

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

**BÚSQUEDA DE ACTIVIDAD CONTRA *Campylobacter jejuni* EN CINCO  
PLANTAS DE USO POPULAR GUATEMALTECO.**

**Carla Fabiola Alvarado Sánchez**

**Química Bióloga**

Guatemala, Noviembre de 2007

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

**BÚSQUEDA DE ACTIVIDAD CONTRA *Campylobacter jejuni* EN CINCO  
PLANTAS DE USO POPULAR GUATEMALTECO.**

Informe de Tesis

Presentado por

**Carla Fabiola Alvarado Sánchez**

Para optar al título de

**Química Bióloga**

Guatemala, Noviembre de 2007

## JUNTA DIRECTIVA

Oscar C3bar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antill3n, M.A.	Vocal I
Licda. Lilitana Vides de Urizar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jim3nez	Vocal III
Br. Mariesmeralda Arriaga Monterroso	Vocal IV
Br. Jos3 Juan Vega P3rez	Vocal V

## **ACTO QUE DEDICO**

**A Dios:** Ser supremo creador quien me ha guiado, acompañado y llenado de sabiduría en todo momento.

**A la Virgen María:** Quien con su manto bendito me cubre y acompaña

**A mi madre Regina Sánchez y abuela Amanda Morales:** Este triunfo es gracias a su lucha, amor y entrega.

**A mi abuela Jesús Palencia:** Por su ejemplo de superación, fe y amor.

**A mis hermanas y Familia en general:** Por su apoyo y cariño incondicional

**A mis amigos y mi novio:** Gracias por esos recuerdos que quedaran en mi por siempre, se que cuento con ustedes en las buenas y las malas

**Y a todas las personas:** Que han estado conmigo y me han brindado incondicionalmente todo su apoyo, cariño y bondad.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Universidad de San Carlos de Guatemala.** Casa de estudios en la que hoy culmino gran parte de mi formación profesional

**A la Casa Central.** Por la formación académica y espiritual

**A mis catedráticos.** Por su dedicación y ejemplo

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

**A la asesora. M.A. Margarita Paz de Ramírez.** Por su apoyo y conocimientos brindado para llevar a cabo esta investigación.

**A los revisores: MSc. Blanca Samayoa y Licda. Rosario Hernández:** por haber enriquecido esta investigación.

**Al Laboratorio Clínico Popular:** Por su apoyo y cariño

## ÍNDICE

<b>I. RESUMEN</b>	1
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>III. ANTECEDENTES</b>	4
<b>A. <i>Campylobacter jejuni</i></b>	
1. Características generales	4
2. Epidemiología	4
3. Fisiopatogenia	5
4. Presentación Clínica	6
5. Infecciones asociadas más comunes	8
6. Transmisión	8
7. Factores de virulencia	9
8. Aislamiento e identificación	10
9. Tratamiento	12
<b>B. PLANTAS MEDICINALES</b>	13
1. Sustancias con acción antimicrobiana procedentes de plantas.	14
2. Determinación de la actividad antimicrobiana de las plantas.	15
3. Uso de plantas como opción terapéutica Contra infecciones en Guatemala	16
<b>C. BUSQUEDA DE ACTIVIDAD CONTRA</b>	17
<b>C. <i>jejuni</i> EN PLANTAS</b>	
1. <i>Wigandia urens</i>	18
2. <i>Satureja brownei</i>	19
3. <i>Justicia pectorales</i>	19
4. <i>Licania platypus</i>	20
5. <i>Bacharis trinervis</i>	20
<b>IV. JUSTIFICACION</b>	21
<b>V. OBJETIVOS</b>	22

<b>VI.</b>	<b>HIPOTESIS</b>	23
<b>VII.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS</b>	24
<b>VIII.</b>	<b>RESULTADOS</b>	33
<b>IX.</b>	<b>DISCUSION DE RESULTADOS</b>	36
<b>X.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	38
<b>XI.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	39
<b>XII.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	40
<b>XIII.</b>	<b>ANEXOS</b>	44

## I. RESUMEN

*Campylobacter jejuni*, es un agente etiológico de diarrea principalmente en niños menores de 5 años. Las condiciones de aislamiento de esta bacteria son especiales lo cual ha dificultado su estudio en relación a otros agentes patógenos gastrointestinales, sin embargo, su importancia clínica y la búsqueda de alternativas terapéuticas tanto de origen natural como sintéticas prevalecen.

El presente estudio evaluó la actividad de extractos etanólicos de cinco plantas utilizadas popularmente para el tratamiento de afecciones gastrointestinales, contra tres aislamientos clínicos y la cepa ATCC 33291 de *Campylobacter jejuni*. Las plantas utilizadas fueron *Bacharis trinervis*, *Justicia pectoralis*, *Wigandia urens*, *Licania platypus* y *Satureja brownei*.

Se realizó el ensayo de actividad antibacteriana *in vitro* por el método de difusión en agar que consistió en enfrentar la bacteria, con los extractos de plantas mediante discos impregnados por los mismos, utilizando el medio de agar Columbia-sangre. Para validar el método utilizado se realizó una curva de susceptibilidad en la cual se sometió la bacteria a diferentes concentraciones de eritromicina, que es el antimicrobiano de elección.

El estudio fue experimental de diseño completamente aleatorizado. Los resultados de los ensayos mostraron ausencia de actividad inhibitoria contra la cepa ATCC y los aislamientos clínicos de *C. jejuni*, en los cinco extractos de plantas que fueron estudiados ( $p < 0.05$ ). Sin embargo se evaluaron criterios utilizados en la investigación para la mejora de los resultados en posteriores estudios.



## II. INTRODUCCIÓN

Las condiciones sanitarias y de higiene deficientes en que vive una buena parte de la población de países en vías de desarrollo, han ocasionado el aumento de infecciones gastrointestinales por *Campylobacter jejuni*, bacteria que en Guatemala es uno de los agentes etiológicos comunes de este tipo de infección (1,2).

*C. jejuni* es una bacteria bacilar, curva, Gram negativo, oxidasa positivo, que para su cultivo requiere un ambiente estricto de microaerofilia y temperatura de 37°C, pero se utiliza su capacidad diferencial (termófila) de crecer a 42°C para aislarlo (2,3). *C. jejuni* causa diarrea severa por infección gastrointestinal en niños pequeños, principalmente en menores de 5 años. El tratamiento de elección es eritromicina, sin embargo, su uso puede ocasionar efectos no deseados; además se ha observado un incremento en el desarrollo de resistencia a dicho antibiótico. Debido a los efectos secundarios que provocan algunos fármacos sintéticos, los altos costos y el creciente número de infecciones por este microorganismo, es necesario investigar alternativas terapéuticas que sean accesibles, seguras, económicas y eficaces para combatirlas (4,5).

La fitoterapia cumple con las características previamente mencionadas, actualmente es objeto de investigación. Los estudios demuestran la eficacia de la utilización de extractos de plantas utilizadas popularmente en diversos países para tratar afecciones gastrointestinales. Sin embargo, los estudios para evaluar la sensibilidad de *C. jejuni* a extractos vegetales son escasos. Paz en 2005, estudió extractos de 10 plantas que no mostraron actividad contra especies de *Campylobacter* (6). La presente investigación pretende continuar la búsqueda de actividad anti *C. jejuni*, utilizando extractos de cinco plantas contra una cepa

caracterizada y tres aislamientos clínicos de esta bacteria. Las plantas a utilizar son: *Bacharis trinervis* (barba de hombre), *Justicia pectoralis* (te criollo), *Wigandia urens* (ortiga), *Licania platypus* (sunzapote) y *Satureja brownei* (poleo); estas fueron elegidas por ser usadas por la población de Guatemala para tratar afecciones intestinales, además que su acción inhibitoria a patógenos intestinales ha sido comprobada, utilizando el extracto de diversas partes de estas plantas (7,8).

En Guatemala, *Justicia pectoralis* es utilizado para el tratamiento de diarreas; *Bacharis trinervis*, tiene actividad antiinflamatoria, antioxidante, diurético, es utilizado para el dolor de estómago entre otros. Un estudio demostró que el extracto etanólico de esta planta tiene actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*; *Wigandia urens*, cuyo nombre común es gato de monte, sus hojas y raíces son utilizadas para el dolor de estómago y riñones; *Licania platypus* es conocido como sonzapote y es utilizado para tratar diarreas y disentería. Finalmente las hojas de *Satureja brownei* tienen actividad fotoquímica utilizada para los vómitos y dolor de estómago (7-14).

### III. ANTECEDENTES

Los diferentes nombres que han recibido las diferentes especies de *Campylobacter* han dificultado la utilización de una nomenclatura universal. Al inicio, estos microorganismos fueron clasificados dentro del género *Vibrio*. Sin embargo, más tarde, debido a que presentan diferencias fundamentales con relación a la constitución del ADN y por su incapacidad de fermentar los hidratos de carbono, fueron agrupados en un nuevo género bacteriano denominado *Campylobacter* (1).

Actualmente se reconocen 9 especies pertenecientes al género *Campylobacter*, las cuales son: *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis*, *C. jejuni*, *C. fetus*, *C. coli*, *C. comcicus*, *C. mucosalis*, *C. sputorum* y *C. larij* (2,3).

#### A. *Campylobacter jejuni*

##### 1. Características generales

*Campylobacter jejuni* es un bacilo Gram-negativo, curvo, en espiral, en forma de "S" o de ala de gaviota, mide de 0.2 a 0.5  $\mu\text{m}$  de ancho y 1.5 a 5  $\mu\text{m}$  de largo. Presenta un solo flagelo polar que le proporciona un movimiento rápido y helicoidal, que lanza a la bacteria a manera de dardo (1,4).

##### 2. Epidemiología

La campilobacteriosis es una zoonosis de distribución mundial que afecta mayoritariamente los países en vías de desarrollo. Esta bacteria constituye la principal causa de gastroenteritis en el hombre, por delante incluso de los géneros *Salmonella* y *Shigella*. En países desarrollados se asocia a brotes epidémicos relacionados con consumo de alimentos contaminados,

especialmente pollo. En países en desarrollo su epidemiología se asocia más con contaminación fecal del ambiente, al igual que ocurre con el resto de los agentes productores de diarrea (3).

En Guatemala, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la tasa de aislamiento en niños, menores de 5 años es de 12.1%. Un estudio realizado en 1986, encontró a *C. jejuni* como el responsable del 9.5% de diarreas en niños guatemaltecos. Se estima una incidencia de 40,000-60,000/100,000 niños menores de 5 años que, comparada con la incidencia de países desarrollados que es de 300/100,000, demuestra que las condiciones socioeconómicas favorecen el desarrollo de este tipo de infecciones en infantes (5,15-17).

En países industrializados, *Campylobacter* es el primer agente de diarrea, siendo recuperado en 4-7% de los pacientes con diarrea y en 0-1% de individuos asintomáticos (18).

Las especies que producen diarrea de *Campylobacter* se encuentran habitualmente como comensales del tracto gastrointestinal de una gran variedad de mamíferos y de aves, tanto domésticos como de vida libre, es por ello que el contacto del hombre con los mismos ha sido asociado a campilobacteriosis (3).

De la misma forma que con otros patógenos entéricos, es importante tener presente, para efectos de prevención, la transmisión fecal-oral de persona a persona sobre todo en lactantes, que no controlan esfínteres (19).

### 3. Fisiopatogenia

El microorganismo se adquiere por vía oral (ingestión de comidas y bebidas contaminadas) o por contacto con animales infectados. *C. jejuni* es sensible al pH gástrico, por lo que debe ingerirse un inóculo de 10,00000 unidades formadoras de colonias (UFC), para que se produzca la infección. Sin embargo, en algunos casos ha probado ser altamente infectivo, provocando la infección con dosis del orden de 500 UFC. En todo caso, además de la dosis infectante, la producción de la enfermedad depende de los mecanismos defensivos del huésped (19,20).

El periodo de incubación es de 1 a 10 días con una media de 2 a 5 días. La infección afecta tanto intestino delgado como grueso. Estudios epidemiológicos realizados en países en vías de desarrollo e industrializados demuestran la existencia de cepas con distinto grado de patogenicidad y distintas respuestas del huésped a la infección. Estas variaciones en la presentación clínica hacen pensar en la existencia de importantes diferencias en los mecanismos de virulencia entre las cepas de distintas zonas geográficas (20).

*Campylobacter* no posee fimbrias pero, se ha demostrado que el flagelo y los lipopolisacáridos (LPS), actúan como adhesinas que le permiten la adherencia a la célula epitelial y al mucus intestinal, paso inicial para la instalación de la infección. La adherencia puede ser inhibida experimentalmente con anticuerpos anti-flagelo (21).

Muchas cepas pueden invadir las células epiteliales, provocando infiltrados inflamatorios de la lámina propia y abscesos en las criptas similares a los producidos por *Shigella*, apareciendo hematíes y leucocitos en las heces (diarreas inflamatorias o exudativas). También pueden atravesar mucosa intestinal y proliferar en la lámina propia y ganglios, de manera semejante a la

infección producida por *Salmonella* pudiendo, a partir de allí, generar infecciones extraintestinales, aunque la acción inhibitoria del suero contribuye a limitar la aparición de bacteriemias en la gran mayoría de los casos (21).

#### **4. Presentación Clínica**

La presentación puede ser variable, desde una forma leve de corta duración a un cuadro más severo y prolongado con características similares a shigelosis o salmonelosis (20).

La gastroenteritis aguda causada por *Campylobacter* se caracteriza por una rápida elevación de la temperatura, acompañada de malestar general, cefalea, dolores musculares y abdominales que preceden a la diarrea. La enfermedad se acompaña también de náuseas, vómitos, ruidos hidroaéreos, anorexia y tenesmo. La diarrea comienza generalmente a las 24 horas posteriores al inicio de los síntomas. Las deposiciones pueden ser disgregadas o acuosas, fétidas, mucosanguinolentas, oscuras o ligeramente verdosas. Con frecuencia se ven células de inflamación y un predominio de microorganismos de formas curvas y espirales (1). La enfermedad es autolimitante, alcanzando su mayor expresión entre el 2º y 4º día, remitiendo, completamente después del séptimo día.

La presentación clínica más común es la enterocolitis, la cual puede afectar a personas de todas las edades. En los neonatos puede presentarse con una o más deposiciones sanguinolentas y ningún otro síntoma. También se puede desarrollar sólo una fiebre tan severa y persistente que es necesario diferenciar de fiebre tifoidea (22). En pacientes inmunocomprometidos puede presentarse otras complicaciones como colecistitis aguda, pancreatitis, cistitis, artritis reactiva, síndrome urémico hemolítico, nefritis intersticial, hepatitis y,

varios días después del cuadro, se puede desarrollar un síndrome de Guillain-Barré (19).

Los casos más leves no requieren de tratamiento antimicrobiano, pero de cuando la presentación más grave o recidivante se trata, la droga de elección es la eritromicina, sin embargo en adultos también se puede utilizar ciprofloxacina (20).

## **5. Infecciones asociadas más comunes**

*C. jejuni* se incrimina como posible responsable del Síndrome de Guillain Barré (SGB), un desorden desmielinizante que afecta nervios periféricos causando una parálisis progresiva cuya recuperación tarda de 6 semanas a 2 años; también, puede presentarse una variante, conocida como el Síndrome de Miller-Fisher (oftalmoplejia y ataxia). Ambos síndromes se relacionan con anticuerpos contra componentes del lipopolisacárido de *Campylobacter* que reaccionan con los gangliosidos GM1 y GQ1b del tejido nervioso. Se calcula que el SGB se presenta en 1 de cada 1000 pacientes que sufren infecciones por *Campylobacter* (17,18).

Los pacientes que viven con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), cursan a menudo con diarrea y bacteremia asociadas a *Campylobacter* spp. Las especies aisladas incluyen a *C. jejuni*, *C. coli*, y *C. upsaliensis*. Así mismo se han observado crecientes cifras de resistencia antibiótica y de infecciones recurrentes en este grupo de pacientes. Por la creciente incidencia de personas con VIH/SIDA en los países en desarrollo y el aumento de casos en niños menores de 5 años, este grupo se encuentra a riesgo, de adquirir una enteritis por *C. jejuni* (5,23).

## 6. Transmisión

La infección se adquiere por vía oral, al consumir agua o alimentos contaminados, especialmente carne mal cocinada y leche no pasteurizada, los animales pueden transmitir la infección por medio de heces contaminadas, y el humano puede ser manipulador portador de la misma (3,22).

## 7. Factores de virulencia

El principal antígeno de *C. jejuni* 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 somáticos "O" y 50 antígenos capsulares o flagelares (21).

Se han aislado toxinas citopáticas de este microorganismo, algunas cepas producen toxinas termolábiles, cuyo control genético es plasmídico, muy semejantes a las de *Vibrio cholerae* y de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC). Este factor enterotóxico se une al gangliosido GM1 y activa la adenilciclase, aumentando el AMP cíclico, provocando una diarrea secretora (4, 21,22).

La presencia de sangre y leucocitos en las heces diarreicas indica que *C. jejuni* tiene capacidad enteroinvasiva y que hay afectación cólica (3). Konkell 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 (6,21).

## **8. Aislamiento e identificación**

### **a. Microscopia**

*C. jejuni* es un microorganismo delgado, que no se observa fácilmente en las muestras con la tinción de Gram. Cuando se visualizan las bacterias, aparecen como bacilos pequeños y curvos. Las parejas de bacterias adoptan una imagen como alas de gaviota (24).

La utilización de microscopía de contraste de fases o de campo oscuro para el examen en fresco de muestras fecales diarreicas puede permitir un diagnóstico presuntivo rápido. Sin embargo, es importante mencionar que para este caso las muestras deben recolectarse dentro de las 2 primeras horas de evacuación. En este análisis se observa la forma y la típica motilidad con giros sobre su propio eje (motilidad en sacacorchos) de las especies de *Campylobacter* y en la mayoría de los casos se puede observar también eritrocitos y leucocitos fecales (3).

### **b. Cultivo**

Las características del cultivo son de importancia máxima para el aislamiento y la identificación de *C. jejuni*.

Un medio de cultivo rico en nutrientes conjuntamente con una atmósfera pobre en oxígeno y rica en CO<sub>2</sub> produce un buen crecimiento de *Campylobacter*. Los antibióticos añadidos como suplemento selectivo inhiben la microbiota acompañante. Los medios utilizados para aislamiento de esta bacteria y sus elementos principales se enuncian a continuación:

- i. Skirrow: Agar sangre, vancomicina, polimixina, trimetoprim.
- ii. Butzler: Agar sangre, bacitracina, novobiocina, cefazolina, colistina, cicloheximida.
- iii. Campy BAP o Blazer: Agar sangre, vancomicina, polimixina, trimetoprim, cefalotina, anfotericina.
- iv. Base Columbia: Debe enriquecerse con 7.5% de sangre de carnero para que el crecimiento sea efectivo.

Para la incubación debe crearse una atmósfera con dióxido de carbono (10% de CO<sub>2</sub>) y reducción de oxígeno (5% de O<sub>2</sub>). La incubación de las placas primarias debe efectuarse a una temperatura de 42 a 43°C. Aunque *C. jejuni* crece bien a una temperatura de 36 a 37°C, la incubación a 42°C impide el crecimiento de la mayor parte de las otras bacterias que se encuentran en el excremento, lo cual simplifica la identificación de este microorganismo.

Las colonias son de aproximadamente 0.5 mm de diámetro, grises y de apariencia húmeda y mucosa que se extienden sobre la superficie del agar (27,28).

### **c. Pruebas bioquímicas de identificación**

Las pruebas de identificación utilizadas para *C. jejuni* son oxidasa, catalasa, reducción de nitratos y nitritos, ureasa, producción de H<sub>2</sub>S, hidrólisis del hipurato y de indoxi-acetato, susceptibilidad al ácido nalidixico y cefalotina.

Es productora de catalasa, y de ácido sulfhídrico, hidroliza el hipurato, no fermenta ni oxida los carbohidratos. Susceptible al ácido nalidíxico y a la cefalotina y es resistente al cloruro de trifeniltetrazolio (1,3,4,6).

Existen reportes que indican que se ha presentado resistencia al ácido nalidíxico, por lo que el esquema de identificación se altera (27,29).

## 9. Tratamiento

El uso de antibióticos es controversial, algunos estudios demuestran que la eritromicina elimina rápidamente a *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 ocasionada por *C. jejuni* han demostrado el beneficio del tratamiento temprano con eritromicina. El tratamiento de elección es la eritromicina (250mg cada 6 horas) o ciprofloxacina en dosis de 500 mg cada 12 horas durante 10 días. Los síntomas severos pueden responder a un tratamiento con antibióticos como azitromicina, ciprofloxacina, eritromicina o fluoroquinolona (1, 27, 30).

La infección en personas adultas y sin inmunosupresión es autolimitante por lo que generalmente no se trata con antibióticos. Las medidas terapéuticas 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 (5).

### a. Resistencia de *C. jejuni* a los antibióticos

La resistencia a los antibióticos de elección para el tratamiento de la enteritis provocada por *C. jejuni*, ha ido en incremento principalmente en los países en vías de desarrollo a causa de la automedicación y de su uso en infecciones distintas a la gastroenteritis. Se ha observado además que el uso de pequeñas dosis subterapéuticas de antimicrobianos, como aditivos alimenticios los cuales son utilizados como promotores de crecimiento en la industria alimentaria, incrementa el desarrollo de resistencia antimicrobiana en las bacterias que colonizan los alimentos incluyendo *C. jejuni* (27,31).

Un estudio realizado por Smith K. *et al* (1992-1998), en Minnesota Estados Unidos, demostró un aumento en la resistencia a quinolonas en los aislamientos de *C. jejuni* a partir de humanos, de 1.3% en 1992 a 10.2% en 1998. Demostrando además picos estacionales en la resistencia a quinolonas, sobre todo en personas que viajaban al exterior durante el invierno. Durante 1996 a 1998 se reportó un incremento en la tasa de infecciones resistentes adquiridas domésticamente. Una investigación paralela, demostró que los productos domésticos de pollos obtenidos en los expendios en 1997 tenían mayores tasas de contaminación con *C. jejuni* resistente a la ciprofloxacina. Con estos importantes hallazgos, se identificó una asociación entre los subtipos moleculares de las cepas de *C. jejuni* que fueron adquiridas domésticamente en humanos y aquellos encontrados en productos de carne de pollo. Finalmente, el aumento significativo de infecciones resistentes a quinolonas adquiridas domésticamente, fue asociado con el uso autorizado en EEUU entre 1995 y 1996 de fluoroquinolonas (32).

Un estudio realizado en Guatemala por González, evaluó la resistencia a cuatro agentes antimicrobianos utilizando 100 cepas obtenidas de aislamientos clínicos en los años 1987 a 1989 y 6 durante 1998 a 2000. Ese estudio reportó una resistencia del 3% a la eritromicina, 1% a la ciprofloxacina y tetraciclina y 2% a la ampicilina para el primer grupo. En el segundo grupo obtuvo un 16.7% de cepas resistentes a la eritromicina, 33.3% a la ciprofloxacina y 50% de resistencia tanto a la tetraciclina como a la ampicilina (27).

## **B. PLANTAS MEDICINALES**

Se entiende por planta medicinal, cualquier “planta” que cuando se administra en cualquier forma y por cualquier vía al hombre o a los animales ejerce algún tipo de acción farmacológica sobre éstos (33).

Actualmente existe un gran interés en la investigación de sustancias antimicrobianas de plantas y prueba de ello es que diferentes compañías farmacéuticas centran sus esfuerzos en este campo. Por otro lado, la población esta cada vez más interesada en este tipo de “terapias alternativas”, como lo demuestran las cifras crecientes del mercado de medicinas botánicas o herbales en todo el mundo (34,35).

Para la equiparación y uso oficial de los medicamentos fitoterapéuticos es necesario recabar el conocimiento y prácticas populares en forma precisa a través de una metodología que haga posible la recuperación de las prácticas de curación y los recursos terapéuticos empleados, que permita su validación científica e integración a los sistemas oficiales de salud. Es necesario equipara, producir y comercializar las plantas medicinales y productos derivados como una alternativa terapéutica para toda la población (33).

### **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, esto con el propósito de adquirir defensa contra de predadores.

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 (36). Existen además diversos compuestos químicos aislados de plantas que directa o indirectamente aportan un poder antimicrobiano. Los principales grupos de compuestos generados por las plantas son: fenoles simples, quinonas, taninos, cumarinas, flavonas y alcaloides (34).

## **2. Determinación de la actividad antimicrobiana de las plantas**

La determinación de la actividad antimicrobiana de las plantas tiene como objetivo comprobar *in vitro*, la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas de una droga vegetal (5).

La determinación de la actividad antimicrobiana puede dividirse en 2 fases: el tamizaje y la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM).

### **a. Tamizaje**

Para la determinación de la actividad antibacteriana en extractos vegetales, el ensayo de elección es el de dilución en agar. En este proceso una determinada cantidad del extracto a estudiar es mezclado con agar nutritivo. El extracto etanólico posee concentración de alcohol al 70% es por ello que no requiere esterilización, por lo que es considerado una ventaja del método. Los microorganismos son mantenidos en medio tripticasa soya y recuperados para la prueba mediante incubación en caldo por 24 horas. Luego los microorganismos son diluidos 1:100 e incubados en placa de agar conteniendo el extracto vegetal en cuadruplicado siguiendo un patrón radial en orden aleatorio. Después de un tiempo de incubación se realizan las lecturas evaluando la presencia o ausencia de crecimiento. Una completa supresión del crecimiento microbiano es requerida para declarar que el extracto es activo. La

actividad debe ser confirmada realizando un nuevo ensayo utilizando diluciones seriadas para determinar la CIM (37).

#### **b. Concentración Mínima Inhibitoria**

La actividad de los extractos debe ser confirmada realizando un nuevo ensayo utilizando diluciones seriadas para determinar la CIM (37). Es importante destacar que una gran proporción de los productos sintetizados con carácter antimicrobiano muestran en las pruebas de sensibilidad *in vitro*, concentraciones inhibitorias mínimas establecidas (38).

### **3. Uso de plantas como opción terapéutica contra infecciones en Guatemala**

Guatemala es un país que posee una amplia diversidad de flora, la cuál es aprovechada por la población para uso alimenticio y medicinal entre otros. Las culturas autóctonas utilizan las plantas como opción terapéutica, desde tiempos remotos.

Por lo menos 623 plantas se usan para tratar infecciones en Guatemala, según la detección etnobotánica y bibliográfica, lo que ha motivado investigaciones para analizar los extractos de las mismas y comprobar la actividad *in vitro*, contra diversos patógenos. Hasta 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 (7,8).

Dentro de las entidades que realizan estudios de plantas *in vitro*, se encuentran la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, Universidad del Valle de Guatemala, Centro de Estudios Mesoamericanos sobre Tecnología Apropiable –CEMAT—y el Laboratorio de productos Fitofarmacéuticos –FARMAYA- de Guatemala. Las cuales se encargan de investigar efectos tóxicos, propiedades antibacterianas, antifúngicas y antiparasitarias de las plantas.

## C. BÚSQUEDA DE ACTIVIDAD CONTRA *Campylobacter jejuni*, EN PLANTAS

Estudios realizados demuestran la utilidad de las plantas para el tratamiento de la campilobacteriosis. Un estudio realizado por Paulo A. *et al* utilizando la planta *Cryptolepis sanguinolenta*, demostró la actividad del extracto etanólico, acuoso y del alcaloide criptolepina, contra 65 aislamientos de casos de gastroenteritis por *C. jejuni* y 41 de *C. coli* en Portugal, Angola y Brasil. Se determinó una CIM del extracto etanólico contra las cepas de *Campylobacter* de 25 µg/ml, lo cual es mayor que el cotrimoxazol y sulfametoxazol. La criptolepina fue activa igual que la ampicilina con una CIM de 12.5 µg / ml (10).

Un estudio realizado en Tailandia, contra diversos agentes enteropatógenos, incluyendo *C. jejuni*, utilizó diversos aceites esenciales encontrando actividad antibacteriana en *Zingiber cassununa*, *Cinnamomun bejolghota*, *Mentha arvensis*, *Cymbopogon citratus* y *Ocimum basilicum* var *citratum* (11).

En Guatemala, Paz, en el 2005 utilizó extractos de 10 plantas utilizadas popularmente en el país para el tratamiento de gastroenteritis, en la búsqueda de actividad contra especies de *Campylobacter*, sin encontrar ninguna actividad en los mismos contra esta bacteria (6). Álvarez en el 2007 utilizó extractos de 5 plantas de clima cálido utilizadas popularmente en Guatemala para el tratamiento de infecciones gastrointestinales, en la búsqueda de actividad contra *C. jejuni*, sin obtener un resultado que demostrase la misma (39).

En la presente investigación se utilizarán extractos de 5 plantas nativas de Guatemala utilizadas para tratar diferentes afecciones gastrointestinales lo



cual motiva la investigación para evaluar su actividad antimicrobiana contra *C. jejuni*. Las plantas a evaluar serán las siguientes:

## **1. *Wigandia urens***

### **a. Nombres comunes**

Mala mujer y ortiga

### **b. Distribución**

Desde México hasta Colombia.

### **c. Descripción**

Arbusto fanerofito, hermafrodita, semileñoso que puede alcanzar hasta tres metros de altura. Está densamente cubierto de pelos urticantes. Posee hojas lisas y glandulosas, flores de color blanco azulado y fruto en dos valvas con numerosas semillas.

### **d. Usos**

Afecciones estomacales y dolor de riñones.

### **e. Sustancias aisladas**

Flavonoides, fenoles, esteroides y glucósidos (11).

## **2. *Satureja brownei***

### **a. Nombres comunes**

Menta y poleo.

### **b. Distribución**

Centro y Sur América

### **c. Descripción**

Es una hierba delgada, procumbente, aromática, de 1 a 4 dm de altura; hojas opuestas, suborbiculares a anchamente aovadas, de 5 a 12 mm; ápice obtuso, base truncada a cuneada o subacorazonada, margen ondulado o crenado; inflorescencia en cimas laxas, con flores de pedicelos filiformes;

flores bilabidas, de 7 a 8 mm, moradas con manchas blancas, con el labio superior a veces retuso, cáliz subcilíndrico, de 4 a 5 mm, peloso en la garganta; clusas oblongas.

#### **d. Usos**

La población atribuye a esta especie las mismas propiedades que las del género *Mentha* y la emplea en decocción de las ramas para el tratamiento de afecciones estomacales e intestinales (40).

### **3. *Justicia pectoralis***

#### **a. Nombres comunes**

Té criollo, tilo cubano, curia.

#### **b. Distribución**

Centro América y México.

#### **c. Descripción**

*Justicia pectoralis* es una hierba que puede alcanzar 1 m de altura, poco ramificada; hojas lanceoladas, acuminadas en el ápice y obtusas en la base; inflorescencia terminal erecta con numerosas flores pequeñas de color rosado; el fruto es una cápsula pequeña de color marrón.

#### **d. Usos**

Expectorante, pectoral, béquico, cicatrizante, afrodisíaco, gripe, tos, infecciones de las vías respiratorias superiores, dermatitis, heridas, aftas, fiebre, dolor de estomago. En la Amazonia brasileña se usa el zumo del para instilaciones en el oído en el caso de dolor e infecciones. En el Perú se usa el baño con infusión de las hojas como febrífugo; la inhalación de las hojas y del tallo en las jaquecas; el jugo de las hojas es aplicado en las aftas y la infusión sirve como afrodisíaco y respiratorio (13).

#### **4. *Licania platypus***

##### **a. Nombres comunes**

Urraco, sungano, sunzapote, sunza.

##### **b. Distribución**

Desde México hasta Colombia.

##### **c. Descripción**

Árbol de hasta 30m. Hojas simples, alternas, de 10 a 30 cm. de largo, de 3-8 cm. de ancho, oblongo o elípticas, glabras en ambas superficies. Flores en panículas terminales, de 10-30 cm. de largo pubescentes, flores pardo verdosas con estambres numerosos, aromáticas. Fruto una drupa grande, de 20 cm. de largo y 14 cm. de ancho, con pulpa amarilla y una semilla cubierto con pelos.

##### **d. Usos**

Se ha reportado eficacia para el tratamiento de diarrea y disentería (40).

#### **5. *Bacharis trinervis***

##### **a. Nombres comunes**

Barba de hombre.

##### **b. Distribución**

Desde México hasta Brasil.

##### **c. Descripción**

Arbusto corto, posee flores blancas.

##### **d. Usos**

Para tratar afecciones gastrointestinales, antiséptico, tiespasmódico, antirreumático, dolores de cabeza, desordenes hepatobiliares, analgésico, antioxidante, antiinflamatorio. Se ha encontrado actividad biológica analgésica, antibacteriana, antioxidante y antifungica (14).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones bacterianas del tracto gastrointestinal son un problema de salud que afectan a la población guatemalteca. *Campylobacter jejuni* es uno de los principales agentes etiológicos de diarrea que afecta mayoritariamente a la población infantil, menor de 5 años y pacientes inmunosuprimidos. Los antibióticos de elección para el tratamiento de este agente patógeno son eritromicina y ciprofloxacina. Su uso es efectivo, sin embargo, puede ocasionar efectos no deseados comprobándose además un incremento en la resistencia a los mismos (2,27, 31,32).

Debido a los efectos secundarios que provocan algunos fármacos sintéticos, los altos costos y el creciente número de infecciones por este microorganismo, se hace necesario investigar alternativas terapéuticas que sean accesibles, seguras, económicas y eficaces para combatirlos (2,4,5).

La fitoterapia cumple con estas características y por ello, actualmente, es objeto de investigación. Los estudios demuestran la eficacia de la utilización de extractos de plantas utilizadas popularmente en diversos países para tratar afecciones gastrointestinales. Las investigaciones para evaluar la sensibilidad de *C. jejuni* a extractos vegetales son escasas.

Este estudio evaluará la actividad contra *C. jejuni*, utilizando los extractos etanólicos de cinco plantas, *Bacharis trinervis*(hoja), *Justicia pectoralis*(tallo), *Wigandia urens*(flor), *Licania platypus*(fruto) y *Satureja brownei*(hoja), frente a la cepa ATCC 33291 y 3 aislamientos clínicos.

## V. OBJETIVOS

### A. General

Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos de cinco plantas de uso popular para tratar infecciones gastrointestinales en Guatemala, contra *Campylobacter jejuni*.

### B. Específicos

1. Determinar la concentración inhibitoria mínima de los extractos que resulten activos contra *C. jejuni*.

## VI. HIPÓTESIS

Al menos un extracto de las plantas utilizadas en el estudio presenta actividad antimicrobiana contra *C. jejuni*.

## VII. MATERIALES Y METODOS

### A. Universo

1. Plantas medicinales de uso popular en Guatemala para tratar afecciones gastrointestinales.

### B. Muestra

1. Extractos etanólicos de cinco plantas utilizadas para el tratamiento de afecciones gastrointestinales en Guatemala: *Bacharis trinervis*(hoja), *Justicia pectoralis*(tallo), *Wigandia urens*(flor), *Licania platypus*(fruto) y *Satureja brownei*(hoja).
2. Cepa ATCC 33291 de *C. jejuni*.
3. Tres aislamientos clínicos de *C. jejuni*.

### C. Recursos

#### 1. Humanos

Tesista: Carla Fabiola Alvarado Sánchez  
Asesora: MA. Ana Margarita Paz Morales

#### 2. Institucionales

Departamento de Citohistología  
Laboratorio de productos farmacéuticos FARMAYA.

### **3. Equipo**

- a. Jarra Gas-Pak
- b. Incubadora a 36 y 42°C.
- c. Microscopio
- d. Autoclave
- e. Refrigerador 4°C
- f. Congelador -80°C.
- g. Campana bacteriológica
- h. Mechero Bunsen
- i. Balanza semi analítica
- j. Centrífuga
- k. Cajas de Petri de 9 cm de diámetro
- l. Percolador
- m. Rotavapor
- n. Desecadora
- ñ. Viales

### **4. Materiales y reactivos**

- a. Medio de cultivo Columbia (Oxoid™) con sangre de carnero (7.5%).
- b. Caldo Trypticase Soya
- c. Reactivo de oxidasa
- d. Colorantes Gram modificado con carbol- fucsina
- e. Membrana de nitrato de celulosa con 45 µm de diámetro
- f. Sobres para crear sistema microaerofílico (Campy-pak BBL™).
- g. Discos estériles para impregnar
- h. Discos de ácido nalidíxico (30 µg)
- i. Discos de eritromicina (30 µg)
- j. Discos de cefalotina (30 µg)



- k. Solución de eritromicina.
- l. Suspensión de MacFarland 0.5
- m. Peróxido de Hidrógeno
- n. Guantes
- ñ. Hipurato
- o. Ninhidrina
- p. Caldo nitrado
- q. Acido sulfanílico
- r.  $\alpha$ -naftilamida
- s. Agua destilada
- t. Solución salina
- u. Materia seca vegetal
- v. Etanol al 80%
- w. Etanol al 50%
- x. Láminas portaobjetos
- y. Láminas cubreobjetos
- z. Pipetas automáticas

## **E. Métodos**

### **1. Resiembras de *Campylobacter jejuni* cepa ATCC 33291 y aislamientos clínicos (29)**

- a. Se utilizó una cepa ATCC 33291 de *Campylobacter jejuni* y aislamientos clínicos.
- b. Se realizó resiembras en medio de cultivo Columbia-agar sangre 7.5% de la cepa ATCC 33291 de *Campylobacter jejuni* y aislamientos clínicos.
- c. Se tomaron los viales que contienen la bacteria, los cuales estaban, almacenados en el congelador de  $-80^{\circ}\text{C}$ , con el asa bien caliente.

- d. Se tomó la muestra de hielo, y se hizo un inóculo inicial, posteriormente se hicieron 4 estriados perpendiculares al inóculo inicial.
- e. Se incubó a 36°C por 48 horas.
- f. Se observaron colonias mucoides, planas y extendidas sobre la superficie del medio (efecto de swarming), o colonias pequeñas, de color blanco grisáceo, en forma de gotas de rocío.
- g. Se comprobó la identidad de las colonias por coloración de Gram, prueba de oxidasa, prueba de catalasa e hidrólisis de hipurato.
- h. Una vez identificadas, se almacenaron las colonias 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* (24).**

- a. Se recolectaron muestras diarreicas en niños menores de cinco años. En la comunidad que habita alrededor del río Las Vacas, Santa Rosita zona 16.
- b. Se tomaron los datos generales del paciente (nombre, edad, lugar de procedencia), datos clínicos y epidemiológicos.
- c. Se identificó la muestra.
- d. Se transportó la muestra tomando una cantidad significativa con un hisopo estéril y colocarlo en medio Cary Blair, sellándolo adecuadamente. .
- e. Se mantuvo hasta su siembra en refrigeración a temperatura entre 4-6°C
- f. Se suspendió aproximadamente 1 gramo de heces en 20 mililitros de solución salina.
- g. Se agitó vigorosamente y se centrifugo.
- h. Se utilizó el medio Columbia enriquecido con 7.5% de sangre de carnero a temperatura ambiente.
- i. En la superficie del medio se colocó una membrana de nitrato de celulosa con filtro de 45µm.
- j. Se agregó de 4 a 5 mililitros del sobrenadante en la membrana.

- k. 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.
- l. Luego de la incubación, se busco en el medio de cultivo colonias no hemolíticas, mucoides, planas y extendidas sobre la superficie del medio (efecto de swarming), blanco-grisáceas.
- m. A las colonias características se les realizaron pruebas de identificación: tinción de Gram, prueba de oxidasa, catalasa, hidrólisis del hipurato, susceptibilidad al ácido nalidíxico, susceptibilidad a la cefalotina (anexo 1).

### **3. Realización de curva de susceptibilidad (41)**

- a. Se prepararon soluciones en diferentes concentraciones de eritromicina: 0.78 mg/ml, 1.56 mg/ml, 3.125mg/ml, 6 mg/ml, 12.5 mg/ml, 25 mg/ml.
- b. Se impregnaron discos estériles con 50 µl de cada concentración.
- c. Se sembraron la cepa ATCC 33291 y los aislamientos clínicos en Agar Columbia-sangre al 7.5%.
- d. Se colocaron los discos impregnados sobre la resiembra.
- e. Se Incubó por 48 horas en ambiente microaerofílico.
- f. Se interpretaron los resultados, un halo menor o igual a 13 mm. es considerado resistente, un halo entre 14 y 22 mm. es considerado intermedio, finalmente un halo mayor o igual a 23 mm. es considerado susceptible.
- g. Se realizó una gráfica en la cual se indico la susceptibilidad obtenida ante las distintas concentraciones de eritromicina (anexo 2).

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

##### **a. Selección de las plantas**

- i. Plantas populares que son utilizadas para tratar afecciones gastrointestinales.
- ii. Extractos disponibles en el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología, estos fueron obtenidos por el método de percolación (anexo 3)

#### **5. Ensayo de actividad contra *Campylobacter jejuni*, por extractos de plantas (1,21,44)**

Se realizó el ensayo de actividad antibacteriana *in vitro* por el método de difusión en agar. Este consistió 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)**

Se pesó 1 mg de los extractos a evaluar y se disolvieron en 1 ml de etanol al 50%, colocándolo en viales debidamente limpios, luego de ello se sonicaron durante 1 hora, ya que no se disolvieron completamente.

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

En la campana de flujo laminar, durante 5 días consecutivos se impregnaron 5 discos de cada extracto con 10 $\mu$ l de los mismos, hasta alcanzar una concentración final de 50 $\mu$ l del extracto.

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

- i. Se tomaron de 3 a 5 colonias de *Campylobacter jejuni* en un tubo con 1 ml de caldo tripticasa soya

- ii. Se incubaron a 36°C por 30 minutos, verificando que la turbidez era aproximadamente igual al estándar de McFarland 0.5. Si no se ha alcanzado la turbidez, dejar incubar más tiempo.
- iii. Luego de alcanzar la turbidez deseada; se inoculó con un hisopo estéril en cuatro direcciones sobre la caja de agar sangre.
- iv. Se dejó reposar 5 minutos.
- v. Antes de transcurridos 15 minutos, se colocó un máximo de 6 discos con los extractos por caja, incluyéndose en cada caja un disco de ácido nalidíxico, cefalotina o eritromicina de 30 µg como control positivo y/o un disco impregnado únicamente con etanol, como control negativo.

#### **d. Interpretación de resultados**

- i. Se consideraron activos aquellos extractos que provocaron un halo de inhibición de crecimiento mayor o igual a 20 mm.
- ii. Se consideraron inactivos aquellos extractos que no provocaron halo de inhibición o que presentaron un halo menor que 20 mm.
- iii. El control negativo no presentó halo de inhibición.
- iv. Los controles positivos se evaluaron de la siguiente manera: *C. jejuni* sensible al ácido nalidíxico (halo de inhibición mayor o igual a 32 mm.) y resistente a la cefalotina (halo de inhibición menor o igual a 8 mm.).

### **6. Diseño estadístico (45)**

#### **a. Tipo de estudio**

Estudio experimental, diseño completamente aleatorizado. De los extractos que resulten positivos (aparición de halo de inhibición) se determinará la CIM. Se utilizarán los extractos de 5 plantas utilizadas popularmente para el tratamiento de afecciones gastrointestinales, las cuales son: *Bacharis trinervis*, *Justicia pectoralis*, *Wigandia urens*, *Licania platypus* y *Satureja brownei*. El número mínimo de repeticiones para cada ensayo con los extractos es 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 cinco 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  $H_0: p = 0.5$  (No tiene efecto) y  $H_a: p \neq 0.5$  (Si tienen efecto). 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, a 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 será similar al primero pero con diluciones seriadas a partir de 1 mg/dl.

## VIII. RESULTADOS

El presente estudio evaluó la actividad contra tres aislamientos clínicos y la cepa ATCC 33291 de *Campylobacter jejuni*, de extractos etanólicos de cinco plantas utilizadas popularmente para el tratamiento de afecciones gastrointestinales, siendo estos *Bacharis trinervis*, *Justicia pectoralis*, *Wigandia urens*, *Licania platypus* y *Satureja brownei*.

El criterio de selección de las plantas, fue el de ser plantas populares que son utilizadas para tratar afecciones gastrointestinales en Guatemala y utilizar extractos disponibles en el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología. Los extractos vegetales fueron obtenidos por el método de extracción continua con etanol por percolación y concentrados en rotavapor (anexo 3).

La actividad anti-*C. jejuni* de los cinco extractos fue realizada con la cepa ATCC 33291 y en tres aislamiento clínicos, por el método de difusión en agar el cual fue validado con anterioridad (ver metodología).

Se realizaron cinco repeticiones por ensayo de cada uno de los extractos, con la cepa ATCC y los tres aislamientos clínicos. No se encontró actividad contra *C. jejuni* en ningún extracto ( $p > 0.05$ ) (Tabla 1). El control de calidad utilizado fue aceptado ya que *C. jejuni* demostró sensibilidad a los discos de ácido nalidíxico, resistencia a los de cefalotina y ningún tipo de actividad a los discos impregnados únicamente con etanol al 50%. El crecimiento de las cajas fue homogéneo y no se encontró contaminación en ninguna de las cajas del estudio, con lo cual se asegura que la metodología utilizada fue adecuada.

Tabla 1. Evaluación de actividad contra *C. jejuni* de extractos vegetales

Extracto de Planta Utilizada	Parte de planta utilizada	Aislamiento			Cepa ATCC
		No. 1*	No. 2**	No. 3***	33291
<i>Justicia pectoralis</i>	Hoja	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo
<i>Wigandia urens</i>	Flor	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo
<i>Bacharis trinervis</i>	Hoja	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo
<i>Satureja brownei</i>	Hoja	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo
<i>Licania platypus</i>	Semilla	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo

Fuente: Datos experimentales

\* Aislamiento clínico obtenido en San José Pinula, Guatemala

\*\* Aislamiento clínico obtenido en Puerto Barrios, Izabal

\*\*\* Aislamiento clínico obtenido en Santa Rosita zona 16, Guatemala



## IX. DISCUSION DE RESULTADOS

*Campylobacter jejuni*, es un agente etiológico de diarrea que afecta principalmente a niños menores de 5 años, la resistencia a los antibióticos de este microorganismo ha ocasionado la búsqueda de alternativas terapéuticas, entre ellas la medicina natural (1,7).

El presente estudio evaluó la actividad de cinco extractos de plantas utilizados popularmente para el tratamiento de afecciones gastrointestinales contra *C. jejuni*, de los cuales ninguno demostró actividad contra la cepa ATCC 33291 y 3 aislamientos clínicos de *C. jejuni*, al evaluarse por medio de la prueba de hipótesis binomial ( $p > 0.05$ ). Los resultados obtenidos conllevan a una evaluación de criterios de la investigación como lo son: la metodología, la selección de las plantas y la viabilidad de los extractos utilizados.

La validación del método mediante una curva de sensibilidad y el control de calidad respaldan la metodología empleada, sin embargo se sugiere ampliar este tipo de investigaciones utilizando como mínimo dos metodologías, de esta manera descartar completamente la actividad anti *C. jejuni*, dentro de las cuales podemos mencionar el método de MITSCHER y el de Concentración mínima inhibitoria en tubo adaptados a los requerimientos de este tipo bacteriano, esto último por la característica de ser un microorganismo fastidioso.

El criterio de selección de las plantas fue muy amplio y poco específico para la bacteria evaluada, ya que incluyó a plantas que se utilizan para tratar cualquier tipo de infección gastrointestinal, además de ser utilizadas por la población en general, cuando realmente *C. jejuni* afecta mayoritariamente a niños menores de 5 años, además de no tomar en cuenta la presentación clínica del paciente. Es importante además realizar el estudio con distintas

partes de la planta utilizada popularmente ya que diferentes sustancias pueden estar en diferentes áreas de las plantas.

La técnica de extracción y almacenamiento de los extractos garantiza que las sustancias de interés se mantengan en óptimas condiciones por lo que no representa un factor que interfiere en los objetivos del estudio.

Estudios recientes en Guatemala como el de Paz en el 2005 y Álvarez en el 2007, utilizaron extractos de plantas en la búsqueda de actividad anti *C. jejuni*, sin embargo, al igual que este estudio no se encontró actividad alguna de los extractos utilizados. En posteriores investigaciones se sugiere ser más específicos en el criterio de selección de las plantas, de esta manera se tendrá mayor probabilidad de encontrar un resultado positivo en este tipo de estudio.

A pesar de no haber encontrado un resultado positivo, se deben de tomar en cuenta las condiciones utilizadas para el aislamiento de *C. jejuni*, y de esta manera facilitar las futuras investigaciones con este microorganismo.

## X. CONCLUSIONES

1. La selección de las plantas para evaluar la actividad anti-*C. jejuni* fue muy general y poco específica para el estudio realizado.
2. La hipótesis planteada es rechazada ya que ninguno de los extractos de plantas utilizadas tiene actividad contra *C. jejuni*.
3. Se debe utilizar por lo menos dos metodologías al evaluar la actividad antimicrobiana de un extracto, adaptándola a los requerimientos especiales de la bacteria.

## XI. RECOMENDACIONES

1. Continuar con la búsqueda de actividad anti *C. jejuni*, con extractos de plantas de uso popular, que sean utilizadas en niños menores de 5 años con diarrea.
2. Utilizar el método de filtración con membrana para el aislamiento de *C. jejuni*.
3. Por la falta de especificidad de las plantas evaluadas no se recomienda su uso para tratar afecciones por *C. jejuni*.

## XII. REFERENCIAS

1. Koneman EW, *et al.* Diagnóstico Microbiológico. 5a. ed. Buenos Aires, Argentina: Panamericana, 1999. 1432 p.
2. Walter TS. Microbiología. Aguilar MT, trad. México: Interamericana Editores, 2000. 532 p. (p. 175-77).
3. Pumarola A, *et al.* Microbiología y Parasitología médica. 2a. ed. España: Masson, 1987. 4669.
4. Murray P. Microbiología médica. España: General, 1987. 725pp.
5. Oberhelman RA, Taylor DN. *Campylobacter* infections in developing countries. In: Nachamkin I, Blaser MJ, editors. *Campylobacter*, 2a. ed. Washington: American Society for Microbiology, 2000.
6. 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. 60 pp.
7. Cáceres A. *et al.* Screening of sixteen plants for treatment of respiratory disease. J. Ethnopharmacol, 1990;1(30):55-67.
8. Cáceres A. *et al.* Rev. Usac Guatemala memorias del XI congreso centroamericano de Microbiología. 1990; (10): 48-60
9. Del Cid AE. 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.
10. Paulo A. *et al.* *Cryptolepis sanguinolenta* activity against diarrhoeal bacteria. J Ethnopharmacol. 1994;44(2):73-77.
11. Wannissorn B. *et al.* Antibacterial properties of essential oils from Tai medicinal plants. Fitoterapia. 2005;76(2)233-236.

12. Vasquez L. Etnobotanica Mam. Guatemala Ed. Maya. 1998. (77-303).
13. Estudios fenológicos en plantas medicinales. Rev cubana plant med 1998;3(1):12-17
14. Jane R. *et al.* Composition and antimicrobial activity of the essential oil from aerial parts of *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers. Brazil 2004. p 1-6.
15. Cruz JR. *et al.* Infection, diarrhea and dysentery caused by *Shigella* species and *Campylobacter jejuni* among Guatemala rural children. *Pediatr Infct Dis* 1994;13:216-23.
16. Wren BW. *et al.* Post genome Analysis of *Campylobacter jejuni*. *J Appl Microbiol* 2001;90(Suppl):36S-44S
17. Cruz JR. *et al.* Etiología de diarrea aguda en infantes de áreas marginales de Guatemala. *Memorias del III Congreso Nacional de Microbiología*. Guatemala 1986.
18. Balocos A, William J, Hausler J. *Bacterial, Mycotic and Parasitic Infectios*. 6a. ed. Washington D.C.: American Public Health Association, 1991 (301-309).
19. Cavaría F. Cultivo de Bacterias Microaerofílicas: *Campylobacter*. Facultad de Microbiología y Centro de Investigaciones en Estructuras Microscópicas. Universidad de Costa Rica 116 *Rev. Col. de MQC de Costa Rica* (2002) vol. 8, número 5.
20. Fernández H. *et al.* Manual de Procedimientos. Diagnóstico de *Campylobacter* en muestras clínicas y de alimentos. Instituto Nacional de Enfermdades Infecciosas. 2003. Argentina. 22 pp.
21. Konkel ME. *et al.* Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* virulence determinants. In *Campylobacter*. Nachamkin I, Blaser MJ. *Campylobacter*, 2.ed. Washington: American Society for Microbiology, 2000.
22. 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.
23. Molina J. *et al.* *Campylobacter* infections in HIV-infected patients; clinical and bacteriological features. *AIDS* 1995;9(8): 5-881.
  24. Torres M. Manual Práctico de bacteriología médica. Guatemala: Serviprensa C.A., 1999. 223pp
  25. Jawetz M. *et al.* Microbiología Médica. 15a. Ed. México. Moderna. 1997. 807 p (p277-279),
  26. Zanucini RM. *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni* probable nuevo agente de gastroenteritis en Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1981. 77 pp.
  27. 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.
  28. Bridson EY. The Oxoid Manual. 6a. ed. 1990 Alpha Print Alton, ants 2.65-2.73
  29. 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.
  30. 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.
  31. Aarestrup FM. *et al.* Antimicrobial susceptibility patterns of thermophilic *Campylobacter spp.* From humans, pigs, cattle and roilers in Denmark. *Antimicrobi Agents Chemother* 1997 41:2244-2250.

32. Smith K. *et al.* Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992-1998. *Journal Medical, New England*. 1999. 340:20.
33. 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.
34. Domingo D&M López-Brea. Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quimioterap*. 2003; 16(4):385-393.
35. García BL. *et al.* Plantas con propiedades antiinflamatorias. *Rev. Cubana Invest comed*. 2002;21 (3):214-216.
36. Dixon RA. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 2001; 414:843-47.
37. Mitscher LA, Darker S & Gollapudi A. A modern look at folkloric use of anti infective agents. *Journal Nature. Prod*. 1987; 5: 1025-1041.
38. Tegos G. *et al.* Multidrug puma inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemoter* 2002; 46:3133-3141.
39. Álvarez CS. 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. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2007. 60pp.
40. Alonso J. Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos. 2004. Ed. Hábeas. Argentina. 1360pp.
41. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. M100-S16. 2006; (26: 178pp.).
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. Cáceres A. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria, USAC, 1999. 402pp.
45. Wayne WD. Bioestadística; Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ª. Ed. México: Editorial Limusa. 2002. 755 pp.

### **XIII. ANEXOS**

**ANEXO 1:** Características Bioquímicas de Especies de *Campylobacter*

**ANEXO 2:** Validación de la metodología

**ANEXO 3:** Procedimiento de extracción de principio activo de planta

**ANEXO 4:** Fotografías

**ANEXO 1**  
**Características Bioquímicas de Especies de *Campylobacter***

**TABLA 1.**

	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>
<b>Hidrólisis del</b>			
<b>hipurato</b>	+	-	-
<b>Oxidasa</b>	+	+	+
<b>Producción</b>			
<b>de catalasa</b>	+	+	+
<b>Reducción</b>			
<b>de nitratos</b>	+	+	+
<b>Producción</b>			
<b>de H<sub>2</sub>S</b>	-	-	-
<b>R. Ac.</b>			
<b>Nalidíxico</b>	S	S	R
<b>R. cefalotina</b>	R	R	R

S: sensible R: resistente

Fuente: Koneman EW, et al.1999

## ANEXO 2

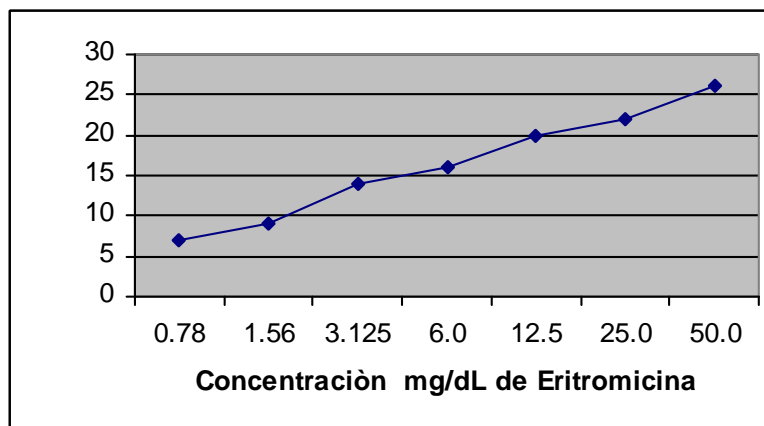
### Validación de la metodología

Tabla 2. Medición halo de inhibición a diferentes Concentraciones de Eritromicina

Concentración mg/ml	Halo/ mm
Eritromicina	
0.78	7
1.56	9
3.125	14
6.0	16
12.5	20
25.0	22
50.0	26

Fuente: Datos experimentales

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



Fuente: Tabla 1

## ANEXO 3

### Procedimiento de extracción del principio activo de planta

#### A. Procedimiento de Extracción continua por percolación

- a. Tamizar las hojas con el cedazo, a fin de reducir el material
- b. Si se va a tamizar raíz o corteza se debe hacer retazos pequeños, para obtener una mejor extracción.
- c. Colocar algodón en la parte inferior del percolador para que sirva de filtro, además, colocar bajo el algodón un papel filtro.
- d. Pesarse la cantidad de materia vegetal que se desee usar.
- e. Rotular el percolador con el nombre científico y común de la planta, parte de la planta, disolvente, fecha y peso.
- f. Humedecer la materia vegetal en un beaker con el disolvente que se va a utilizar.
- g. Agregar la materia vegetal preparada al percolador y añadir etanol al 95%, de modo que cubra toda la materia vegetal. Verificar que no haya burbujas, si se encuentran, deshacerlas.
- h. Dejar reposar la materia vegetal, para que esta se disuelva en el tiempo necesario según la parte de la planta seleccionada (18-48 horas).
- i. Dejar que gotee el líquido lentamente, abriendo la llave de la parte inferior del percolador.
- j. Agregar suficiente disolvente extra, según se requiera, hasta obtener el volumen de disolvente agregado al inicio.
- k. Recolectar el líquido en un erlenmeyer.
- l. Hacer presión al material sólido que haya quedado, agregar el líquido obtenido al percolador.

## **B. Procedimiento de Concentración en Rotavapor**

- a. Verificar el nivel del agua del baño de María y llevarlo a 40°C.
- b. Fijar con la llave respectiva el balón colector.
- c. Engrasar las bocas esmeriladas.
- d. Armar el rotavapor, de acuerdo al instructivo específico.
- e. Observar que la llave de alimentación del refrigerante esté cerrada
- f. Succionar la solución obtenida del percolador: alcohol más planta.
- g. Encender la bomba de vacío y el rotador, las veces que sea necesario, hasta que el disolvente del balón de evaporación, se haya terminado o ya no destile ningún líquido.
- h. Iniciar la destilación del extracto con la recuperación del disolvente, hasta que este semisólido.
- i. Verter el extracto concentrado en cristalizador de vidrio, debidamente tarada y rotulada.
- j. Colocarlo en una desecadora durante 7-15 días.
- k. Cuando el extracto tenga consistencia sólida, pasar a viales tarados y rotulados.
- l. Calcular el rendimiento del extracto y guardar en viales o recipientes herméticos a 4°C.

## ANEXO 4

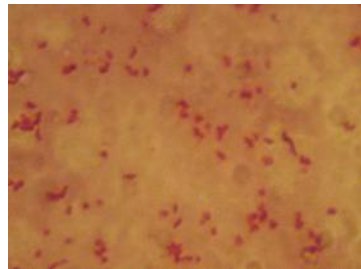
### Fotografías tomadas durante el procedimiento del bioensayo.

#### A. Cultivo de *C. jejuni*

a.



b.



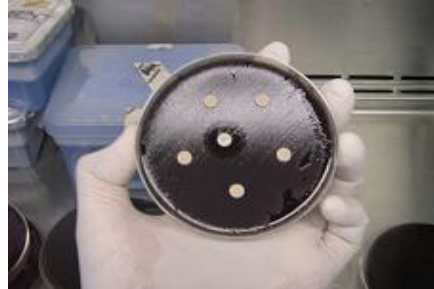
- a. Cultivo sugestivo de *C. jejuni*, obtenido de resiembra de ATCC 33291, muestra las colonias mucoides características de la bacteria
- b. Gram de colonias sugestivas de *C. jejuni*. Observar formas en alas de gaviota

#### B. Impregnación de discos con extractos de plantas



Discos impregnados, obsérvese en el fondo diluciones de extractos

### C. Realización del bioensayo



Método Bauer Kirby, utilizado para el bioensayo, no se observa ningún halo de inhibición, de los discos con extracto, únicamente el control positivo al centro de la placa.