC 33291 frente a la Eritromicina



Fuente: Datos experimentales.

Los extractos vegetales fueron obtenidos por el método de extracción continua con etanol por percolación y concentrados en rotavapor. Los criterios de selección de las plantas fueron, que se utilicen popularmente para tratar afecciones gastrointestinales, además de ser encontrados regularmente en regiones cálidas del país.

La actividad anti-*Campylobacter jejuni* de los cinco extractos fue ensayada en la cepa ATCC 33291 y en dos aislamientos clínicos, por el método de difusión en agar por medio de discos impregnados con los extractos de plantas a una concentración de 1mg/mL, los cuales fueron colocados en placas de agar Columbia-sangre al 7.5%, inoculándolas con una suspensión de bacterias equivalente al  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL (estándar de McFarland 0.5), e incubadas a 36°C por 48 horas. Cada una de las cajas incluyó alternadamente un disco de ácido nalidíxico, y uno de cefalotina como control positivo y un disco impregnado únicamente con etanol al 50% como control negativo.

Se realizaron cinco repeticiones por ensayo de cada uno de los extractos, con la cepa ATCC y los dos aislamientos clínicos. No se encontró actividad contra *C. jejuni* en ningún extracto ( $p < 0.05$ ) (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de la actividad anti-*Campylobacter jejuni* con los extractos etanólicos.

<b>Planta (parte)</b>	<b>Cepa ATCC (Actividad)</b>	<b>Aislamiento clínico Guatemala (Actividad)</b>	<b>Aislamiento clínico Izabal (Actividad)</b>
<i>Bixa orellana</i> (hoja)	Inactivo	Inactivo	Inactivo
<i>Chrysophyllum caimito</i> (hoja)	Inactivo	Inactivo	Inactivo
<i>Crataegus pubescens</i> (fruto)	Inactivo	Inactivo	Inactivo
<i>Guazuma ulmifolia</i> (hoja)	Inactivo	Inactivo	Inactivo
<i>Lippia graveolens</i> (hoja)	Inactivo	Inactivo	Inactivo

Fuente: Datos experimentales.

## IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

*Campylobacter jejuni* es uno de los principales agentes causales de diarreas con una tasa de infección y resistencia hacia los antibióticos que ha ido en constante aumento en los últimos años (1). El presente estudio pretendió evaluar la actividad antimicrobiana de *C. jejuni* por extractos de plantas, como alternativa terapéutica a tales problemas.

De una cepa estándar (ATCC 33291) y un aislamiento clínico de *C. jejuni* obtenido previamente en el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Facultad de CC.QQ. y Farmacia, se comprobó la pureza e identidad de los cultivos por técnicas microbiológicas, pruebas bioquímicas y de susceptibilidad, previo a efectuar los ensayos.

En el muestreo para obtener nuevos aislamientos clínicos, se logró aislar *Campylobacter* sp. en seis muestras de heces, pero sólo uno fue confirmado como *C. jejuni*. Las muestras provenían de una guardería y una comunidad en Puerto Barrios, Izabal, y es en ésta última donde se obtuvo el mayor número de casos de *Campylobacter*. Las condiciones en las que se encontraban la comunidad eran precarias, ya que no tienen los servicios básicos de vivienda, no hay centros de salud cercanos, además tienen malos hábitos de higiene y cohabitan con aves domésticas, lo que hace propicia la propagación de éste microorganismo. Se realizó un examen de heces paralelo a los aislamientos y se observó que en todos los casos de *Campylobacter* se asociaron a infección por parásitos intestinales, principalmente *A. lumbricoides* y *T. trichiuria*, los cuales son frecuentes en regiones cálidas del país e indicadores de condiciones sanitarias precarias. Los aislamientos de *Campylobacter* se realizaron por el método de filtración por membrana, el cual demostró ser eficaz en la recuperación de este microorganismo a partir de muestras clínicas.

La curva de susceptibilidad de la cepa ATCC frente a la eritromicina para la validación del método, fue aceptable ya que se demostró que la concentración del antibiótico es directamente proporcional al halo de inhibición de la bacteria. Así mismo, según datos proporcionados por diversos estudios de susceptibilidad de *C. jejuni* (58), mencionan que un halo de inhibición de  $\leq 13$  mm es resistente, 14-22 mm es intermedio y

$\geq 23$  mm es susceptible; por lo que en este ensayo se observó que *in vitro* el microorganismo es susceptible a concentraciones mayores de 25 mg/mL, similar a concentraciones evaluadas en otros estudios que se sitúan entre 15 y 30 mg/mL.

Ninguno de los extractos etanólicos de las plantas en estudio demostró actividad contra la cepa ATCC 33291 y aislamientos clínicos de *C. jejuni*, por lo que no se aprueba la hipótesis planteada en esta investigación. Aunque en este estudio no se encontró actividad antimicrobiana contra *C. jejuni*, sí se ha encontrado con otras bacterias enteropatógenas tal es el caso de *B. orellana*, *Lippia graveolens*, *Guazuma ulmifolia* presentan actividad contra *S. typhi*, *S. flexneri* y *S. dysenteriae* respectivamente.

## X. CONCLUSIONES

1. Ninguno de los extractos etanólicos de la hoja de *B. orellana*, *C. caimito*, *G. ulmifolia*, *L. graveolens* y el fruto de *C. pubescens* demostró actividad contra las cepas de *C. jejuni* incluida en este estudio.
2. Se logró un aislamiento clínico de *C. jejuni* en un niño sintomático del departamento de Izabal.
3. Las deficientes condiciones sanitarias y nutricionales en las que vive la población en el área rural hace propicia la propagación de *C. jejuni*.
4. El método de filtración por membrana resultó eficiente para la recuperación de *C. jejuni*, a partir muestras clínicas.

## XI. RECOMENDACIONES

1. Utilizar el método de filtración por membrana para realizar aislamientos clínicos de *C. jejuni*.
2. Realizar estudios epidemiológicos de *C. jejuni* y su impacto en salud pública, para evaluar el grado de crecimiento de la infección en la población susceptible.
3. Continuar con la investigación de actividad contra *C. jejuni*, con otras plantas utilizadas popularmente para tratar afecciones gastrointestinales, que aún no han sido evaluadas.
4. Utilizar diferentes metodologías para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos frente a *C. jejuni*.

## XII. REFERENCIAS

1. González WP. Determinación de resistencia antimicrobiana en cepas guatemaltecas de *Campylobacter jejuni*. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2001. 85pp.
2. Pumarola A, *et al.* Microbiología y Parasitología médica. 2Ed España: Editorial Masson S.A., 1987. 466p.
3. Paz AM. Búsqueda de actividad contra especies de *Campylobacter* en plantas nativas de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis maestría multidisciplinaria en producción y uso de plantas medicinales, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Facultad de Agronomía) 2005. 60p.
4. Cáceres A. *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. J Etnopharmacol. 1990;(30):55-73.
5. Koneman EW, *et al.* Diagnóstico microbiológico texto y atlas color. 5Ed Benecia F, trad. Buenos Aires, Argentina: Editorial Panamericana, 1999. 1432 pp.
6. Walker TS. Microbiología. Aguilar MT, trad. México: Interamericana Editores, 2000. 532p. (p.175-77).
7. Camas MA. Aislamiento e identificación de *Campylobacter* spp. en muestras de heces referidas al Laboratorio Nacional de Salud, provenientes del área de salud del departamento de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2006. 59p.
8. Murray P. Microbiología médica. España: Editorial General, 1987. 725pp.
9. Konkel ME, *et al.* Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* virulence determinants. In *Campylobacter*, Nachamkin I, Blaser MJ.

- Campylobacter*, 2Ed Washington: American Society for Microbiology, 2000.
10. The increasing incidence of human Campylobacteriosis. Report an Proceedings of a WHO Consultation of Experts. Copenhagen, Denmark, 2000. Disponible en <http://www.who.int/emc>. Fecha de consulta: Septiembre, 2006.
  11. Wolfgang K, Joklik HP, Willetty DB. 17Ed Zinsser Microbiología. Argentina: Medica Panamericana, 1983.
  12. Oberhelman RA, Taylor DN. *Campylobacter* infections in developing countries. In: Nachamkin I, Blaser MJ, editors. *Campylobacter*, 2Ed Washington: American Society for Microbiology, 2000.
  13. Cruz JR, *et al.* Infection, diarrhea, and dysentery caused by *Shigella* species and *Campylobacter jejuni* among Guatemalan rural children. *Pediatr Infect Dis J.* 1994;(13):216-23.
  14. Cruz JR, *et al.* Etiología de diarrea aguda en infantes de áreas marginales de Guatemala. *Memorias del III Congreso Nacional de Microbiología.* Guatemala, 1986.
  15. Torres M. Manual práctico de bacteriología médica. Guatemala: Editorial Serviprensa C.A., 1999. 223pp.
  16. Molina J, *et al.* *Campylobacter* infections in HIV-infected patients; clinical and bacteriological features. *AIDS* 1995;9(8): 5-881.
  17. Tech Doc: Identification of *Campylobacter* species, Issue No. 1. Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory, Specialist and Reference Microbiology Division, Reference no: BSOP ID 23, SOP from Health Protection Agency.
  18. Tech Doc: SOP for detection of *Campylobacter jejuni* in stool samples. INCAP-NS-NL BD-003-2, approved by Burgeois AL, O Torres & R. Pratdesaba, 1999; 10 pp.
  19. López JV. Infecciones por *Campylobacter jejuni* en niños: Infecciones recurrentes o persistentes? Comparación de cepas por ribotipia. Guatemala:

- Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1994.
20. Balocos A, William J, Hausler J. Bacterial Mycotic and Parasitic Infections. 6a. ed. Washington D.C.: American Public Health Association, 1981 (p. 301-09).
  21. Gupta A. Antimicrobial Resistance among *Campylobacter* strains, United States, 1997-2001. Disponible en <http://www.cdc.gov/eid>. Fecha de consulta: Septiembre 2006.
  22. Cáceres A. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria, USAC, 1999. 402pp.
  23. Lorenzana LF. Actividad biocida de 6 plantas de uso medicinal en el municipio de Tacaná, San Marcos. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2003.
  24. Domingo D, López M. Plantas con acción antimicrobiana. Rev Esp Quimioterap. 2003;16(4):385-393.
  25. Dixon RA. Natural products and plant disease resistance. Nature 2001; 411:843-47.
  26. Tegos G *et al.* Multidrug puma inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. Antimicrob Agents Chemoter 2002; 46:3133-3141.
  27. Cáceres A, Girón LM. Etnomedicina en Guatemala. Guatemala. CEFOL, 1984. pp.283-316.
  28. Cáceres A, *et al.* Screening of sixteen plants for treatment of respiratory disease. J Ethnopharmacol, 1990; 1(30):55-67.
  29. Cáceres A. *et al.* Rev. USAC. Guatemala. Memorias del XI Cong. CA. Microbiol. 1990;(10): 48-60.
  30. Del Cid NE. Actividad de 17 extractos de 12 plantas nativas guatemaltecas contra *Fonseca pedrosoi*. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2005.
  31. Plantas curativas. Disponible en <http://www.webcolombia.com>. Fecha de consulta: Septiembre 2006.

32. Fleischer TC. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. Fito. 2003;(74):136-38.
33. Baudi JC. Plantas medicinales existentes en Venezuela y Latino América. Caracas, Venezuela: Editorial América. 1987.
34. Argueta A. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional. México, 1996. (p.1322-1323).
35. Especies con usos no maderables en bosques de encino, pino y pino-encino en los Estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca. Semarnap. Disponible en <http://www.procymaf.org>. Fecha de consulta : Septiembre 2006.
36. Hor M, Rimpler H, Heinrich M. Inhibition of Intestinal Chloride Secretion by Proanthocyanidins from *Guazuma ulmifolia*. Planta Med. 1995;(61):208-212.
37. Germosen L. Hacia una Farmacopea caribeña. República Dominicana: TRAMIL 4 Seminario, 1995. 334pp.
38. Duarte SO *et al.* Antimicrobial activity of *Terminalia macroptera* root. J. Ethnopharmacol. 1997;57(3):203-207.
39. Paulo A *et al.* *Cryptolepis sanguinolenta* activity against diarrhoeal bacteria. J. Ethnopharmacol. 1994;44(2):73-77.
40. Lee CF, Han CK, Tsau JL. *In vitro* inhibitory activity of Chinese leek extract against *Campylobacter* species. Int J Food Microbiol. 2004 15;94(2):169-174.
41. García M *et al.* Efecto de extractos metabólicos de plantas comestibles sobre el crecimiento de *Campylobacter jejuni* y *C. coli*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Memorias del Congreso Internacional de Inocuidad Alimentaria. 2005. 111pp.
42. Manual del Fabricante BUCHI Flawil: Buche laboratorio Doc. Tec. 2002. 44pp.
43. Manual de procedimientos del Proyecto biodiversidad OEA Doc. Tec. 1993. (p. 2-3).

44. Wayne WD. Bioestadística; Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4a.ed. México: Editorial Limusa. 2002. 755pp.
45. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock Biología de los Microorganismos. 8a.ed. España: Prentice Hall Iberia, 1999. 1064pp.
46. Morton JF. Atlas of Medicinal plants of middle America (Bahamas to Yucatán). Illinois, USA: Charles C. Thomas Publisher. 1981. 1420pp.
47. Morton JF. Fruits of Warm Climates. USA: Media Incorporated, 1987. 505pp.
48. Flores MT. Purificación de tres antígenos de alto peso molecular de *Campylobacter jejuni*, con potencial de ser utilizados como vacuna. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1997. 55pp.
49. Frazier WC, Westhoff DC. Microbiología de los alimentos. 4a.ed. Ramis DM, trad. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A., 1993. 681pp.
50. Brooks GF, Batel JS, Ornaton LN. Microbiología médica de Jawetz, Menlnick y Adelberg. 15a.ed. México: Manual Moderno, 1997. 807pp.
51. Ralda MA. Conocimientos, creencias y prácticas sobre el uso de plantas medicinales en el tratamiento de la diarrea infecciosa respiratoria aguda y enfermedades de la piel en niños menores de 5 años en una comunidad rural. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación. Facultad de Ciencias Médicas) 1990. 139pp.
52. Murphy C, Carroll C, Jordan K. The effect of different media on the survival and induction of stress responses by *Campylobacter jejuni*. J Microb. Methods. 2005;(62):161-166.
53. Godoy BE. *Campylobacter* en diarrea aguda en niños. Estudio realizado en 100 niños de 0-5 años de edad que consultaron al Hospital Roosevelt por diarrea aguda durante el mes de Diciembre de 1987. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación. Facultad de Ciencias Médicas) 1988. 56pp.

54. González DG. *Campylobacter jejuni* como agente infeccioso de diarrea infantil en Guatemala. Estudio comparativo de *Campylobacter jejuni* en medio selectivo y a través del examen rápido de tinción de flagelos en 100 muestras de niños de 0 a 5 años de edad, provenientes de Centros de Salud en la ciudad capital. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (tesis de graduación. Facultad de Ciencias Médicas) 1988. 60pp.
55. Ishihara K, *et al.* Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* isolated from food-producing animals on farms (1999-2001): results from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. J Antimicrob. Agents. 2004 ;(24):63-69.
56. Oncul O, *et al.* Antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter jejuni*: a comparison between Etest and agar dilution method. J Diagnos. Microb. 2003;(45):69-71.
57. Freixa B. Alphitolic acid: an unusual triterpenoid from leaves of *Bixa orellana* and evaluation of its antifungal activity. Memorias del Congreso de Plantas Medicinales. Barcelona, España. 2002.
58. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S16. 2006; (26): 178pp.
59. Fernández H, Farace M. Manual de procedimientos. Diagnóstico de *Campylobacter* en muestras clínicas y de alimentos. Global Sal/Surv, WHO, CDL, CSR, Universidad Austral de Chile. 2000.

## XII. ANEXOS

### Anexo 1. Aislamiento clínico de *C. jejuni*



Arriba de izquierda a derecha: a) Recolección de muestras, datos generales y epidemiológicos de la comunidad. b) Incubación de las muestras recolectadas.

Abajo de izquierda a derecha: a) Siembra de muestras clínicas. b) Aislamientos en medios de cultivo.

## Anexo 2. Identificación y confirmación de *C. jejuni*



Arriba de izquierda a derecha: a) Colonias sugestivas de *C. jejuni*. b) Realización de pruebas: catalasa y oxidasa.

En medio: Gram de colonias sugestivas de *C. jejuni*. Observar formas en alas de gaviota.

Abajo de izquierda a derecha: Realización de Test de urea. b) Prueba de hipurato positiva del único aislamiento de *C. jejuni*.

### Anexo 3. Impregnación de discos con extractos de plantas.



Arriba de izquierda a derecha: a) Material utilizado para impregnación. b) Diluciones de extractos

Abajo: Diluciones de diferentes concentraciones de Eritromicina.

Anexo 4. Ensayo de actividad anti-*C jejuni* por extractos de plantas



Arriba de izquierda a derecha: a,b,c) Lectura del ensayo de las plantas: *B. orellana*, *C. caimito*, *C. pubescens*, respectivamente. No se observa ningún halo de inhibición alrededor de los discos, solo en los controles positivos (discos al centro).

Abajo de izquierda a derecha: Lectura ensayo con extractos de plantas y curva de susceptibilidad.



Br. Christian Samuel Alvarez Privado  
Autor

M.A. Margarita Paz de Ramírez  
Asesora

Licda. Rosario Hernández  
Revisora

Licda. Isabel Gaitán  
Revisora

M.Sc. Vivian Matta Rios de García  
Directora

Ph.D. Oscar Cobar Pinto  
Decano