

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

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a man in a crown and robes, possibly a saint or a historical figure, holding a staff. Surrounding this central figure are various symbols: a castle, a lion, and a cross. The seal is surrounded by Latin text: "CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA" at the top and "SACRIS LITTERIS OBSTANTIBUS INTER" at the bottom.

**ACTIVIDAD INHIBITORIA DE EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES
DE ESPECIES CONDIMENTARIAS, ALIMENTICIAS
Y MEDICINALES CONTRA *Campylobacter jejuni***

Vilma Gricelda Samol Juárez
Berta Corina Santizo Paz

QUÍMICAS BIÓLOGAS

Guatemala, Mayo de 2011

ÍNDICE

	Página
I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN	1
II. RESUMEN	3
III. ANTECEDENTES	5
A. Descripción general	5
B. <i>Campylobacter jejuni</i>	5
1. Productos celulares	6
2. Ecología	6
3. Epidemiología	8
4. Transmisión	10
5. Patogenia	10
6. Características clínicas de la infección	12
7. Diagnóstico de laboratorio	14
8. Aislamiento	15
9. Tratamiento	17
C. Plantas medicinales	19
1. Sustancias químicas con acción antimicrobiana aisladas de plantas	19
2. Determinación de la actividad antimicrobiana en plantas	21
D. Actividad inhibitoria de extractos de plantas contra <i>C. jejuni</i>	22

E. Especies vegetales a evaluar	23
1. <i>Eryngium foetidum</i> L.	23
2. <i>Cornutia grandifolia</i> Schelecht & Cham	24
3. <i>Fernaldia pandurata</i> Woodson	25
4. <i>Lippia alba</i> N.E. Browne e Brit & Wils	26
5. <i>Lippia chiapasensis</i> Loes	27
6. <i>Lippia graveolens</i> HBK	27
7. <i>Ocimum micranthum</i> Willd	28
8. <i>Pimenta dioica</i> (L.) Merrill (A)	29
9. <i>Piper auritum</i> HBK	30
10. <i>Piper jacquemontianum</i> Kunth	31
11. <i>Psidium guajava</i> L.	32
12. <i>Tagetes lucida</i> Cav	33
IV. JUSTIFICACIÓN	34
V. OBJETIVOS	35
VI. HIPÓTESIS	36
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	37
VIII. RESULTADOS	46
IX. DISCUSIÓN	52
X. CONCLUSIONES	56
XI. RECOMENDACIONES	57
XII. REFERENCIAS	58
XIII. ANEXOS	65

I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

A pesar del perfeccionamiento en las técnicas de producción de alimentos, la seguridad de éstos es aún un aspecto importante en salud pública. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 30% de la población en países industrializados ha sufrido de enfermedades transmitidas a través de los alimentos, y en el año 2000 al menos 2.1 millones de personas murieron de enfermedades diarreicas a nivel mundial, de las cuales una gran proporción puede ser atribuida al consumo de agua y alimentos contaminados (1).

Los microorganismos y sus productos metabólicos (producción de ácido butírico, láctico, sulfhídrico; producción de dióxido de carbono e hidrógeno) son las principales causas de alteración de los alimentos, estos incluyen a: *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus*, entre otros, son reconocidos como la principal causa de alteración y de vital importancia para la salud pública. Este grupo de bacterias, por su ubicuidad e incidencia, se ha constituido en el blanco de acción de muchos de los sistemas de aseguramiento de la calidad en industrias alimenticias (2).

El uso de agentes químicos es uno de los métodos de conservación más antiguos y tradicionales que existen; sin embargo no cumplen con el concepto de natural o seguro que los consumidores demandan, ya que algunos de estos son sospechosos de poseer cierto grado de toxicidad. Es así como los productores de alimentos han sido forzados a tratar de remover completamente el uso de antimicrobianos químicos o adoptar alternativas naturales para el mantenimiento o extensión de la vida útil de sus productos (3).

A través de la historia, las hierbas y especias se han utilizado para saborizar los alimentos y bebidas y también para fines médicos. Las mismas contienen un gran número de sustancias con propiedades que inhiben la actividad metabólica de bacterias, levaduras y mohos. Los compuestos antimicrobianos de las plantas se encuentran generalmente en el aceite esencial obtenido a partir de hojas, flores, bulbos, rizomas y

frutos. Estos compuestos pueden ser letales para las células o simplemente servir como inhibidores de la producción de metabolitos (3-5).

Se han realizado numerosas investigaciones acerca del poder antimicrobiano de especias y sus aceites esenciales (por ejemplo: clavo, ajo, cebolla, salvia, romero, cilantro, perejil, orégano, mostaza y vainilla). Asimismo, la Administración de Alimentos y Drogas (FDA, por sus siglas en inglés) considera a los agentes antimicrobianos de origen natural como sustancias de tipo Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS, por su abreviatura en inglés) (6).

Es por ello que el presente trabajo de investigación pretendió dar a conocer que el uso de especias, extractos y aceites esenciales; pueden constituir una alternativa natural en la conservación de alimentos y en el control efectivo de microorganismos causantes de patología humana; y que se encuentran presentes en estos; especialmente en la carne de aves. Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

II. RESUMEN

Las hierbas y especies han sido agregadas a los alimentos desde tiempos ancestrales, no solamente como agentes saborizantes, debido a sus características aromáticas, sino que también en medicina tradicional y como preservantes. El incremento en la resistencia a los antibióticos de algunos patógenos asociados con enfermedades transmitidas por alimentos ha sido una preocupación. Por lo tanto se ha incrementado la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos antimicrobianos de origen natural, efectivos y no tóxicos. Por consiguiente, la presente investigación evaluó el efecto inhibitorio *in vitro* de doce especies condimentarias, alimenticias y medicinales de uso popular en Guatemala, contra dos variedades del género *Campylobacter*, y comprobar su acción bactericida para ser planteadas como una alternativa natural para un control efectivo de este enteropatógeno.

De las doce especies seleccionadas, se obtuvo por medio del proceso de percolación y concentración un total de doce extractos diclorometánicos y metanólicos, y por medio de hidrodestilación un total de nueve aceites esenciales. Las especies de mayor rendimiento fueron *Piper auritum* (diclorometánico), *Lippia chiapasensis* (metanólico) y *Lippia graveolens* (aceite esencial).

La actividad anti *Campylobacter* de extractos y aceites esenciales, se evaluó por el método de difusión en disco en agar Mueller-Hinton enriquecido con sangre de carnero al 7%, en condiciones de microaerofilia (CampyGen™ Oxoid). Para ello se utilizaron las cepas ATCC® 33291 de *Campylobacter jejuni* y dos aislamientos clínicos de *C. jejuni* UVG 62-1773-9 y *Campylobacter coli* UVG 62-1769-9. Se realizó un total de cinco repeticiones para un nivel $\alpha=0.05$. Así mismo, se validó el método empleado mediante una curva de actividad dosis/efecto, enfrentando el microorganismo a diferentes concentraciones de eritromicina, el antibiótico de elección.

Se encontró actividad inhibitoria significativa ($p=0.0312$) de extractos diclorometánicos en *Lippia graveolens* a una concentración de 200 μ g/mL, y *Tagetes lucida* a 100 μ g/mL. Mientras que la actividad de extractos metanólicos fue evidente en

Lippia alba, *Lippia graveolens*, *Piper jacquemontianum* y *Tagetes lucida*, a una concentración de 200µg/mL.

Los aceites esenciales de *Lippia graveolens*, *Ocimum micranthum* y *Pimenta dioica* fueron activos a una dosis <1.25µL, sobresaliendo *L. graveolens* que fue capaz de inhibir a esa dosis a las tres cepas evaluadas. Esto indica que el aceite esencial tiene gran potencial de uso en productos tanto farmacéuticos como alimenticios.

III. ANTECEDENTES

A. Descripción general

El género *Campylobacter* pertenece a la familia *Campylobacteriaceae* y agrupa bacterias que pueden ser patógenas o comensales y que se caracterizan por tener una forma curva, en forma de S o espiral. Son bacilos Gram negativo no formadores de esporas, aunque en cultivos viejos expuestos al aire por mucho tiempo pueden mostrar una morfología cocoide. Las especies de este género poseen un flagelo polar en uno o ambos extremos, que les confiere motilidad. Son termófilas y muestran un crecimiento óptimo a 42°C, aunque pueden crecer a 37°C. Son organismos de crecimiento lento y requieren un ambiente microaerofílico, necesitan una atmósfera que contenga concentraciones de 3 a 15% de oxígeno y de 3 a 5% de dióxido de carbono para vivir, son productores de catalasa pero no fermentan ni oxidan carbohidratos. Generan energía a partir de aminoácidos o intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico por la vía respiratoria. Son sensibles a la desecación, a las condiciones ácidas, a la luz solar directa, y a la mayoría de los desinfectantes (7, 8).

Las especies de *Campylobacter* (*C. coli*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. fetus*, *C. gracilis*, *C. helveticus*, *C. hyointestinalis*, *C. jejuni*, *C. lari*, *C. mucosalis*, *C. rectus*, *C. showae*, *C. sputorum*, *C. upsaliensis*) han sido asociadas con múltiples enfermedades en animales y humanos. Las dos bacterias de mayor importancia clínica como agentes causales de campilobacteriosis humana son *C. jejuni* y *C. coli* (7).

B. *Campylobacter jejuni*

C. jejuni es un bacilo Gram negativo, curvo, en espiral, en forma de "S" o ala de gaviota, mide de 0.2 a 0.5 µm de ancho y 1.5 a 5 µm de largo. Presenta un solo flagelo polar que le proporciona un movimiento rápido y helicoidal, que lanza a la bacteria a manera de dardo (8).

1. Productos celulares

a) *C. jejuni* segrega una toxina cuya actividad y estructura es semejante a la toxina colérica y la toxina termolábil de *Escherichia coli*. Las subunidades de ambas toxinas están relacionadas inmunológicamente y se fijan al mismo gangliósido de la superficie de la célula blanco. *C. jejuni* también produce una citotoxina de naturaleza proteica, que es distinta de la toxina shiga de *E. coli* y a la citotoxina de *Clostridium difficile*.

b) Produce una adhesina resistente a la manosa que se fija a un receptor que contiene fucosa existente en la superficie de la célula blanco.

c) Sobrevive en el interior de los fagocitos mononucleares, lo cual implica la existencia de otras importantes estructuras de superficie hasta ahora no identificadas (9).

2. Ecología

a) Reservorio

Los animales y los subproductos animales son las principales fuentes de microorganismos tanto para las personas como para las especies animales sensibles. *C. jejuni* se ha encontrado en la leche, en los criaderos de aves, y en las heces de perros y gatos (9).

b) Colonización

Bajo condiciones naturales, *Campylobacter* crece solo cuando ha encontrado un adecuado ambiente en el hospedero. El prerrequisito para el crecimiento es localizar un hábitat adecuado dentro del hospedero para tomar posesión, mantenerse en su lugar, enfrentar la competencia o las defensas del hospedero, adquirir nutrientes, y evitar o responder a cambios hostiles en las condiciones del hábitat. Todos estos eventos son mediados por factores bacterianos. Algunos de estos pueden inducir efectos con consecuencias patológicas para el hospedero (10).

Inicialmente, los microorganismos se encuentran en los intestinos aviares, pero en un período corto, la colonización está confinada al ciego y a la última porción del intestino delgado. En 5 días, el nivel de colonización en pollos llega a un pico, que es extremadamente alto: hasta 10 UFC/g de contenido cecal. Una vez la colonización está

establecida se vuelve crónica, aunque los niveles pueden disminuir después de 9 semanas o más. La colonización intermitente del íleo, yeyuno y duodeno puede ocurrir, y ocasionalmente los microorganismos pueden ser recuperados del bazo y del hígado. Indicando la posibilidad de una infección extra intestinal. El sitio de crecimiento bacteriano es el moco de las células epiteliales del intestino y la bacteria mantiene su posición en el flujo del moco por medio de su rápida y característica motilidad, mediada por sus dos flagelos bipolares (11).

Algunos nutrientes esenciales para el crecimiento de *Campylobacter* pueden estar pobremente disponibles o no disponibles para la bacteria dentro del lumen intestinal. Sin embargo, estos nutrientes como el hierro pueden estar disponibles en los tejidos del hospedero. La bacteria puede desarrollar estrategias, como la producción de toxinas o invasión para acceder a dichos nutrientes dañando la integridad de la mucosa intestinal del hospedero. Dichas estrategias inevitablemente tienen consecuencias patógenas para el hospedero. Durante la campilobacteriosis, la enfermedad entérica sugiere que la expresión bacteriana de la toxina y/o la invasión de las células epiteliales son consecuencias potenciales de la colonización (9).

c) Toxinas

Toda la evidencia clínica sugiere que *C. jejuni* expresa un factor toxigénico durante la enfermedad, el cual se asocia a la colonización del hospedero. La toxina citoletal distendida (TCD) producida por *C. jejuni*, afecta la morfología celular epitelial, causando la distensión y la muerte eventual de la célula en modelos *in vitro*. La expresión de la TCD varía entre cepas, esta parece ser independiente de su origen y algunos aislamientos son negativos a TCD. Las cepas TCD negativas pueden ser aisladas de heces diarreicas y de muestras sanguíneas, sugiriendo que la TCD no es esencial para la presentación de síntomas clínicos de la enteritis o la bacteremia (12).

d) Ecología fuera del medio ambiente del hospedero

Para *C. jejuni*, el crecimiento dentro de un hospedero es solamente temporal. Una vez este microorganismo es excretado del intestino del hospedero o derramado durante el procesamiento de alimentos, ellos encuentran muchos factores hostiles del medio ambiente. Dichos factores incluyen extremos de temperatura, osmolaridad,

concentraciones atmosféricas de oxígeno, y falta de alimento. La supervivencia a dichos factores es un pre-requisito para llegar a otro hospedero y continuar su crecimiento. Las condiciones hostiles del medio ambiente resultan en un número de respuestas fisiológicas, morfológicas y bioquímicas. Todos estos eventos deben verse como reversibles hasta cierto punto, pero si los factores continúan afectando o se adicionan otros, esto llevará finalmente a la muerte de la bacteria. La respuesta más obvia al estrés es un cambio de la forma espiral, a una forma de coco. El desarrollo de la morfología de coco es concomitante con una pérdida en la habilidad para poder cultivarlo, pero estas dos propiedades son independientes (10,13).

Durante el procesamiento de la carne, *C. jejuni* es expuesto a muchos factores ambientales de estrés. Algunas cepas parecen sobrevivir este estrés mejor que otras. Dándole seguimiento al procesamiento de este tipo de cepas que están presentes en las aves vivas, lo hace claro que algunas cepas no sobreviven bien el procesamiento mientras otros son excelentes sobrevivientes (14).

3. Epidemiología

La campilobacteriosis es una zoonosis de distribución mundial que afecta mayoritariamente los países en vías de desarrollo. *C. jejuni* se halla habitualmente como comensal del tracto gastrointestinal en toda variedad de aves de corral, vacas, ovejas, cerdos, cabras, perros, gatos y roedores silvestres. Esta bacteria constituye la principal causa de gastroenteritis en el hombre, por delante incluso de los géneros *Salmonella* y *Shigella*. En países desarrollados la diarrea es más frecuente en los meses de verano, siendo afectados todos los grupos étnicos de ambos sexos. Frecuentemente se asocia a brotes epidémicos relacionados por 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 y es más frecuente en niños de corta edad (15, 16).

En Guatemala, según datos de la 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 (11,17, 18).

Las principales vías de infección son la ingestión de alimentos contaminados (carne mal cocidas de aves de corral, cerdo, ganado bovino, leche no pasteurizada, agua y otros alimentos). La bacteria puede excretarse en las heces de 2 a 5 semanas después de haberse suspendido la diarrea. 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 (19).

Estudios realizados en diferentes países en vías de desarrollo establecen que *Campylobacter* es el segundo o tercer agente de diarrea, según sea el lugar geográfico. Existen reportes de países en vías de desarrollo de un rango de 0-32% de los casos de diarrea en niños menores de 5 años que son atendidos en establecimientos de salud debido a diarrea por este microorganismo. Las especies que producen diarrea 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 (15, 19).

Se ha obtenido *C. jejuni* en un 50% de muestras procedentes del ciego de gallinas y al ser sacrificadas las aves, los microorganismos contaminan el ambiente y en consecuencia casi todas las que ya han sido sacrificadas también estarán contaminadas (9).

De 2 a 100% del ganado bovino pueden ser portadores sanos de *C. jejuni*, circunstancia que tal vez explique los brotes de enfermedad diarreica producida como consecuencia del consumo de leche sin pasteurizar (9).

Estas bacterias no soportan durante mucho tiempo situaciones de desecación o congelamiento, características que limitan su transmisión. Sobreviven en la leche, en otros alimentos o en agua a 4°C durante una semana; aunque la desinfección con cloro y la pasteurización las destruye. 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 (8,19).

4. Transmisión

El 90% de los casos de campilobacteriosis es causado por alimentos (carne de ave mal cocinada, contaminación cruzada durante la preparación de alimentos, contacto con animales contaminados). Un número muy pequeño de microorganismos (menos de 500) puede ocasionar la enfermedad en los seres humanos, incluso una gota de jugo de carne de pollo crudo puede infectar a una persona. Otros alimentos implicados son las carnes rojas, moluscos y quesos no pasteurizados y aguas no cloradas. El microorganismo se elimina por el tratamiento térmico (cocción), no sobrevive en las cocinas domésticas ni los tratamientos culinarios tradicionales (10, 20).

La principal vía de transmisión es feco-oral, siendo el alimento un vehículo y fuente de multiplicación bacteriana. Los insectos juegan un rol fundamental como vehículo de transmisión, siendo un ejemplo la mosca doméstica. Existen dos vías de transmisión vertical (de madre a hijo) y horizontal (de un animal a otro) siendo esta última la más común (20).

5. Patogenia

La patogenia de *C. jejuni* depende tanto de factores específicos del patógeno como del hospedero. La salud, edad del hospedero y la inmunidad humoral específica por exposiciones previas al agente, influyen clínicamente en el resultado después de la infección (11).

El microorganismo se adquiere por vía oral o por contacto con animales infectados. *C. jejuni* es sensible al pH gástrico, por lo que es necesario un inóculo de 10^4 para que produzca infección. Sin embargo en casos de alta infectividad la infección ocurre con dosis del orden de 500 microorganismos. El período de incubación es de 1 a 7 días, afectando intestino delgado y grueso (16).

De diferentes estudios epidemiológicos realizados en países subdesarrollados y desarrollados se desprende la evidencia que existan cepas con distinto grado de patogenicidad y distintas respuestas del hospedero 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 (16).

C. jejuni se adhiere a las células del intestino delgado, principalmente a la de los segmentos distales, se multiplica e invade las células del epitelio. Elabora una toxina semejante a la toxina LT que altera el sistema adenilciclasa y al mismo tiempo destruye el epitelio mucoso. Se producen heces diarreicas que contienen restos de células y moco, y en los frotis directos se observan productos de la respuesta inflamatoria. Dicha respuesta no controla la infección porque los microorganismos sobreviven en el interior de las células fagocíticas mononucleares, aunque al pasar por los vasos linfáticos y a la circulación sistémica son destruidos por el efecto bactericida del suero (9).

a) Serotipos

Se han identificado más de 60 serotipos, los cuales son catalogados según la clasificación de Penner, basada en la expresión de lipopolisacáridos (LPS). Este es un método de hemaglutinación pasiva que utiliza antígenos termoestables del lipopolisacárido de la membrana externa de las cepas de *C. jejuni*, los cuales son adsorbidos a glóbulos rojos de cordero o humano para hacer visible la reacción. Estos son enfrentados a antisueros tipificadores conteniendo los distintos anticuerpos para cada serotipo en estudio (21).

En Chile, un estudio determinó que los serotipos de mayor prevalencia en muestras de deposiciones de origen humano fueron: Z_2 (16%) y Z_5 (12%). De las muestras de origen aviar, los serotipos prevalentes fueron: A (28%) C, L e Y con un 10% cada uno. Los serotipos A, B, F, L, N e Y fueron aislados en ambos tipos de muestras. Al no coexistir los serotipos Z y C, en ambos grupos, se concluyó que no solamente la carne de ave puede ser vehículo de *C. jejuni*, sino que existen también otras fuentes y reservorios para la campilobacteriosis humana, como ha sido demostrado en otras partes del mundo y cuya importancia epidemiológica debe ser investigada en el futuro (22).

En Dinamarca se demostró la presencia de serotipos O:1, O:44, y O:2 en el 62% de los aislamientos evaluados, dichos serotipos también fueron comunes en muestras de pollos y ganado vacuno. Lo que sugiere que estos últimos también pueden ser fuentes de campilobacteriosis humana (23).

En Polonia, se analizó la presencia de los genes *cadF*, *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*, implicados en los procesos de invasión y colonización; así como la secuencia *iam* en cepas de *C. jejuni* y *C. coli*. Se encontró que el gen *cadF* estuvo presente en el 100% de las cepas evaluadas sin tomar en cuenta su origen. La presencia de los genes *cdt* varió entre los aislamientos, los tres se encontraron en casi todos los aislamientos de *C. jejuni*, pero sólo el 5.6% en aislamientos de *C. coli* de origen humano y 87.2% en carcasas de pollo. La región *aim* se encontró en un 83.3% en niños y 100% en carcasas de pollo correspondiente a *C. coli*; y 1.6% y 54.7% en aislamientos de *C. jejuni*. Las diferencias encontradas en la distribución de estos marcadores genéticos en ambos tipos de aislamiento, junto con el bajo consumo de carne de aves en niños polacos, sugieren que las infecciones causadas por *Campylobacter* pueden ser por fuentes adicionales a la carne contaminada de pollo (24).

Un estudio realizado en Guatemala con la colaboración del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) reporta los serotipos HS:3 y 15 en niños; y HS:1, 2, 6, 7, 8, 21, 25 y 29 en adultos. Lo que indica que existen diferentes serotipos entre cepas de adultos y niños (25).

6. Características clínicas de la infección por *Campylobacter jejuni*

Típicamente, la infección por *C. jejuni* resulta en una enfermedad gastrointestinal aguda, caracterizada por diarrea, vómitos, fiebre y dolor abdominal, parecido a los síntomas de apendicitis aguda. Clínicamente la infección no se distingue de otras afecciones causadas por patógenos bacterianos, tales como *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*. En la mayoría de pacientes las deposiciones son acuosas y/o con sangre; ocurriendo de 8-10 por día en el pico de la enfermedad (14, 26).

Campylobacter es una bacteria enteroinvasiva que puede conducir a colitis y en algunos casos parecerse a enfermedad inflamatoria intestinal. El período de incubación comúnmente es de 2 a 5 días después de ingerir alimentos contaminados, pero se estima que puede extenderse por más de 10 días. En el 50% de los pacientes, la diarrea es precedida por un período febril, malestar, mialgia y dolor abdominal, puede aparecer sangre en las deposiciones en el tercer día de la infección. La diarrea continúa por 2 ó 3 días más, pero el dolor abdominal y el malestar pueden persistir después de que la diarrea se ha detenido. En una proporción significativa, las deposiciones contienen sangre fresca, pus o moco, lo que sugiere una inflamación colorectal que no es común en la infección por *Campylobacter* (27, 28).

En algunos pacientes la diarrea es mínima y el dolor abdominal es la característica más predominante guiando a un diagnóstico equivocado de abdomen agudo. La fiebre es reportada en 90% de pacientes afectados y puede persistir por más de una semana. Usualmente la enfermedad se resuelve en ausencia de tratamiento con antibióticos específicos, sin embargo algunos pacientes pueden recaer en un período que dura varias semanas (12).

El recuento de glóbulos blancos en sangre periférica puede estar ligeramente elevado, la función hepática, los electrolitos y los niveles de hematocrito, son normales. La enteritis puede ocurrir en todos los individuos, pero la presentación clínica varía de acuerdo a la edad. En infantes existe el riesgo de deshidratación o convulsiones (29).

a) Complicaciones de la infección

Las complicaciones ocurren como resultado de la difusión directa hacia el tracto gastrointestinal e incluyen colecistitis, pancreatitis, peritonitis y hemorragia gastrointestinal masiva. Las manifestaciones extraintestinales de la infección son bastante raras y pueden incluir meningitis, endocarditis, artritis séptica, osteomielitis y sepsis neonatal. La bacteremia es detectada en menos del 1% de los pacientes afectados y es más probable que ocurra en pacientes inmunocomprometidos o personas muy jóvenes. La tasa de fatalidad para la infección por *Campylobacter* es de 0.05 por 1,000 casos (14).

La complicación más importante posinfección es el síndrome de Guillain-Barré (SGB), enfermedad desmielinizante del sistema nervioso periférico. Aunque actualmente el riesgo de desarrollar este síndrome es bastante bajo (<1 caso por 1,000 infecciones), éste se incrementa con ciertos serotipos, como los serotipos Penner O:19 y Penner O:41 (30, 31).

Ha sido propuesto un mecanismo para explicar la patogénesis de esta enfermedad, en el cual después de la diarrea causada por el consumo de alimentos contaminados, los anticuerpos y/o células T son inducidos y dirigidos contra la bacteria. Sin embargo debido a la semejanza entre los antígenos microbianos y los antígenos propios, las células nerviosas periféricas son dañadas y ocurre destrucción del tejido y la aparición del síndrome de Guillain-Barré (32, 33).

7. Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico puede ser realizado mediante la demostración del microorganismo en examen directo o a través del cultivo. El uso de métodos serológicos para el diagnóstico no tiene valor para la investigación, ya que en países en vías de desarrollo los títulos en la población suelen ser altos (16).

El examen de las muestras fecales diarreicas utilizando microscopio de campo oscuro o contraste de fases, dentro de las dos horas de evacuación, puede permitir un diagnóstico presuntivo rápido si se observa la rápida motilidad sobre su propio eje (motilidad en sacacorchos), acompañada de eritrocitos y leucocitos fecales. Para cultivo y aislamiento a partir de materia fecal se requiere de una atmósfera microaerófila, medios de cultivo selectivos para inhibir la microbiota acompañante, temperatura óptima de desarrollo (42-43°C) y pH óptimo de crecimiento [6.5 a 7.5] (11,16).

A partir de alimentos congelados o de muestra de materia fecal de pacientes con tratamiento antibiótico previo, es necesario un pasaje reconstituyente de la estructura celular, de por lo menos seis horas a 37°C, por un medio en base a Caldo Brucella, succinato de sodio 0.3%, cisteína 0.01% y solución antibiótica (trimetoprim, vancomicina, anfotericina, cefalotina). Para aislar de agua es necesario filtrar un gran volumen, centrifugar y sembrar (13).

a) Muestras

Las muestras de deposiciones pueden ser tomadas con hisopo rectal o bien por evacuación espontánea, pudiendo mantenerse a temperatura ambiente, por algunas horas, evitando su desecación. La refrigeración de las muestras prolonga por varios días la sobrevivencia del microorganismo. Si es necesario utilizar un medio de transporte, debe utilizarse Cary Blair modificado por la reducción de la concentración de agar en 0.12% (16).

En animales se recolectan muestras fecales o intestinales (ciego) de aves de corral (pollos, pavos, gallinas ponedoras, etc.) y de mamíferos productores de carne (ganado vacuno, ovejas y cerdos) y animales domésticos (perros y gatos), en el matadero se recogen muestras de piel o de carne (34).

8. Aislamiento de *C. jejuni*

a) Cultivo

Un medio de cultivo rico en nutrientes conjuntamente con una atmósfera pobre en oxígeno y rica en dióxido de carbono produce un buen crecimiento de *Campylobacter*. Los antibióticos añadidos como suplemento selectivo inhiben la microbiota acompañante. Las placas se siembran en forma directa con hisopo o con 2-3 gotas de deposiciones acuosas, se disemina por estría.

Tres factores son importantes en el aislamiento de especies termófilas de *Campylobacter*.

- i) Uso de medios selectivos: Están compuestos por un medio base rico en aminoácidos (Brucella, Base *Campylobacter*, Mueller-Hinton, Columbia agar, Brain Heart Infusión agar) con sangre de carnero o caballo (7-10%) y diferentes mezclas de antibióticos para inhibir la flora acompañante. Adicionalmente se puede incluir suplemento de aerotolerancia FBP: metabisulfito de sodio, piruvato de sodio, sulfato ferroso.
- ii) Las placas se incuban en una atmósfera microaerófila que tenga oxígeno producido (5-10%) y dióxido de carbono añadido (3-10%).

iii) La temperatura de incubación de placas: Las especies termófilas de *Campylobacter* crecen mejor y más rápidamente a 42-43°C que a 37°C. La mayor temperatura actúa como inhibidor de la flora fecal y mejora la selectividad.

Son bacterias de crecimiento lento, por lo cual las placas para el primer aislamiento se deben incubar por lo menos 48 horas (35).

b) Medios selectivos para el aislamiento

En la actualidad hay muchos medios en uso para el cultivo bacteriológico de *Campylobacter* spp. Los medios selectivos se pueden dividir en dos grupos fundamentales: medios que contienen sangre y medios que contienen carbón. Los componentes de la sangre y el carbón sirven para eliminar los derivados tóxicos del oxígeno. La selectividad de los medios viene determinada por los antibióticos utilizados. Se utilizan cefalosporinas (generalmente cefoperazona), a veces en combinación con otros antibióticos (por ejemplo, vancomicina y trimetoprim). Se utiliza cicloheximida (actidiona) y más a menudo anfotericina B para inhibir las levaduras y hongos. La principal diferencia entre los medios es el grado de inhibición de la flora contaminante. Los más usados son agar Preston, Skirrow y Butzler (20).

c) Características del crecimiento

Las colonias se desarrollan totalmente en 24 a 48 horas dependiendo del medio utilizado; son de aproximadamente 0.5 mm de diámetro, incoloras o de color gris. Pueden ser acuosas y extenderse o redondas y convexas y ambos tipos de colonias pueden aparecer sobre las placas de agar. No se observa ningún tipo de hemólisis en el medio de cultivo (36).

d) Método de filtración por membrana

El método se basa en la separación de *Campylobacter* del resto de la microbiota presente en las heces, como por ejemplo, coliformes, que quedan retenidos en la superficie de una membrana de celulosa de 0.45 ó 0.66 μm ; los bacilos que logran penetrar o traspasar la membrana van a depositarse sobre un medio rico en sangre que actuará como sustrato para el crecimiento del microorganismo. De esta manera se

obtiene un cultivo selectivo, situación que reemplaza la adición de antibióticos, para eliminar la microbiota acompañante (16).

e) Atmósfera de incubación

Se necesita una atmósfera microaeróbica de 5-10% de oxígeno, 5-10% de dióxido de carbono (y preferiblemente 5-9% de hidrógeno) para un crecimiento óptimo. Se pueden producir condiciones atmosféricas microaeróbicas adecuadas mediante diferentes métodos. En algunos laboratorios, se utilizan evacuaciones repetidas del contenido de una jarra de gas seguidas de sustitución de la atmósfera con gases embotellados. Hay disponibles sistemas generadores de gas de fuentes comerciales (8,16).

f) Temperatura y tiempo de incubación

Generalmente *C. jejuni* manifiesta crecimiento sobre medios sólidos en 24-48 horas a 42°C. La mayor temperatura actúa como inhibición de la microbiota fecal. Se recomienda 48 horas para diagnóstico rutinario (16, 37).

g) Identificación

La identificación de *C. jejuni* inicia con la tinción de Gram, en la cual se puede observar bacilos Gram negativo con forma de coma, S o ala de gaviota, las cuales son las morfologías típicas de este microorganismo (36).

Dentro de las pruebas bioquímicas de *C. jejuni* es oxidasa y catalasa positivo y no oxida ni fermenta los carbohidratos. Para la identificación subsecuente de la especie pueden emplearse reducción de nitrato, producción de H₂S, hidrólisis del hipurato, susceptibilidad al ácido nalidíxico y cefalotina. La hidrólisis del hipurato constituye una de las pruebas más importantes para distinguir *C. jejuni* de otras especies de *Campylobacter* (Anexo 1) (8, 36).

9. Tratamiento

La enteritis causada por *Campylobacter* tiene buen pronóstico, la medida principal es mantener la hidratación y el equilibrio electrolítico. De hecho, la mayoría de los pacientes tiene una enfermedad limitada y no requiere antibióticos en lo absoluto. Sin embargo, hay circunstancias clínicas específicas en las que deben utilizarse antibióticos.

Estas incluyen fiebres altas, deposiciones sanguinolentas, enfermedad prolongada (síntomas que duran más de una semana), embarazo, pacientes con VIH y otros estados inmunocomprometedores (28).

La eritromicina es el antibiótico más utilizado para tratar la campilobacteriosis, porque es muy eficaz, tiene pocos efectos secundarios y es de bajo costo. A diferencia de otros antibióticos, puede administrarse a niños y mujeres embarazadas y no ejerce efecto inhibitorio sobre la microbiota intestinal. La dosis recomendada para adultos es 500 mg en dos dosis por 5 días, para niños la dosis es 40 mg en dos dosis por 5 días (14, 38).

También se utilizan otros agentes antimicrobianos como las fluoroquinolonas (ciprofloxacina) y otros macrólidos como la azitromicina y claritromicina, pero estos son más costosos y no proporcionan ventajas clínicas. *Campylobacter* generalmente es susceptible a los aminoglucósidos, cloranfenicol, clindamicina, nitrofuranos e imipenem. Y son resistentes a la vancomicina, rifampicina y trimetoprim (28).

a) Resistencia de *Campylobacter* a los antibióticos

Las fluoroquinolonas han sido utilizadas ampliamente para el tratamiento de pacientes con gastroenteritis y diarrea del viajero. La resistencia hacia las fluoroquinolonas desarrollada por *Campylobacter* spp. en animales utilizados para consumo se considera que es un problema de salud pública emergente. Algunos estudios indican que el uso de antibióticos en prácticas veterinarias también ha contribuido al desarrollo de resistencia contra fluoroquinolonas por *Campylobacter* spp (38).

La prevalencia de cepas resistentes a las fluoroquinolonas en los Estados Unidos fue de 0% en 1990, incrementándose a 13% en 1997, y 18% en 1999, después de evidenciar el uso de fluoroquinolonas en aves de granja en 1995. En contraste con Australia, donde las fluoroquinolonas no son utilizadas en aves de corral, los aislamientos humanos de *Campylobacter* permanecen susceptibles a las fluoroquinolonas (39, 40).

C. Plantas medicinales

Se entiende por planta medicinal, a cualquier especie vegetal que cuando se administra en cualquier forma y por cualquier vía al hombre o animales ejerce algún tipo de acción farmacológica sobre éstos (41).

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 está 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 (41, 42).

1. Sustancias químicas con acción antimicrobiana aisladas 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. Estas sustancias se dividen básicamente en dos 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 (42, 43).

a) Compuestos fenólicos y simples

Son los compuestos fitoquímicos más simples y consisten en un anillo fenólico sustituido. Algunos ejemplos los constituyen el catecol, el pirogalol y los ácidos cinámico y cafeico. Plantas productoras de compuestos de estas características son el tomillo (*Thymus vulgaris* L.), la manzanilla (*Matriarca chamomilla* L.) y la gayuba (*Arctostaphylos uva ursi* L.) (44).

Los lugares y el número de grupos hidroxilo (OH) en el anillo parece que están relacionados directamente con toxicidad frente a los microorganismos, de forma que un aumento en la hidroxilación está ligado a una mayor toxicidad. El mecanismo parece estar relacionado con la inhibición enzimática por los compuestos oxidados, posiblemente

mediante reacciones de grupos sulfhidrilo o por interacciones no específicas con proteínas (45).

b) Quinonas

Son anillos aromáticos con dos funciones ceto. Son ubicuas en la naturaleza y causantes del color marrón que se produce en las frutas cuando son dañadas. Poseen alta reactividad, formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, la mayoría de las veces inactivando la proteína y anulando su función. Debido a esto, el potencial antimicrobiano de este grupo es amplio. Un ejemplo es la hipericina, una antraquinona aislada de la planta de San Juan (*Hypericum perforatum* L.), antiguamente utilizada como antidepresivo (46).

c) Taninos

Constituyen un grupo de sustancias fenólicas poliméricas y se pueden dividir en hidrolizables y condensados. Se han descrito más de 30 que pueden inhibir hongos y bacterias. Un ejemplo es el tanino presente en el eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) (47).

d) Cumarinas

Son compuestos derivados de la benzo-alfa-pirona, como la cumarina, esculetina, umbeliferota y escopoletina. Tienen propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas y vasodilatadores. Su mecanismo de acción antimicrobiano es mediante la interacción con el ADN eucariota, lo que explica también su actividad antiviral (48).

e) Flavonas y compuestos relacionados

Son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo. Su actividad frente a los microorganismos probablemente se debe a que forma complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana. Mención especial merecen las catequinas, presentes en el té verde (*Camellia sinensis* L.), las cuales ejercen actividad frente a *Vibrio cholerae* O1, *Streptococcus mutans*, *Shigella* y otros microorganismos (48).

f) Alcaloides

Son compuestos nitrogenados heterocíclicos. A este grupo pertenecen la morfina, heroína y cocaína. El mecanismo de acción parece ser mediante intercalación entre la pared celular y el ADN del microorganismo (48).

g) Aceites esenciales

Son sustancias olorosas obtenidas a partir de plantas y especias, comercializadas para su administración en el pienso como conservantes y aditivos alimentarios. Estos compuestos pueden ser letales para las células bacterianas o servir como inhibidores de la producción de metabolitos (49).

Son mezclas líquidas, volátiles de propiedades aromáticas, extraídos de las plantas. Se encuentran casi exclusivamente en las fanerógamas y en especial en algunas familias: rosáceas, labiadas, umbelíferas, lauráceas, etc. Son extraídos por métodos diversos, predominando el de arrastre con vapor de agua. Su composición es muy diversa, pero casi todos sus componentes pertenecen al grupo de los terpenos y a productos de oxidación (alcanfores) (50).

2. Determinación de la actividad antimicrobiana en 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.

Puede dividirse en 2 fases: el tamizaje y la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

a) Tamizaje

Para la determinación de la actividad antimicrobiana 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 microorganismo se mantiene en medio tripticasa soya y luego es recuperado para la prueba mediante incubación por 24 horas. Se prepara una dilución 1:100 y se incuba en placas 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 bacteriano es requerida para declarar que el extracto es activo (51).

b) CIM

Consiste en la cuantificación de la concentración mínima de un extracto, fracción o compuesto que previene el crecimiento visible de un microorganismo. Para su realización se emplean diluciones seriadas del extracto y concentraciones constantes del microorganismo y se evalúa el crecimiento en un ensayo estandarizado. Es importante destacar que una gran proporción de los productos sintetizados con carácter antimicrobiano muestran en la pruebas de sensibilidad *in vitro*, concentraciones inhibitorias mínimas establecidas (52).

D. Actividad inhibitoria de extractos de plantas contra *C. jejuni*

Estudios realizados demuestran la utilidad de extractos y aceites esenciales de plantas contra el crecimiento de *C. jejuni*. Un estudio realizado en el Reino Unido, demostró la actividad de aceites esenciales de laurel, canela, clavo y tomillo, contra cinco bacterias que se transmiten por medio de alimentos, entre ellos *C. jejuni*, *S. enteritidis*, *E. coli*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*. *C. jejuni* fue el más resistente de todos y solamente los aceites de laurel y tomillo mostraron una concentración bactericida menos del 1% (53).

Varios estudios realizados en México demuestran la inhibición del crecimiento de *C. jejuni* y *C. coli*, al utilizar extractos metanólicos de especias y condimentos tales como, cebolla (*Allum cepa* L.), apio (*Aplum graveolens* L.), cola de caballo (*Equisetum arvense* L.), chile de árbol (*Piper annuum* L.), pimienta (*Piper nigrum* L.), comino (*Cuminum cyminum* L.) y hierbabuena (*Mentha piperita* L.). Las plantas evaluadas mostraron las siguientes concentraciones mínimas bactericidas (CMB); pimienta 6.0 mg/mL para *C. jejuni* y 6.0 mg/mL para *C. coli*, y para la hierbabuena 1.6 mg/mL para *C. jejuni* y 2.0 mg/mL para *C. coli* (54, 55).

También se han evaluado extractos metanólicos de plantas comestibles contra el crecimiento de *C. jejuni* y *C. coli*, entre ellos se menciona: haba, frijol, lenteja, garbanzo, jamaica y tamarindo. Los que mostraron un efecto inhibitorio fueron jamaica, CMB: 6.0 mg/mL y 7.0 mg/mL para *C. coli* y *C. jejuni*; en tanto que la CMB para tamarindo fue de 13.0 mg/mL para *C. coli* y 14.0 mg/mL para *C. jejuni* (54).

Diversas investigaciones realizadas en Guatemala entre 2005 y 2007 evaluaron un total de 19 extractos de plantas utilizadas popularmente para el tratamiento de infecciones gastrointestinales; en la búsqueda de actividad contra *C. jejuni*, sin obtener un resultado que demostrase la misma (56-59).

E. Especies vegetales a evaluar

Guatemala es un país que posee una amplia diversidad de flora, la cual es aprovechada por la población. A través de la historia, las hierbas y especias han sido utilizadas para saborizar alimentos y bebidas y también para fines médicos (3). En la presente investigación se utilizaron extractos y aceites esenciales de doce especies nativas que fueron elegidas por ser utilizadas popularmente en Guatemala, como condimento en alimentos o en la medicina tradicional.

1. *Eryngium foetidum* L.

a) Familia: *Apiaceae*

b) Nombre común: Cilantro

c) Descripción y distribución

Hierba perenne, fuertemente aromática, de hasta 60cm de alto, de tallo solitario o varios, simples o ramificados, con o sin hojas, sus hojas, generalmente todas basales, de hasta 30cm de largo y hasta 5cm de ancho (generalmente más chicas), angostándose hacia la base, con los márgenes dentados. Su inflorescencia es terminal, generalmente muy ramificada, compuesta por numerosas cabezuelas cilíndricas, de aproximadamente 1cm de largo y hasta 5mm de ancho, de color verde amarillento (60).

Es originaria de América subtropical, crece en bosques húmedos. Se ha descrito en Guatemala en los departamentos de Baja Verapaz, Alta Verapaz, Petén e Izabal. (60).

d) Uso popular

Su uso es común en el trópico, generalmente a nivel casero, en sustitución del culantro europeo (*Coriandrum sativum* L.), el cual no prospera bien en el trópico. Su uso puede ser fresco para ensaladas o bien cocinado en salsas, sopas y fideos; en la cocina guatemalteca es utilizado también como condimento (60).

e) Actividad demostrada

Las hojas y las raíces son usadas en té para estimular el apetito, mejorar la digestión, combatir el cólico, calmar el dolor estomacal (61).

2. *Cornutia grandifolia* (Schltdl & Cham.) Schaver

a) Familia: *Verbenaceae*

b) Nombre común: Joro'kté, jorobté, oromté, sak'í'ka, palo cuadrado

c) Descripción y distribución

Arbusto o árbol pequeño de hasta 3m de alto, con ramas densamente cubiertas por pelos esparcidos. Las hojas con peciolo gruesos, tienen forma ovada, ovado-elíptica u oblongo ovada. El ápice es acuminado y la base atenuada o decurrente. Por lo general son pubescentes o vellosas en ambas superficies. Miden de 7 a 30cm de largo y de 5 a 19cm de ancho. Las inflorescencias son panículas terminales, de 15 a 40cm de largo, con numerosas flores de color lila pálido ó púrpura. Miden aproximadamente de 1 a 1.5cm de largo, los frutos globosos, pubescentes, son muy pequeños de aproximadamente 5mm de diámetro.

Es originaria de Guatemala, se ha reportado desde México hasta Panamá; en Guatemala se le puede encontrar en los departamentos de Alta Verapaz, Guatemala, Izabal y Sacatepéquez (62, 63).

d) Uso popular

Los curanderos lo conocen muy bien y lo usan extensamente para tratar enfermedades incurables tales como el cáncer, sida, rabia, y todas aquellas que inhiben el sistema inmunológico (64).

e) Actividad demostrada

Sus hojas son utilizadas contra la fiebre, dolor de riñones, infecciones de estómago y garganta (62-64).

3. *Fernaldia pandurata* (A. DC.) Woodson

a) Familia: *Apocynaceae*

b) Nombre común: Loroco

c) Descripción y distribución

Hierba trepadora, pequeña o grande, densamente puberulenta o cortamente aterciopelada-pilosa en todas partes. Hojas membranosas, en peciolo de 1 a 2cm de largo, oblongo-elípticas a ampliamente ovaladas, las hojas de abajo, algunas cordadas en la base, las superiores, obtusas o truncadas, usualmente muy densas y suavemente pilosas en el envés (65).

Flores: de 8 a 18 en la inflorescencia, brácteas ovaladas. Cáliz con lóbulos ovalados, agudos u obtusos, corola blanca internamente, verduzca exteriormente y glabra, la garganta ampliamente campanulado-cónica, lóbulos ciliados, densamente velludo-aracnoides en la base, interiormente (65).

Guatemala es centro de origen, localizado también en México, El Salvador y Honduras. Puede encontrarse silvestre en campos de cultivo y plantado en muy pequeñas cantidades en los patios de las viviendas de la región para consumo familiar, pero a menudo cultivado a nivel comercial, principalmente en la aldea Huijón de Usumatlán y Juan Ponce, (Río Hondo, Zacapa) y Marajuma, El Progreso (66).

d) Uso popular

Su utilización es básicamente como condimento de alimentos entre éstos, huevos, tamales, carnes, arroz, en Guatemala es utilizado para empanadas y tamalitos conocidos como "chuchitos" (66, 67).

e) Actividad demostrada

No se encontró información

4. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson

a) Familia: *Verbeneaceae*

b) Nombre común: Juanilamia, mastranto, salvia santa, Santa María

c) Descripción y distribución

Arbusto aromático de 1 a 2m de alto, ramas largas, cayentes densamente puberulentas o estregosas. Hojas opuestas, oblongas de 2 a 8cm de largo, arrugadas, festonadas, cubiertas con pelillos cortos, venas prominentes en la cara externa; pedúnculos solitarios. Flores tubulares de 4 a 5mm de largo, brácteas puberulentas, ovandas, cabezas florales redondas u oblongas en pares, cáliz viloso, corola lila, púrpura o blanca (65).

Es nativa de América, crece en México, Sur América y el Caribe en laderas a la orilla de caminos y riveras de los ríos en alturas hasta de 1800msnm. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Sacatepéquez, Sololá y Suchitepéquez (65).

d) Uso popular

Se utiliza para afecciones respiratorias (asma, catarro, laringitis, resfrío, tos) diabetes, fiebre, insomnio, enfermedades venéreas, gota, artritis, dolores musculares y de muelas, hipertensión y atención del parto. Por vía tópica las hojas machacadas se inhalan para inducir el sueño, la infusión se aplica en afecciones dermatomucosas y flujo vaginal. No se le conoce un uso culinario (68).

e) Actividad demostrada

El conocimiento de hojas y flores se usa por vía oral para el tratamiento de afecciones hepáticas, gastrointestinales (cólico, colitis, diarrea, dispepsia, indigestión, flatulencia, náuseas y vómitos) (68, 69).

5. *Lippia chiapasensis* Loes

a) Familia: *Verbenaceae*

b) Nombre común: Salviyá

c) Descripción y distribución

Arbustos o árboles débiles a 4m de altura, las ramas densamente pubescentes, hojas en pecíolo de 4 a 14mm de largo, las briznas ovadas u ovadas-elípticas, venación prominente, márgenes dentados aserrados; pedúnculos de 2 a 4 en cada axil, densamente pubescentes. Cáliz de 2 a 3mm, largo, corola amarilla, dos veces más largo que el cáliz, generalmente puberuloso en el ápex y sin cuello (70).

Crece en matorrales o bosques húmedos o secos, a menudo rocosos, frecuentemente en bosques de pino de roble, a veces en prados, de 1500 a 3000msnm. Se ha descrito en México y Guatemala, en los departamentos de Baja Verapaz; Huehuetenango; San Marcos; Sololá, Totonicapán (68, 70).

d) Uso popular

Esta planta es usada por el grupo étnico quiché, que vive en la región de Totonicapán (Guatemala), como aromática en el tratamiento de enfermedades respiratorias, dermato-mucosas y nerviosas. Por tradición oral se sabe que es utilizada para dar sabor al atol de maíz (68).

e) Actividad demostrada

Se le atribuye propiedad analgésica, usado en el tratamiento de afecciones respiratorias y nerviosas (71).

6. *Lippia graveolens* Kunth

a) Familia: *Verbenaceae*

b) Nombre común: Orégano, orégano de monte, mejorana (México, Guatemala, El Salvador, Honduras, Costa Rica)

c) Descripción y distribución

Arbustos delgados de 2m de alto, las ramas con pubescencia cortamente pilosa. Sus hojas con pecíolo usualmente de 5 a 10mm de largo, los limbos oblongos o elípticos y ovalados a ovalado-oblongo, usualmente obtusos o redondeados en el ápice. Sus flores

son espigas subglobosas a oblongas de 4 a 12mm de largo, ovaladas a lanceoladas agudas, glandular y densamente pilosas (62).

Es nativa del sur de Texas a Nicaragua. Se encuentra en pendientes pedregosas muy secas, en planicies o matorrales húmedos o secos, es endémica en la aldea Casas de Pinto, Río Hondo, Zacapa y forma rodales densos en los cerros de la aldea Paso de los Jalapas, de El Júcaro, El Progreso (68).

d) Uso popular

Por su sabor aroma y valor nutritivo las hojas secas se usan para sazonar carne, pescado, embutidos, ensaladas, guacamol, pozol, salsas y licores; se usa como planta de jardín aromática. El aceite esencial de *Lippia graveolens* es poco explotado en la industria (66, 72).

e) Actividad demostrada

La decocción de las hojas es tomada como un eficaz antiespasmódico en cólicos estomacales, vómitos, inapetencia, digestión lenta y meteorismo. Estudios antiparasitarios demuestran que la decocción de la planta es activa contra *Giardia lamblia* (68).

7. *Ocimum micranthum* Willd

a) Familia: *Lamiaceae*

b) Nombre común: Albahaca, albahaca cimarrona, albahaca de monte, albahaca silvestre, hierba del toro (Huehuetenango)

c) Descripción y distribución

Hierba anual, 50cm de alto, erecta, ramificada, tallos puberulentos o glabros. Hojas delgadas, ampliamente ovaladas de 2 a 7cm de largo, agudas redondeadas a la base, aserradas, casi glabras, densa y finamente glandular, pálidas al envejecer (70).

Es nativa de América tropical, aunque su origen exacto es desconocido, crece silvestre en climas cálidos y terrenos fértiles. Se cultiva en jardines y huertos a casi todas las alturas desde La Florida, pasando por México, hasta Centro y Sur América. En Guatemala se localiza en los departamentos de Alta Verapaz, Chiquimula, El Progreso, Huehuetenango, Izabal, Jalapa, Jutiapa, Petén, Santa Rosa y Zacapa (70).

d) Uso popular

Las hojas frescas y secas se usan para sazonar comidas principalmente salsas, pastas y ensaladas. El olor de las hojas frescas es repelente para larvas de insectos y mosquitos, razón por la que se cuelgan ramas frescas en las viviendas; tiene uso aromático, ornamental y cosmético (68).

e) Actividad demostrada

El cocimiento en infusión se usa oralmente para tratar afecciones gastrointestinales (diarrea, disentería, gastralgia, parasitismo), la corteza es cianogénica y se usa en problemas digestivos (cólera). Las semillas son mucilaginosas, diuréticas y nutritivas, por vía oral se usa para tratar afecciones digestivas (67, 68).

8. *Pimenta dioica* (L.) Merr.

a) Familia: *Myrtaceae*

b) Nombre común: Pimienta gorda, pimentón

c) Descripción y distribución

Árbol de hasta con más de 20m de altura, 30 a 40cm de diámetro a la altura del pecho, tronco liso y recto con corteza de color café pálido desprendiéndose en escamas delgadas o grandes láminas, ramillas creciendo vigorosamente y 4 anguladas, los ángulos terminando distalmente en la posición de las estípulas, ramillas, inflorescencias y foliaje joven cerradamente apesado-pubescente con pelos blanco-amarillentos o sórdidos, hojas opuestas, coriáceas muy aromáticas, ovadas o elípticas. Flores colocadas sobre panículas axilares de 6 a 12cm de largo, ramas cinosas finamente pubescentes con muchas flores, sésiles o pediceladas.

Originaria de México y Centro América, se extiende desde Veracruz y Oaxaca a Chiapas y Guatemala, Belice, Honduras, El Salvador, Cuba y Jamaica. En Guatemala se le puede localizar en los departamentos de Petén, Alta Verapaz y Baja Verapaz (73, 74).

d) Uso popular

Es muy usado como condimento en los países americanos y europeos, y se vende generalmente en los mercados de Guatemala. La pimienta se usa molida o en aceite destilado, para varias preparaciones (carne, repostería). Los frutos se recogen aún

verdes y puestos a secar dan una especie apreciada que en inglés recibe el nombre de “all spice” porque su sabor recuerda a la vez la canela, el clavo y la nuez moscada. El fruto, la guayabita, también se usa como condimento, en postres y dulces, tales como plátanos y otros y en bebidas, en los llamados caratos de arroz o de maíz y otros en ponches. La hoja se usa como condimento, principalmente en platos salados y se destila un aceite utilizado en la industria alimenticia y en perfumería. Sus hojas y frutos se usan de forma medicinal (73, 75, 76).

e) Actividad demostrada

Mejora la digestión. La semilla en decocción, con sal y agua, por vía oral, se usa para la diarrea y disentería. Las semillas machacadas y en infusión son estomáticas (76).

9. *Piper auritum* Kunth

a) Familia: *Piperaceae*

b) Nombre común: Hoja de Santa María, Santa María, hoja de jute, juniapra, caña de oro, ocaya, hierba santa, hoja de la estrella, obet.

c) Descripción y distribución

Hierba suculenta, grande, gruesa, con ramas esparcidas o raramente leñosas y viniendo a ser árbol, comúnmente de 2m de alto, pero ocasionalmente puede medir 6m; las ramas firmes son esparcidamente pubercentos o glabras, las hojas son cortas o elongadas y firmes peciolos, usualmente de color verde-amarillento brillante; la inflorescencia es una espiga de color verde pálido, de 4mm de grosor, comúnmente de 20 a 25cm de longitud; el fruto es una baya, muy pequeña, ovoide o globosa; las semillas son pequeñas con una testa membranosa, el endospermo copioso y con el embrión pequeño (77).

Nativa del sur de México hasta Colombia, cultivada y naturalizada en Cuba y el sur de la Florida. Es un matorral que en Guatemala se le puede encontrar en bosques húmedos, a menudo como una vegetación secundaria a 1800msnm o menos y más comúnmente a 900 msnm o menos. Se encuentra en Petén, Alta Verapaz, Izabal, Santa Rosa y Escuintla, Guatemala, Sacatepéquez (probablemente introducida), Chimaltenango, Sololá, Suchitepéquez, Retalhuleu, Quetzaltenango y San Marcos (77).

d) Uso popular

En Guatemala las hojas se usan para condimentar las carnes y alimentos que contienen el caracol llamado "jute" (67, 78).

e) Actividad demostrada

La infusión de las hojas puede usarse en malestares estomacales. Un extracto de las hojas se usa como anestésico local. Sus hojas son empleadas como emolientes analgésicos antiinflamatorios y combinadas con aceite son colocadas en el área del hígado en caso de cólicos. Se utiliza la decocción de las hojas por vía oral para la presión alta y dolor de ovario (67).

10. *Piper jacquemontianum* Kunth

a) Familia: *Piperaceae*

b) Nombre común: Cordoncillo

c) Descripción y distribución

Arbusto de aproximadamente 2m de altura, las ramas jóvenes densamente hispidulosas o hírtulas, algunas veces glabras con la edad u ocasionalmente casi glabras desde el principio; pecíolos mayormente de 1cm de largo o menos, algunas veces más largo en las hojas bajas, rígidos, densamente hispidulosos o raramente glabros. Ápice abruptamente acuminado o largamente acuminado, muy desigual en la base y más o menos oblicua (79).

Es originaria de América Tropical, crece en Campeche, Guatemala, Belice. En Guatemala se ha descrito en los departamentos de Alta Verapaz, Petén, Izabal y Suchitepéquez (80).

d) Uso popular

En Guatemala se utiliza para bajar la fiebre, para granos, tos y para aliviar el dolor de cabeza y de cuerpo, para el dolor del corazón, para la presión. No se le conoce uso culinario (81).

e) Actividad demostrada

No se encontró información

11. *Psidium guajava* L.

a) Familia: *Myrtaceae*

b) Nombre común: Guayaba, guayaba colorada, guayaba perulera, pichi (Yucatán), xalcócotl (lengua azteca: fruto agrio arenoso)

c) Descripción y distribución

Árbol o arbusto de hasta 10m de alto, de corteza escamosa, rojiza y delgada. Hojas opuestas, corto-pecioladas, elípticas a oblongas, subcoriáceas, nervaduras conspicuamente impresas en el haz, prominentes en el envés. Flores blancas solitarias o en grupos de 2 a 3 en pedúnculos delgados; estambres escamosos. Fruto comestible, globoso, o piriforme, amarillo de 3 a 6cm de diámetro (70).

Originaria de América tropical, naturalizada en regiones tropicales y subtropicales del viejo mundo. Puede encontrarse en la región de Florida, México, Centroamérica, Costa Rica y Panamá. En Guatemala, se ha descrito en todo el país, particularmente Baja Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Jutiapa, Santa Rosa y Suchitepéquez (66).

d) Uso popular

La fruta madura se come fresca, cocida y en jalea, el mesocarpio es agridulce. El aceite esencial de las hojas o las semillas, debido a la presencia de eugenol, se emplea como saborizante aromático. El fruto se consume fresco o en conservas (jaleas, mermeladas, miel) y jugos, en vinos y bebidas refrescantes. El principal mercado de esta fruta es vendiéndola como fruta fresca y como jalea y pasta (82).

Con las frutas y hojas se prepara una bebida astringente, conocida en Venezuela como guarapo, y en consecuencia antidiarreico, dando la toma en cucharadas o vasitos según la edad y peso del paciente. Las hojas maceradas se utilizan en forma de cataplasma en los edemas traumáticos. No se le conoce uso culinario (83).

e) Actividad demostrada

A las hojas y corteza se le atribuye propiedad antibacteriana, antiemética, antiinflamatoria, antihelmíntica, antiséptica, antitusiva, astringente, carminativa, espasmódica y tónica (83, 68).

12. *Tagetes lucida* Cav

a) Familia: *Asteraceae*

b) Nombre común: Pericón, iyá, jolomocos, hierba de San Juan

c) Descripción y distribución

Hierba perenne muy aromática, glabra, erecta de 30 a 95cm de altura. Se levanta desde corta, gruesa y leñosa, cimosamente ramificada arriba, ramas escasas, muy resinosa al secarse, hojas opuestas, sésiles, laminares u oblongas lanceoladas; romas o puntiagudas, obtusas o agudas en el ápice, finamente dentadas, provistas de numerosas glándulas oleosas, pequeñas, y esparcidas. Flores amarillas en pequeñas cabezuelas terminales o cimas abiertas de 9 a 10mm de diámetro, involucreo o cilíndrico, en arreglos terminales, de 5 a 7 filarios tubulados en el ápice, flores del disco de 5 a 7 corolas (79).

Nativa de México a Honduras en bosques de encino (*Quercus* sp.) y laderas de 1000 a 2000 msnm. Abundante en la época de lluvia, desaparece en la época seca. En Guatemala se le ha encontrado en los departamentos del occidente del país, principalmente en Quetzaltenango (79,).

d) Uso Popular

La planta completa tiene uso culinario para sazonar elotes cocidos (84).

e) Actividad demostrada

Dolor de estómago: hojas y flores aplicadas por vía oral. Gastritis, dolores musculares. Cólicos, malaria y antídoto de picaduras de escorpión, fiebre y tos, acelera el parto, úlceras, diarreas, retención urinaria, indigestión (77, 84, 85).

IV. JUSTIFICACIÓN

C. jejuni es una de las causas más comunes de enteritis aguda. La mayor parte de los casos se debe al consumo de carne de aves contaminada, donde se cree que *C. jejuni* es un comensal.

La carne de pollo cada día es uno de los alimentos que más se consume debido a las ventajas que presenta, es una carne nutritiva y apta para todas las edades, es la más barata de producir y fácil de preparar; además, es baja en grasa y poco urigénica. Pero se cree que en este alimento es donde más frecuentemente se encuentra *C. jejuni*.

Diversos estudios han demostrado que los extractos de plantas, incluyendo aceites esenciales, tienen propiedades antimicrobianas que pueden ser aplicadas para disminuir la carga bacteriana presente en los alimentos de consumo humano y para la conservación de los mismos. Por consiguiente, la presente investigación tiene la finalidad de evaluar el efecto inhibitorio sobre la bacteria *C. jejuni*, de doce plantas condimentarias, alimenticias y medicinales; y comprobar su acción bactericida para ser recomendadas como una alternativa natural para un control efectivo de este enteropatógeno.

V. OBJETIVOS

A. General

Evaluar la actividad inhibitoria de extractos y aceites esenciales de doce especies condimentarias, alimenticias y medicinales, de uso popular en Guatemala, sobre el crecimiento de *C. jejuni*.

B. Específicos

1. Colectar material vegetal y preparar extractos diclorometánicos, metanólicos y aceites esenciales de doce plantas condimentarias, alimenticias y medicinales.
2. Tamizar la actividad inhibitoria de *C. jejuni* por extractos y aceites esenciales, aplicando el bioensayo de actividad antimicrobiana *in vitro* por el método de difusión en disco.
3. Determinar la CIM de extractos y aceites esenciales que resulten activos.

VI. HIPÓTESIS

Al menos un extracto vegetal y un aceite esencial de las plantas evaluadas presenta actividad inhibitoria *in vitro* sobre el crecimiento de *C. jejuni*

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo

Doce plantas condimentarias, alimenticias y medicinales de uso popular en Guatemala.

B. Muestra

1. Extractos diclorometánicos, metanólicos y aceite esencial de: *C. grandifolia*, *E. foetidum*, *F. pandurata*, *L. alba*, *L. chiapasensis*, *L. graveolens*, *O. micranthum*, *P. dioica*, *P. auritum*, *P. jacquemontianum*, *P. guajava* y *T. lucida*

2. Cepa ATCC 33291 de *C. jejuni* (origen humano, cepa de colección); UVG 62-1773-6 de *C. jejuni* (origen humano, aislamiento clínico) y *C. coli* UVG 62-1769-9 (origen humano, aislamiento clínico) Universidad del Valle de Guatemala.

C. Recursos

1. Humanos

a) Seminaristas: Vilma Gricelda Samol Juárez

Berta Corina Santizo Paz

b) Asesor: Lic. Armando Cáceres

c) Revisor: Licda. Margarita Paz

2. Institucionales

a) Laboratorio de Bioensayos Departamento de Citohistología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia USAC

b) Centro de Estudios en Salud (CES), Universidad del Valle de Guatemala

c) Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia USAC

d) Laboratorio de Productos Naturales Farmaya

D. Materiales

1. Equipo

- a) Incubadora 36°C
- b) Refrigerador 4°C
- c) Bolsas Ziploc que formaron parte del ambiente microaerofílico
- d) Campana bacteriológica de flujo laminar
- e) Microscopio
- f) Balanza analítica y semi analítica
- g) Autoclave
- h) Incinerador
- i) Pinzas
- j) Gradilla
- k) Pipetas automáticas
- l) Cajas de petri
- m) Congelador a -80°C
- n) Percolador
- o) Rotaevaporador
- p) Destilador Neoclevenger
- q) Desecadora
- r) Horno
- s) Cristalizadores
- t) Embudos de vidrio
- u) Probeta de 1000mL
- v) Erlenmeyer de 500 y 1000mL
- w) Vaso de precipitar de 500 mL
- x) Balón de destilación de 1000mL

2. Materiales y Reactivos

- a) Sobres generadores de microaerofilia CampyGen™ Oxoid
- b) Agar base sangre
- c) Agar Mueller Hinton
- d) Sangre de carnero
- e) Glicerol

- f) Colorante carbol fucsina
- g) Caldo tripticasa soya
- h) Solución salina
- i) Peróxido de hidrógeno
- j) Reactivo de oxidasa
- k) Tabletas de eritromicina MK[®]
- l) Agua destilada
- m) Discos estériles de papel filtro
- n) Láminas portaobjetos
- o) Cajas de Petri
- p) Frascos ámbar y viales
- q) Tubos de ensayo
- r) Hisopos estériles
- s) Asas de nicromo
- t) Pipetas Pasteur
- u) Papel filtro
- v) Algodón
- w) Bandejas de plástico y aluminio
- x) Diclorometano
- y) Metanol
- z) Pentano

E. Metodología

1. Preparación de extractos (86)

- a) Se pesaron de 150 a 250g de materia seca vegetal tamizada y se colocó en una bandeja de aluminio
- b) Se colocó algodón en la parte inferior del percolador, y papel filtro para cubrir el fondo
- c) Se humedeció la materia vegetal con cierto volumen de diclorometano o metanol (dilución 1:5), según fue el caso
- d) Se transfirió todo el material vegetal al percolador y se cubrió con el disolvente
- e) Se dejó reposar por 24 horas, para que se disuelva la parte de la planta seleccionada

- f) Se recolectó en un erlenmeyer todo el disolvente agregado y se colocó en un balón de destilación de 1,000mL
- g) Se verificó que todas las conexiones eléctricas estuvieran conectadas, el nivel del baño de calentamiento fuera adecuado y la llave de alimentación del refrigerante estuviera cerrada
- h) Se colocó el balón con la muestra y se sujetó con la llave correspondiente y se le asignó una rotación de 50% y una temperatura entre 40-60°C
- i) Se encendió la bomba de vacío, si el disolvente a utilizar fue metanol, cuantas veces fuese necesario hasta agotar el disolvente
- j) Se inició la destilación del extracto con la recuperación del disolvente, hasta que estuviera semisólido
- k) Se agregó el disolvente recuperado al percolador que contiene el material vegetal (esta operación se repitió dos veces antes de iniciar la concentración)
- l) Una vez concentrado el extracto se retiró el balón, y el extracto obtenido se colocó en cristizador de vidrio previamente tarado
- m) Se colocó en la desecadora durante 7 a 15 días
- n) Se verificó la consistencia sólida del extracto y se guardó en frascos ámbar previamente tarados y se almacenó en refrigeración a 4°C
- o) Se calculó el porcentaje de rendimiento del extracto obtenido

2. Preparación de aceites esenciales (86)

- a) Se molieron 25g de materia seca vegetal
- b) Se colocaron en un balón de destilación de 1,000mL
- c) Se agregaron aproximadamente 500mL de agua hasta cubrir todo el material vegetal
- d) Se conectó la bomba que circula la solución de enfriamiento por el refrigerante
- e) Se llenó con agua destilada el tubo N hasta el nivel B del tubo graduado
- f) Se agregaron 2mL de disolvente orgánico (pentano) en el tubo K utilizando una pipeta Pasteur y se colocó el tapón al tubo hasta que empezara a destilar el aceite
- g) Se dejó destilar a temperatura constante durante 2-3 horas, se mantuvo un flujo de destilación de 2-3mL por minuto
- h) Se determinó el tiempo de destilación a partir de que empezara a obtenerse el aceite

- i) Se midió la capa superior del aceite esencial recogido en el recipiente graduado
- j) Se dejó transcurrir 10 min después de terminar el calentamiento antes de colectar el aceite
- k) Se abrió la llave, y se dejó caer el agua y se descartó. Se recibió la parte orgánica en un vial y se agregó al tubo K aproximadamente 1mL del disolvente orgánico utilizado anteriormente, para lavar y arrastrar todo el aceite recuperado
- l) Se eliminó el disolvente orgánico utilizando baño María
- m) Se pesó el aceite obtenido, y se vertió en un vial color ámbar y se almacenó a 4°C
- n) Se determinó el porcentaje de rendimiento del aceite esencial obtenido

3. Resiembras de cepas de *Campylobacter* (87)

- a) Se utilizaron las cepas de *C. jejuni* ATCC® 33291, UVG 62-1773-6 y *C. coli* UVG 62-1769-9
- b) Se realizaron resiembas en agar sangre de carnero 7%
- c) Se tomaron los viales que contienen la bacteria, los cuales están almacenados en un congelador a -80°C utilizando el asa bien caliente
- d) Se eligió la muestra del hielo y se colocó un inóculo inicial, posteriormente se realizaron cuatro inóculos perpendiculares al inóculo inicial
- e) Se dejó incubar en condiciones de microaerofilia (CampyGen™ Oxoid) a 36°C por 48 horas
- f) Se examinaron las cajas de agar y 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 tinción con carbol fucsina, prueba de oxidasa, catalasa e hidrólisis del hipurato
- h) Una vez identificadas, se almacenaron las colonias en viales con tripticasa soya y glicerol al 20%, hasta el momento de realizar el ensayo de actividad antimicrobiana

4. Curva de actividad dosis/efecto

- a) Se prepararon soluciones de eritromicina MK® a diferentes concentraciones: 0.60, 1.21 y 2.43µg
- b) Se impregnaron discos estériles con 50µl de cada concentración

- c) Se realizó la siembra de la cepa ATCC 33291 en agar Mueller-Hinton sangre de carnero 7%
- d) Se colocaron los discos impregnados sobre la resiembra
- e) Se dejó incubar por 48 horas en ambiente microaerofílico
- f) Los resultados fueron interpretados, un halo menor o igual a 13mm fue considerado resistente, un halo entre 14 y 22mm fue considerado intermedio, finalmente un halo mayor o igual a 23mm fue considerado susceptible

5. Ensayo de actividad contra cepas de *Campylobacter* por extractos y aceites esenciales de especies vegetales (87)

El ensayo de actividad inhibitoria *in vitro* se realizó por el método de difusión en disco. Este consiste en enfrentar la bacteria, con los extractos y aceites esenciales de especies vegetales, mediante discos impregnados por los mismos, utilizando agar Mueller-Hinton sangre de carnero 7%

- a) Preparación de dilución del extracto a concentración conocida 200µg/mL
 - i) En un vial se pesó 0.0120mg de cada extracto y se disolvió en 3mL de metanol absoluto
 - ii) La solución anterior se filtró, para ello se emplearon filtros de éster de celulosa mixta de 25mm de diámetro
 - iii) De esta solución se tomó un volumen de 50µL para obtener una concentración de 200µg en cada disco
- b) Preparación del aceite esencial
 - Se utilizó una sola dosis de 10µL de aceite puro
- c) Impregnación de discos de difusión
 - Se impregnaron discos estériles con 50µL de cada solución preparada (se utilizó un volumen de 10µL diarios, ya que es la cantidad apropiada que el disco puede absorber)
- d) Preparación del inóculo
 - i) Se inocularon de 3 a 5 colonias de las bacterias a estudiar en un vial con 1mL de caldo tripticasa soya
 - ii) Se incubó a 36°C por 30 min, se verificó que la turbidez fuera aproximadamente igual al estándar de McFarland 1.0

- iii) Al alcanzar la turbidez deseada, se inoculó con un hisopo estéril en cuatro direcciones sobre la caja de agar Mueller Hinton sangre y se dejó reposar por 5 min como mínimo, y un máximo de 10
- iv) Se colocó un máximo de 6 discos con los extractos y aceites esenciales por caja, en cada una se incluyó un disco de eritromicina (0.60µg) como control positivo y un disco impregnado con metanol, como control negativo
- v) Se incubó en condiciones de microaerofilia por 48 horas a 36°C

e) Interpretación de resultados

La actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos y aceites esenciales fue estimada midiendo cualitativamente y cuantitativamente la presencia o ausencia de halos de inhibición de crecimiento.

- i) Se consideraron activos aquellos extractos y aceites esenciales que originaron un halo de inhibición $\geq 7\text{mm}$
- ii) Se consideraron inactivos aquellos extractos y aceites esenciales que presentaron un halo $< 6\text{mm}$

F. Diseño de la investigación

1. Tipo de estudio

Estudio experimental, diseño de bloques incompletos (el orden de colocación de los discos fue al azar en número parcial). La determinación de la actividad inhibitoria *in vitro* de los extractos vegetales y aceites esenciales sobre el crecimiento de *C. jejuni* fue por el método de difusión en disco.

Se consideró actividad inhibitoria; la formación de un halo de inhibición alrededor del disco impregnado, de los extractos que resultaron activos se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM). Se realizó un mínimo de 5 repeticiones para cada extracto y aceite esencial, para un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, de acuerdo a la tabla de la distribución binomial.

2. Variables

- a) Independiente: Extractos diclorometánicos, metanólicos y aceites esenciales de doce especies condimentarias, alimenticias y medicinales de uso popular en Guatemala.
- b) Variable dependiente: Actividad inhibitoria contra *C. jejuni*.

3. Análisis estadístico

El análisis de los datos fue basado en una prueba de hipótesis binomial, donde H_0 : $p \leq 0.5$ (no tiene efecto inhibitorio) y H_a : $p > 0.5$ (si tiene efecto inhibitorio). Si 5 repeticiones dan éxito, H_0 se rechaza para el nivel α establecido, y se dirá que los extractos y aceites esenciales evaluados tienen efecto inhibitorio *in vitro* significativo sobre el crecimiento de *C. jejuni* con un valor $p=0.0312$.

Guatemala, 02 de Febrero de 2011

A quien corresponda:

Por este medio, hago constar que el trabajo de seminario de investigación “Actividad inhibitoria de extractos y aceites esenciales de especies condimentarias, alimenticias y medicinales contra *Campylobacter jejuni*”, formó parte de la línea de investigación que determinó la actividad inhibitoria contra microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos, tales como, *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter jejuni*. El mismo se realizó dentro de las instalaciones del Laboratorio de Bioensayos, en el Departamento de Citohistología, Facultad de C.C. Q.Q. y Farmacia, USAC.

El seminario de investigación se efectuó en un período de 720 horas, obteniendo los resultados que se describen a continuación. La instancia oferente le otorga la aprobación para su publicación.

Atentamente,

Lic. Armando Cáceres

Asesor

VIII. RESULTADOS

Se obtuvieron extractos diclorometánicos, metanólicos y aceites esenciales de doce especies condimentarias, alimenticias y medicinales, de uso popular en Guatemala. Los extractos fueron obtenidos mediante la técnica de percolación y concentrados en rotaevaporador y los aceites esenciales por hidrodestilación con Neoclevenger. El rendimiento de cada especie vegetal evaluada se muestra en la Tabla 1. En el caso de los aceites esenciales, igualmente se evaluaron doce especies, sin embargo se obtuvo aceite únicamente de nueve. Las hojas de *C. grandifolia*, *E. foetidum* y la flor de *F. pandurata* proporcionaron un rendimiento tan bajo que fue imposible obtener suficiente cantidad de aceite esencial mediante la técnica antes mencionada, por lo que no se utilizaron para el bioensayo.

Para la validación del método, se evaluaron tres concentraciones de eritromicina, 0.60, 1.21 y 2.43 μ g; contra la cepa de *C. jejuni* ATCC[®] 33291. Los halos de inhibición producidos por el antibiótico se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1. Porcentajes de rendimiento de extractos diclorometánicos, metanólicos y aceites esenciales obtenidos.

Especie vegetal	Parte utilizada	% Rendimiento Diclorometano	% Rendimiento Metanol	% Rendimiento Aceites Esenciales
<i>C. grandifolia</i>	Hoja	2.04	2.31	*NSO
<i>E. foetidum</i>	Hoja	3.08	12.60	*NSO
<i>F. pandurata</i>	Flor	1.06	1.20	*NSO
<i>L. alba</i>	Hoja	9.94	6.42	0.82 \pm 0.05
<i>L. chiapasensis</i>	Hoja	14.71	15.96	0.91 \pm 0.17
<i>L. graveolens</i>	Hoja	10.36	11.39	3.08 \pm 0.11
<i>O. micranthum</i>	Hoja	5.92	6.58	1.42 \pm 0.11
<i>P. dioica</i>	Fruto	2.89	9.69	0.97 \pm 0.42
<i>P. auritum</i>	Hoja	20.46	13.43	1.10 \pm 0.23
<i>P. Jacquemontianum</i>	Hoja	7.48	6.65	0.44 \pm 0.08
<i>P. guajava</i>	Hoja	4.77	13.51	0.20 \pm 0.08
<i>T. lucida</i>	Hoja y tallo	3.86	14.39	0.26 \pm 0.05

Fuente: Datos Experimentales

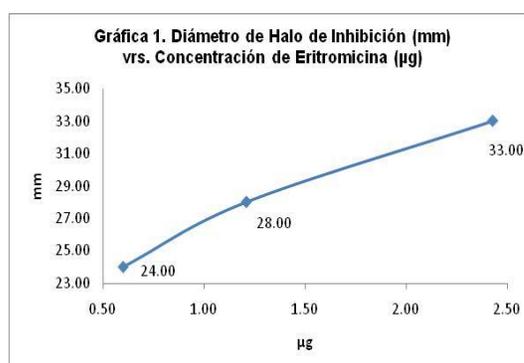
*NSO: No se obtuvo

Tabla 2. Actividad de la eritromicina contra *C. jejuni* ATCC® 33291 empleando la técnica de difusión en disco.

Concentración de eritromicina µg	Halo de inhibición mm ^a
0.60	24.0
1.21	28.0
2.43	33.0

Fuente: Datos experimentales

^a mm milímetro. Cada valor es un promedio de cinco repeticiones independientes



La actividad inhibitoria fue evaluada en tres cepas de *Campylobacter* correspondientes a una cepa ATCC® y dos aislamientos clínicos de muestreos realizados por la Universidad del Valle de Guatemala. Aunque esta investigación está enfocada en la actividad anti *C. jejuni*, se incluyó una cepa de *C. coli* para determinar el comportamiento en dos variedades del mismo género frente a los extractos y aceites esenciales.

La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos con los extractos diclorometánicos. Las tres cepas mostraron igual comportamiento, ya que fueron sensibles a un extracto, los halos de inhibición fueron de menor tamaño. El extracto de *T. lucida* fue activo contra *C. jejuni* ATCC® 33291 y *C. jejuni* UVG 62-1773-6. En tanto que el extracto de *L. graveolens* fue capaz de inhibir a *C. coli* UVG 62-1769-6.

Tabla 3. Actividad inhibitoria *in vitro* de extractos diclorometánicos de doce especies condimentarias, alimenticias y medicinales contra cepas de *Campylobacter*, utilizando la técnica de difusión en disco^a

Especie vegetal	Parte utilizada	<i>C. jejuni</i> ATCC® 33291 mm ^b	<i>C. jejuni</i> UVG 62-1773-6 mm	<i>C. coli</i> UVG 62-1769-9 mm
<i>E. foetidum</i>	Hoja	<6.0	<6.0	<6.0
<i>C. grandifolia</i>	Hoja	<6.0	<6.0	<6.0
<i>F. pandurata</i>	Flor	<6.0	<6.0	<6.0
<i>L. alba</i>	Hoja	<6.0	<6.0	<6.0
<i>L. chiapasensis</i>	Hoja	<6.0	<6.0	<6.0
<i>L. graveolens</i>	Hoja	<6.0	<6.0	8.0 ^c
<i>O. micranthum</i>	Hoja	<6.0	<6.0	<6.0
<i>P. dioica</i>	Fruto	<6.0	<6.0	<6.0
<i>P. auritum</i>	Hoja	<6.0	<6.0	<6.0
<i>P. Jacquemontianum</i>	Hoja	<6.0	<6.0	<6.0
<i>P. guajava</i>	Hoja	<6.0	<6.0	<6.0
<i>T. lucida</i>	Hoja y tallo	7.0 ^c	8.0 ^c	<6.0
Eritromicina (0.60µg)	-----	23.0	24.0	24.0
Metanol (control negativo)	-----	<6.0	<6.0	<6.0

Fuente: Datos experimentales

^a Los discos poseen un diámetro de 6mm y una concentración de 200µg/mL

^b mm milímetros. Cada valor es un promedio de cinco repeticiones independientes

^c Actividad inhibitoria significativa (p=0.0312)

En el caso de los extractos metanólicos, también se observa que los halos de inhibición fueron de menor tamaño. El extracto metanólico de *L. alba* inhibió a las tres cepas evaluadas. Mientras que el extracto de *L. graveolens* fue activo contra *C. jejuni* ATCC® 33291 y *C. coli* UVG 62-1769-9. En tanto que el extracto de *P. Jacquemontianum* inhibió a *C. jejuni* ATCC® 33291, y *T. lucida* a *C. coli* UVG 62-1769-9 (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad inhibitoria *in vitro* de extractos metanólicos de doce especies condimentarias, alimenticias y medicinales contra cepas de *Campylobacter*, utilizando la técnica de difusión en disco^a

Espece vegetal	Parte utilizada	<i>C. jejuni</i> ATCC® 33291 mm ^b	<i>C. jejuni</i> UVG 62-1773-6 mm	<i>C. coli</i> UVG 62-1769-9 mm
<i>E. foetidum</i>	Hoja	<6.0	<6.0	<6.0
<i>C. grandifolia</i>	Hoja	<6.0	<6.0	<6.0
<i>F. pandurata</i>	Flor	<6.0	<6.0	<6.0
<i>L. alba</i>	Hoja	10.0 ^c	10.0 ^c	9.0 ^c
<i>L. chiapasensis</i>	Hoja	<6.0	<6.0	<6.0
<i>L. graveolens</i>	Hoja	8.0 ^c	<6.0	10.0 ^c
<i>O. micranthum</i>	Hoja	<6.0	<6.0	<6.0
<i>P. dioica</i>	Fruto	<6.0	<6.0	<6.0
<i>P. auritum</i>	Hoja	<6.0	<6.0	<6.0
<i>P. Jacquemontianum</i>	Hoja	8.0 ^c	<6.0	<6.0
<i>P. guajava</i>	Hoja	<6.0	<6.0	<6.0
<i>T. lucida</i>	Hoja y tallo	<6.0	<6.0	8.0 ^c
Eritromicina (0.60µg)	-----	24.0	24.0	24.0
Metanol (control negativo)	-----	<6.0	<6.0	<6.0

Fuente: Datos experimentales

^a Los discos poseen un diámetro de 6mm y una concentración de 200µg/mL

^b mm milímetros. Cada valor es un promedio de cinco repeticiones independientes

^c Actividad inhibitoria significativa (p=0.0312)

La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos con los aceites esenciales. *L. graveolens* presentó actividad contra las tres cepas del estudio. *C. jejuni* ATCC® 33291 presentó resistencia a los aceites esenciales de *P. Jacquemontianum* y *P. guajava*. *C. coli* UVG 62-1769-9 fue resistente al aceite esencial de *T. lucida*. *C. jejuni* UVG 62-1773-6 fue resistente a la mayoría de aceites esenciales evaluados.

Tabla 5. Actividad inhibitoria *in vitro* de aceites esenciales de doce especies condimentarias, alimenticias y medicinales contra cepas de *Campylobacter*, utilizando la técnica de difusión en disco^a

Especie vegetal	Parte utilizada	<i>C. jejuni</i> ATCC® 33291 mm ^b	<i>C. jejuni</i> UVG 62-1773-6 mm	<i>C. coli</i> UVG 62-1769-9 mm
<i>L. alba</i>	Hoja	22.0 ^c	<6.0	21.0 ^c
<i>L. chiapasensis</i>	Hoja	17.0 ^c	<6.0	13.0 ^c
<i>L. graveolens</i>	Hoja	15.0 ^c	10.0 ^c	25.0 ^c
<i>O. micranthum</i>	Hoja	18.0 ^c	<6.0	18.0 ^c
<i>P. dioica</i>	Fruto	27.0 ^c	<6.0	19.0 ^c
<i>P. auritum</i>	Hoja	15.0 ^c	<6.0	15.0 ^c
<i>P. Jacquemontianum</i>	Hoja	<6.0	<6.0	12.0 ^c
<i>P. guajava</i>	Hoja	<6.0	<6.0	9.0 ^c
<i>T. lucida</i>	Hoja y tallo	13.0 ^c	<6.0	<6.0
Eritromicina (0.60µg)	-----	23.0	24.0	26.0
Metanol (control negativo)	-----	<6.0	<6.0	<6.0

Fuente: Datos experimentales

^a Los discos poseen un diámetro de 6mm y una dosis de 10µL

^b mm-milímetros. Cada valor es un promedio de cinco repeticiones independientes

^c Actividad inhibitoria significativa (p=0.0312)

Luego de realizar la fase de tamizaje, se procedió a determinar la CIM de las especies vegetales con probable actividad, esta concentración permite obtener datos más precisos de las propiedades antimicrobianas.

Los resultados indican que el extracto diclorometánico de *T. lucida* presentó una CIM de 100µg/mL sobre la cepa de *C. jejuni* UVG 62-1773-6. Mientras que el resto de extractos demostraron la misma concentración inicial evaluada en la fase de tamizaje (200µg/mL) (Tabla 6).

Tabla 6. CIM de extractos diclorometánicos y metanólicos que presentaron actividad anti *Campylobacter* en la fase de tamizaje

Especie vegetal	Extracto	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
		ATCC® 33291 µg/mL	UVG 62-1773-6 µg/mL	UVG 62-1769-9 µg/mL
<i>L. alba</i>	MeOH	200	200	200
<i>L. graveolens</i>	CH ₂ Cl ₂	>200	>200	200
	MeOH	200	>200	200
<i>P. Jacquemontianum</i>	MeOH	200	>200	>200
<i>T. lucida</i>	CH ₂ Cl ₂	200	100 ^a	>200
	MeOH	>200	>200	200

Fuente: Datos experimentales

^a Actividad inhibitoria significativa (p=0.0312)

En tanto que la CIM de aceites esenciales mostró que *L. graveolens*, *O. micranthum* y *P. dioica* fueron activos a una dosis <1.25µL, un valor menor que el resto de los aceites esenciales en las tres cepas estudiadas (Tabla 7).

Tabla 7. CIM de aceites esenciales que presentaron actividad anti *Campylobacter* en la fase de tamizaje

Especie vegetal	<i>C. jejuni</i>		<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>	
	ATCC® 33291		UVG 62-1773-6		UVG 62-1769-9	
	µL	Ø ^a	µL	Ø	µL	Ø
<i>L. alba</i>	5.0 ^b	8.0	>10.0	<6.0	5.0 ^b	7.0
<i>L. chiapasensis</i>	5.0 ^b	7.0	>10.0	<6.0	10.0	13.0
<i>L. graveolens</i>	<1.25 ^b	8.0	<1.25 ^b	7.0	<1.25 ^b	9.0
<i>O. micranthum</i>	<1.25 ^b	7.0	>10.0	<6.0	<1.25 ^b	7.0
<i>P. dioica</i>	<1.25 ^b	7.0	>10.0	<6.0	<1.25 ^b	8.0
<i>P. auritum</i>	10.0	15.0	>10.0	<6.0	10.0	15.0
<i>P. Jacquemontianum</i>	>10.0	<6.0	>10.0	<6.0	10.0	12.0
<i>P. guajava</i>	>10.0	<6.0	>10.0	<6.0	10.0	9.0
<i>T. lucida</i>	10.0	13.0	>10.0	<6.0	>10.0	<6.0

Fuente: Datos experimentales

^a Diámetro de halos de inhibición

^b Actividad inhibitoria significativa (p=0.0312)

IX. DISCUSIÓN

Para los extractos diclorometánicos, la hoja de *P. auritum* presentó mayor rendimiento con 20.46% y la flor de *F. pandurata* con 1.06% fue la de menor rendimiento. De los extractos metanólicos, la hoja de *L. chiapasensis* presentó el mayor rendimiento, con 15.96%, mientras que la hoja de *C. grandifolia* la de menor rendimiento con 2.31%.

En el caso de los aceites esenciales, la hoja de *L. graveolens* presentó el mayor rendimiento con 3.08%, mientras que la hoja de *P. guajava* fue la de menor rendimiento con 0.20%.

Los extractos diclorometánicos que presentaron actividad inhibitoria significativa ($p=0.0312$, según el valor establecido en el análisis estadístico), contra *Campylobacter* fueron *L. graveolens* y *T. lucida*. El diclorometano permite obtener compuestos con determinadas características químicas por su naturaleza apolar, dichos compuestos pertenecen al grupo de terpenoides, resinas y aceites, los cuales presentan actividad bactericida atacando la membrana celular a través de la bicapa lipídica, desencadenando una serie de acciones que causan la destrucción bacteriana (88).

Los extractos metanólicos de *L. alba*, *L. graveolens*, *P. Jacquemontianum* y *T. lucida* fueron los que presentaron actividad inhibitoria significativa ($p=0.0312$). El metanol es un disolvente polar que permite extraer la gran mayoría de sustancias naturales de interés tales como, los alcaloides, flavonoides, terpenos, taninos, saponinas, entre otros. En general, la acción bactericida de estas sustancias es formar canales iónicos tanto en la membrana como en la pared celular, aumentando la permeabilidad de la misma, permitiendo la entrada de compuestos químicos presentes en este extracto (88).

Los extractos de *L. chiapasensis* y *L. graveolens* (etanólicos), fueron evaluados con anterioridad en la búsqueda de actividad anti *C. jejuni*, sin embargo no se encontró actividad alguna (58, 59). En el presente estudio, fue evidente la actividad inhibitoria significativa ($p=0.0312$) de *L. graveolens* en ambos extractos (diclorometánico y metanólico) (Tabla 3 y 4). Esta discrepancia, se explica primeramente, por la polaridad de los disolventes utilizados para la preparación de los extractos. Segundo, por la

composición de cada especie vegetal que varía de acuerdo al origen, la especie y el órgano de la planta, las condiciones climáticas y de crecimiento. Y tercero, el método utilizado para evaluar la actividad antimicrobiana, el volumen del inóculo, el medio de cultivo utilizado, pH del medio, temperatura, condiciones de microaerofilia y el tiempo de incubación. Cabe resaltar que en los estudios mencionados y en este, se utilizó la misma técnica (difusión en disco), pero puede variar entre ensayos, por la naturaleza del extracto que impide la difusión uniforme de las sustancias incluidas a través del medio, diferencias en el crecimiento bacteriano y la solubilidad en sí del extracto.

Los aceites esenciales presentaron mayor actividad inhibitoria, comparada con la de los extractos diclorometánicos y metanólicos. Además, puede observarse que los halos de inhibición producidos por los aceites esenciales fueron considerablemente de mayor tamaño. Esto coincide con otros estudios, que indican que los aceites esenciales son constituyentes que poseen una fuerte actividad inhibitoria, sobre una amplia variedad de microorganismos.

Los aceites esenciales se caracterizan por ser una mezcla compleja de varios compuestos pertenecientes a hidrocarburos (compuestos terpénicos), alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y fenoles. La naturaleza antimicrobiana de los aceites esenciales aparentemente está relacionada con su alto contenido de compuestos fenólicos. Asimismo, su actividad puede estar relacionada con la configuración estructural de sus constituyentes y su grupo funcional y posibles interacciones sinérgicas entre sus componentes. Por lo que la actividad biológica no se puede atribuir a un compuesto en particular (89).

Una característica fundamental de los aceites esenciales y sus componentes es su "hidrofobicidad", la cual le permite distribuirse en los lípidos de la membrana celular y mitocondrial, alterando su estructura y haciéndolas más permeables lo que desencadena una serie de procesos entre los que se mencionan, degradación de la pared celular, interacción con su composición y destrucción de la membrana citoplásmica, daño a las proteínas de membrana, causando una fuga de iones y componentes celulares, coagulación del citoplasma, daño en los mecanismos enzimáticos para la producción de energía y el metabolismo, lo que lleva finalmente a la muerte celular (4).

A pesar de la naturaleza apolar del aceite esencial de *T. lucida* y la posible presencia de este en el extracto diclorometánico, no se encontró correlación en ambos. Únicamente entre el extracto de *L. graveolens* y su aceite esencial. Indicando que no necesariamente los compuestos extraídos entre uno u otro tienen actividad inhibitoria, o porque durante el proceso de hidrodestilación ocurren reacciones que modifican la composición química del aceite esencial.

La CIM se define como la menor concentración de un compuesto que inhibe el crecimiento de microorganismos. Los aceites esenciales de *L. graveolens*, *O. micranthum* y *P. dioica* mostraron una CIM $<1.25\mu\text{L}$, resaltando que la actividad inhibitoria de *L. graveolens* sobre las tres cepas evaluadas fue significativa ($p=0.0312$). Diversas investigaciones realizadas sobre esta especie vegetal, han demostrado actividad inhibitoria sobre una variedad de microorganismos entre los que se mencionan a *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. enterica*. Dicha actividad se atribuye principalmente a la acción antimicrobiana del carvacrol y timol, compuestos químicos muy similares estructuralmente, presentes en este aceite esencial, que tienen un grupo hidroxilo en diferente posición del anillo fenólico (Anexo 3). La mezcla de los dos, en cantidades apropiadas da un efecto aditivo sobre la inhibición total, aumentando la permeabilidad de la membrana celular, lo que afecta la integridad de la misma, perjudicando además la homeostasis y el equilibrio de iones inorgánicos (90).

De las tres cepas evaluadas, se encontró que *C. jejuni* UVG 62-1773-6 fue más resistente a los extractos y aceites esenciales, una explicación, es que muchas bacterias se adecuan a las condiciones ambientales a las que son expuestas. Un ejemplo de ello es que algunas cepas bacterianas son capaces de tolerar altas concentraciones de sustancias, estos mecanismos no se conocen con detalle, aunque una posibilidad, es que modifiquen la membrana externa de la envoltura celular, activando los sistemas para remover los compuestos tóxicos que las afectan. Otra explicación, es que esta cepa bacteriana haya desarrollado resistencia en el hospedero de donde fue aislada, y posea factores de virulencia que no están presentes en las cepas restantes. Estudios en el campo de la microbiología, han revelado que los microorganismos son extremadamente ingeniosos para superar la amenaza contra agentes químicos, lo que las hace multiresistentes (91).

Un estudio paralelo a este, realizado en 2010, utilizando extractos de las mismas especies vegetales contra *L. monocytogenes*, demostró actividad inhibitoria significativa ($p=0.0312$) del extracto diclorometánico de *E. foetidum* y *T. lucida*, a una concentración de 200 μ g, siendo esta última similar a la presente investigación. Mientras que los extractos metanólicos no presentaron actividad, comparado con este estudio, donde *L. alba*, *L. graveolens*, *P. Jacquemontianum* y *T. lucida* si presentaron actividad inhibitoria significativa ($p=0.0312$) contra *Campylobacter*, a una concentración de 200 μ g/mL. En cuanto a los aceites esenciales se demostró actividad inhibitoria significativa ($p=0.0312$) de *L. alba*, *L. graveolens* y *P. dioica*, a una dosis de 6 μ L (92), en comparación con este, las nueve especies de las que se obtuvo aceite esencial, presentaron actividad a diferentes dosis (Tabla 7).

Con los resultados obtenidos se demuestra que las especies vegetales que presentaron actividad inhibitoria significativa ($p=0.0312$), especialmente los aceites esenciales, pueden ser utilizadas como una alternativa natural, en respuesta a la demanda que actualmente el consumidor tiene frente al uso de conservadores artificiales, para la preservación de alimentos. Este tema ha sido de gran interés en los últimos años, y para el cual se han realizado varias investigaciones en la búsqueda de nuevas vías para inhibir el crecimiento de microorganismos, manteniendo la calidad, frescura y seguridad de los alimentos.

Tomando en cuenta que en la población guatemalteca, las especies vegetales incluidas en esta investigación, son conocidas popularmente y utilizadas para la preparación de alimentos, ya que son adicionadas en una amplia variedad de comidas para sazonar y dar un sabor característico, asimismo son empleadas en la medicina tradicional, por lo que se sugiere incluirlas en investigaciones futuras, que aporten datos para su aplicación en el desarrollo de novedosos sistemas para la preservación de alimentos, y de esta forma se permita ofrecer productos seguros, naturales y de calidad.

X. CONCLUSIONES

1. El extracto diclorometánico de *L. graveolens* presentó actividad inhibitoria significativa ($p=0.0312$) contra *C. jejuni* ATCC® 33291 y *C. coli* UVG 62-1769-9 a una concentración de 200µg/mL, mientras que *T. lucida* inhibió a *C. jejuni* UVG 62-1773-6 a una concentración de 100 µg/mL.
2. Los extractos metanólicos de *L. alba*, *L. graveolens*, *P. Jacquemontianum* y *T. lucida*, mostraron actividad inhibitoria significativa ($p=0.0312$) a una concentración de 200µg/mL, en las cepas evaluadas.
3. Los aceites esenciales de *O. micranthum* y *P. dioica* mostraron una CIM <1.25µL sobre *C. jejuni* ATCC® 33291 y *C. coli* UVG 61-1769-9, indicando que estos fueron los de mayor capacidad inhibitoria.
4. El aceite esencial de *L. graveolens* mostró ser más efectivo contra las tres cepas bacterianas evaluadas, al mostrar una CIM <1.25µL, lo que permite proponer a esta especie en futuros programas de aprovechamiento para diferentes usos y aplicaciones.
5. Se encontró que *C. jejuni* UVG 62-1773-6 presentó multiresistencia a los extractos y aceites esenciales evaluados.
6. Esta investigación encontró actividad inhibitoria del extracto diclorometánico de *T. lucida* y los aceites esenciales de *L. graveolens* y *P. dioica*, al igual que la reportada contra *Listeria* sp.

XI. RECOMENDACIONES

1. Continuar con la búsqueda de la actividad biológica anti *Campylobacter*, y de esta manera realizar una base de datos, para conocer las especies vegetales que puedan utilizarse con fines médicos o a nivel industrial.
2. En vista del potencial y la actividad antimicrobiana encontrada en el aceite esencial de *L. graveolens*, se recomienda su aplicación en productos fitofarmacéuticos y alimenticios, para optimizar la calidad de los mismos.
3. Realizar estudios biológicos y fitoquímicos introduciendo otras variables como, colecta en diferentes épocas del año, altitud y diferentes condiciones climáticas, para comprobar la actividad biológica.
4. Realizar estudios fitoquímicos y farmacológicos de los aceites esenciales y extractos que presentaron actividad, para reafirmar y ampliar la información acerca de su capacidad bactericida.
5. Evaluar las propiedades antioxidantes de las especies vegetales que presentaron actividad, ya que se ha reconocido que la presencia de estos, fortalece la actividad antimicrobiana de las mismas.
6. Efectuar estudios adicionales del extracto diclorometánico de *T. lucida*, y los aceites esenciales de *L. graveolens* y *P. dioica*, ya que estas especies presentaron actividad contra *Campylobacter* y *Listeria* sp, y de esta manera permitan ser integrados como una propuesta de aprovechamiento en la industria farmacéutica y alimenticia.
7. Evaluar las mismas especies vegetales incluidas en esta investigación, utilizando otras metodologías, considerando a este un microorganismo fastidioso, que permita determinar cuál es la más indicada para realizar este tipo de investigaciones.

XII. REFERENCIAS

1. WHO. 2002. Food safety and foodborne illness. Geneva, Switzerland: World Health Organization fact sheet 237.
2. Herrera FC., García-Rico RO. Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario. *Bistua* 2006; 4:13-19.
3. Draughon FA. Bioconservadores botánicos en alimentos. *Mundo láctico y cárnico*. Agosto 2006. 18p.
4. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Intern J Food Microbiol* 2004; 94:223-253.
5. Hammer Ka. Carson CF., Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* 1999; 86:985-990.
6. Muller G. Especies y condimentos. En *microbiología de los alimentos vegetales*. 3 ed. España: Acribia, 1989. (p.150-153).
7. Griffiths PL., Park RW. *Campylobacters* associated with human diarrhoeal disease. *J Appl Bact* 1990; 69:281-301.
8. Koneman EW. *et al.* Diagnóstico Microbiológico. 5 ed. Buenos Aires: Panamericana, 1999. 1432p.
9. Biberstein LE., Cheng Zee Y. *Tratado de microbiología veterinaria*. 2 ed. España: Acribia, 1990. 686p.
10. Newell D. The ecology of *Campylobacter jejuni* in avian and human host and in the environment. *Inter J Infect Dis* 2002; 6:16-19.
11. Oberhelman RA., Taylor DN. *Campylobacter* infections in developing countries. In: Nachamkin I, Blaser MJ, editors. *Campylobacter*, 2 ed. Washington: American Society for Microbiology, 2000. 402p.
12. Blaser MJ. *et al.* *Campylobacter* enteritis: clinical and epidemiologic features. *Ann Intern Med* 1979; 91:179-185.
13. *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. Manual de la OIE sobre animales terrestres. 2004. (p.1150-1160). Disponible en www.oie.int/esp/normes/mmanual
14. Altekruuse SF. *et al.* *Campylobacter jejuni* -An emerging foodborne pathogen. *Emerg Infect Dis* 1999; 5:80-87.

15. Pumarola A. *et al.* Microbiología y Parasitología Médica. 2 ed. España: Masson S.A., 1987. 934p.
16. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Manual de procedimientos *Campylobacter*. Argentina. 2001. 29p.
17. Cruz JR. *et al.* Infection, diarrhea and dysentery caused by *Shigella* species and *Campylobacter jejuni* among Guatemalan rural children. *Pedia Infect Dis* 1994; 13:216-223.
18. Cruz JR. *et al.* Etiología de diarrea aguda en infantes de áreas marginales de Guatemala. Memorias del III Congreso Nacional de Microbiología. Guatemala 1986. 54p.
19. Balocos A., William J., Hausler J. Bacterial, mycotic and parasitic infections. 6 ed. Washington: American Public Health Association, 1991 (p.301-309).
20. Fernández H., Farace MI. Manual de procedimientos, diagnóstico de *Campylobacter* en muestras clínicas y alimentos. Universidad Austral de Chile e Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de Argentina. 2003.
21. Penner JL., Hennessy JN. Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subs. *jejuni* on the basis of soluble, heat-stable antigens. *J Clin Microbiol* 1980; 12:732-737.
22. Fernández H., García A., Villanueva MP. Serotipos de *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* aislado en carne de ave para consumo humano y en muestras de heces de niños con diarrea. *Arch Med Vet* 2005; 37:79-81.
23. Nielsen EM., Engberg J., Madsen M. Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Danish patients, poultry, cattle and swine. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997; 19:47-56
24. Rozynek E. *et al.* Prevalence of potencial virulence markers in polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses. *J Med Microbiol* 2005; 54:615-619.
25. Figueroa MC. Comparación por ribotipia de cepas de *Campylobacter jejuni*, aisladas de niños de Guatemala y de visitantes extranjeros. Guatemala : Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2007. 74p.
26. Butzler JP., Glupczynky Y., Goossens H. *Camylobacter* and *Helicobacter* infections. *Curr Opin Infect Dis* 1992; 5:80-87.

27. Mishu Allos B. *Campylobacter jejuni* infectious: update on emerging issues and trends. Clin Infect Dis 2001; 32:1201-1206.
28. Kapperud G. *et al.* Clinical features of sporadic *Campylobacter* infections in Norway. Scand J Infect Dis 1992; 24:741-749.
29. Skirrow MB. *et al.* *Campylobacter* bacteraemia in England and Wales 1981-1991. Epidemiol Infect 1993; 110:567-573.
30. Allos BM. Association between *Campylobacter jejuni* infection and Guillain-Barré syndrome. J Infect Dis 1997; 5:125-128.
31. Allos BM. Serotype, serum resistance and ¹²³I-C3 binding among *C. jejuni* strains from patients with Guillain-Barré syndrome or with uncomplicated enteritis. Emerg Infect Dis 1998; 4:263-268.
32. Yuki N. Infectious origins of, and molecular mimicry in, Guillain-Barré and Fisher syndromes. Lancet Infect Dis 2001; 1:29-37.
33. Ang CW. Ganglioside mimicry of *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharide determines antiganglioside specificity rabbits. Infect Immun 2002; 70:5081-5085.
34. Trachoo M. *Campylobacter jejuni*: An emerging pathogen. J Sci Tech 2003; 25:141-157.
35. Torres ME. *et al.* Etiology of children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: associated pathogens and unusual isolates. J Clin Microbiol. 6 ed. USA: ASM Press, 1995, 1773p.
36. Murray PR. *et al.* Manual of Clinical Microbiology. 6 ed. USA: ASM Press, 1995. 1773p.
37. Bolton FJ., Hutchinson DN., Parker G. Reassessment of selective agars and filtration techniques for isolation of *Campylobacter* species from faeces. Eur J Clin Microbiol 1988; 7:155-160.
38. Engberg J. *et al.* Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: resistance and mechanisms and trends in human isolates. Emerg Infect Dis 2001; 7:24-34.
39. Smith KE. *et al.* Quinolone resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992-1998. N Engl J Med 1999; 340:1525-1532.
40. Unicomb L. *et al.* Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* absent from isolates, Australia. Emerg Infect Dis 2003; 9:1482-1483.

41. 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. 139p.
42. Domingo D., López-Brea M. Plantas con acción antimicrobiana. Rev Esp Quimioter 2003; 16:385-393.
43. Dixon RA. Natural products and plant disease resistance. Nature. 2001; 411:843-837.
44. Schindler G. *et al.* Urinary excretion and metabolism of arbutin after oral administration of *Arctostaphylos uvae ursi* extract as film-coated tablets and aqueous solution in healthy humans. J Clin Pharmacol 2002; 42:920-927.
45. Cichewicz RH., Thorpe PA. The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. J Ethnopharmacol 1996; 52:61-70.
46. Miskovsky P. Hypericin –A new antiviral and antitumor photosensitizer: Mechanism of action and interaction with biological macromolecules. Curr Drug Targets 2002; 3:55-84.
47. Cruz JM. *et al.* Antioxidant and antimicrobial effects of extracts form hydrolysates of lignocellulosic materials. J Agric Food Chem 2001; 49:2459-2464.
48. Yildirim A. *et al.* Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea* Desf ex DC) sage (*Salvia triloba* l) and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. J Agric Food Chem 2000; 48:5030-5034.
49. Huerta B. Aceites esenciales en el control de las patologías aviares. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. 8p.
50. Font Quer P. Diccionario de Botánica. España: Lobos S.A., 1982. 1243p.
51. Mitscher LA., Darker S., Gollapudi A. A modern look at folkloric use of anti infective agents. J Nature 1987; 5:1025-1041.
52. Tegos G. *et al.* Multidrug puma inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. Antimicrob Agents Chem 2002; 46:3133-3141.
53. Smith-Palmer., Stewart J., Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Lett Appl Microbiol 1998; 26:118-122.

54. García M., Solís L., Heredia N., García S. Efecto de extractos metanólicos de plantas comestibles sobre el crecimiento de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. Congreso Internacional Inocuidad Alimentaria 2005. (p. 1).
55. Graniel MJ., Sánchez E., Heredia N., García S. Extractos de especias y condimentos contra el crecimiento de *Campylobacter coli* y *Campylobacter jejuni*. Congreso Internacional Inocuidad Alimentaria 2005. (p. 1).
56. 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.
57. Alvarado CF. Búsqueda de actividad contra *Campylobacter jejuni* en cinco plantas de uso popular Guatemalteco. Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2007. 49p.
58. 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. 60p.
59. Ordóñez EJ. Determinación de la actividad inhibidora *in vitro* de nueve plantas Guatemaltecas sobre *Campylobacter jejuni*, utilizando el método de difusión en disco. Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2007. 69p.
60. Comisión del Codex Alimentarius, Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación, propuesta para la elaboración de una norma regional para el culantro coyote, septiembre 2008. 6p.
61. Ramcharan C. "Culantro: A much utilized, little understood herb" perspectives on new crops and new uses. ASHS Press. 1999. (p.506-509)
62. Gibson D. *Verbenaceae*. Flora of Guatemala. USA: Fieldiana Botany V24 1970. p196-197.
63. Tejeda S. Estudio etnobotánico de las plantas medicinales de 6 comunidades del municipio de San Juan Chamelco del departamento de Alta Verapaz. Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación. Facultad de Agronomía) 2003.

64. Dieseldorff I. Las plantas medicinales del departamento de Alta Verapaz. Guatemala: Tipografía Nacional, 1977.
65. Gibson DN. Flora of Guatemala. USA: Fieldiana Botany. V24 1970. p209-210.
66. Aguilar J. Relación de unos aspectos de la flora útil de Guatemala. 2 ed. Guatemala: Tipografía Nacional Guatemala, 1966. 383p.
67. Martínez M. Plantas útiles de la flora mexicana. México: Botas, 1959. 621p
68. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: Universitaria, 1996. 402p.
69. Correa A., Ming L., Scheffer M. Cultivo de medicinales, condimentares e aromáticas. Brasil: FUNEP-UNESP, 1994. 151p.
70. Standley PC., Williams LO. Flora of Guatemala. USA: Chicago Natural History Museum Fieldiana Botany. V24 1970. 236p.
71. Hernández-Arteseros JA. *et al.* Composition of the essential oil of *Lippia chiapasensis* Loes. J Essent Oil Res. 2006; 18:6-9.
72. Germosén L. Farmacopea Vegetal Caribeña. 2 ed. México: UNAN-León, Universitaria. 2005. 486p.
73. Aguilar JM., Aguilar MA. Árboles de la Biósfera Maya Petén: Guía para las especies del Parque Nacional Tikal. Guatemala, Guatemala: Universidad de San Carlos, Centro de Estudios Conservacionistas (CECON) 1992. 272p.
74. Méndez LF. *et al.* Guauhitemala lugar de bosques. Guatemala: Asociación Becaria Guatemalteca-UWC. Vol. V, 1996. (p.172)
75. Vélez F. Plantas Alimenticias de Venezuela. Venezuela: Fundación Brigott, Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. 1990. 277p.
76. Asociación Bioltas. Plantas Medicinales Utilizadas por los Itzaes San José Petén. Guatemala, 2001. 118p. (p. 75).
77. Morton JF. Atlas of medicinal plants of Middle America. Springfield: Charles C. Thomas, 1981. 1420p.
78. Poll E. Etnobotánica garífuna. Guatemala: H y R Impresores. 2005. 129p.
79. Nash DL., Williams LO. Flora of Guatemala. Chicago: Field Museum of Natural History. 1976.
80. Lot A., Chiang F. Manual de herbario. Administración y manejo de colecciones, técnicas de recolección y preparación de ejemplares botánicos. Consejo Nacional de la Flora de México. México: 1992. 142p.

81. Argueta A. *et al.* Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. México: Instituto Nacional Indigenista. México, 1994. 583p.
82. Arvigo R. Rainforest remedies, one hundred healing herbs of Belize. USA: Lotus Press, 1993. 336p.
83. Phalow M. El gran libro de las plantas medicinales. 5 ed. España: Everest, 1985. 427p.
84. Figueroa H. Enfermedades de los conquistadores. Guatemala: Universitaria, 1983. 174p.
85. Girón LM. *et al.* Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the caribs of Guatemala. J Ethnopharmacol 1991; 34:173-187
86. Manual de Operaciones. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales. PEO extracción fraccionada, PEO concentración usando rotavapor, PEO extracción de aceites esenciales por Neoclevenger. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC. 2005. (p. 1-2, p. 1-3, p. 1-3).
87. PEO No. 9 Tamizaje de la actividad anti-*Campylobacter jejuni*. Laboratorio de Bioensayos. Departamento de Citohistología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC. 2005. 6p.
88. Cowan M. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 1999; 12:564-582
89. Maguna F., Romero A., Garro A., Okulik N. Actidad antimicrobiana de un grupo de terpenoides. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste (Resumen).
90. Lambert RJ. *et al.* A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano oil, thymol and carvacrol. J Appl Microbiol 2001; 91:453-462.
91. Levy SB. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. J Appl Microbiol 2002; 92:65-71
92. Álvarez RA. *et al.* Determinación de actividad inhibitoria *in vitro* de extractos diclorometánicos y metanólicos y aceites esenciales de doce especies condimentarias y medicinales guatemaltecas contra *Listeria monocytogenes*. Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2010. 81p.

ANEXOS

ANEXO 1
Características Bioquímicas de *Campylobacter*

Tabla 1. Características bioquímicas de especies de *Campylobacter* termotolerantes

	<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
	jejuni	Doyle			
Hidrólisis del hipurato	+	+	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+
Producción de catalasa	+	+	+	+	-/d
Reducción de nitratos	+	-	+	+	+
Producción de SH ₂	-	-	-/d	-	-
R. Ac. Nalidíxico	S	S	S	R	S
R. cefalotina	R	V	R	R	S
Indoxil acetato	+	+	+	-	+
TTC	S/d		S	S	
Glicina 1%	+	+	+	+	V

S: sensible R: resistente d: débil V: variable TTC: cloruro trifeníl tretazolium

Fuente: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Manual de Procedimientos *Campylobacter*. Argentina. 2001

ANEXO 2

Tabla 2. Componentes mayoritarios de algunos aceites esenciales con propiedades antibacterianas

Major components of selected ^a EOs that exhibit antibacterial properties				
Common name of EO	Latin name of plant source	Major components	Approximate % composition ^b	References
Cilantro	<i>Coriandrum sativum</i> (immature leaves)	Linalool	26%	(Delaquis et al., 2002)
		E-2-decanal	20%	
Coriander	<i>Coriandrum sativum</i> (seeds)	Linalool	70%	(Delaquis et al., 2002)
		E-2-decanal	–	
Cinnamon	<i>Cinnamomum zeylandicum</i>	Trans-cinnamaldehyde	65%	(Lens-Lisbonne et al., 1987)
Oregano	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol	Trace-80%	(Lawrence, 1984; Prudent et al., 1995; Charai et al., 1996; Sivropoulou et al., 1996; Kokkini et al., 1997; Russo et al., 1998; Daferera et al., 2000; Demetzos and Perdetzoglou, 2001; Marino et al., 2001) (Daferera et al., 2000, 2003; Pintore et al., 2002)
		Thymol	Trace-64%	
		γ -Terpinene	2–52%	
		p-Cymene	Trace-52%	
Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i>	α -pinene	2–25%	(Marino et al., 2001)
		Bornyl acetate	0–17%	
		Camphor	2–14%	
		1,8-cineole	3–89%	
Sage	<i>Salvia officinalis</i> L.	Camphor	6–15%	(Marino et al., 2001)
		α -Pinene	4–5%	
		β -pinene	2–10%	
		1,8-cineole	6–14%	
		α -tujone	20–42%	
Clove (bud)	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol	75–85%	(Bauer et al., 2001)
		Eugenyl acetate	8–15%	
Thyme	<i>Thymus vulgaris</i>	Thymol	10–64%	(Lens-Lisbonne et al., 1987; McGimpsey et al., 1994; Cosentino et al., 1999; Marino et al., 1999; Daferera et al., 2000; Juliano et al., 2000)
		Carvacrol	2–11%	
		γ -Terpinene	2–31%	
		p-Cymene	10–56%	

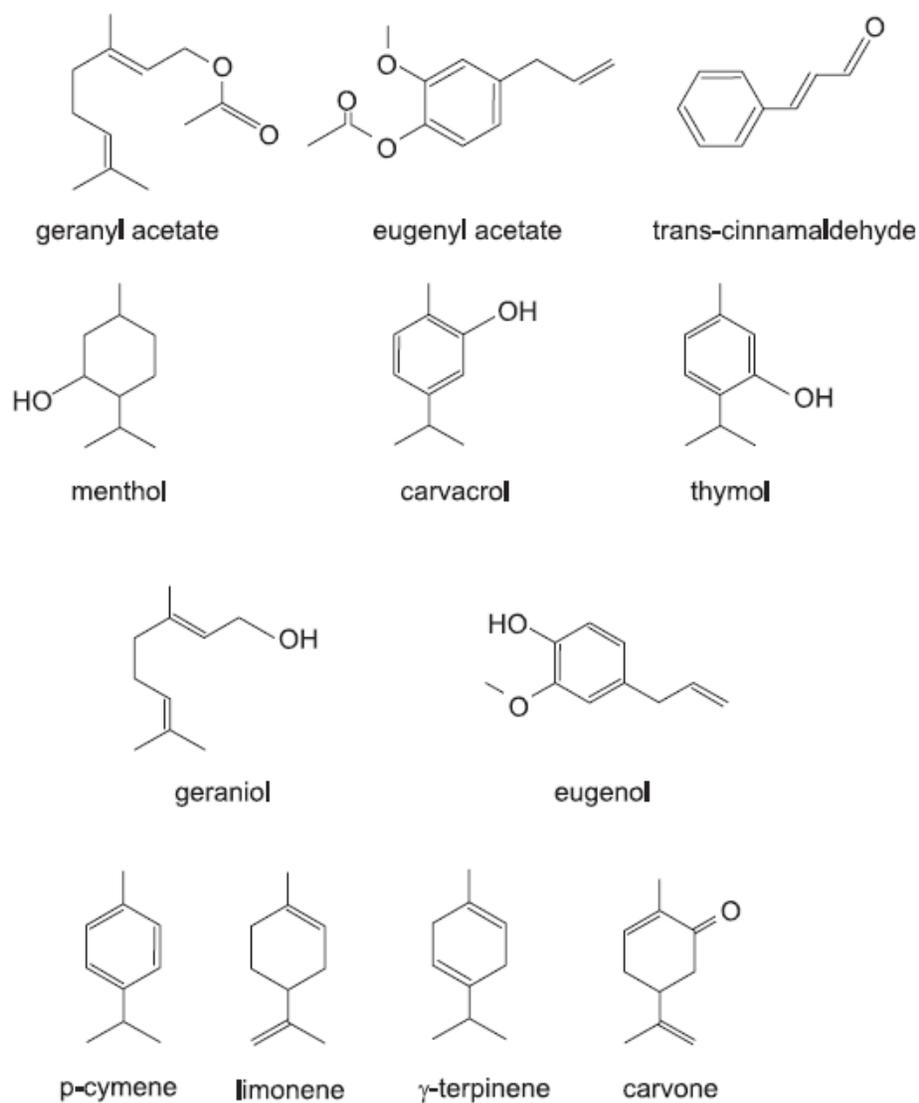
^a EOs which have been shown to exert antibacterial properties in vitro or in food models and for which the composition could be found in the literature.

^b Percentages of total volatiles rounded up to the nearest whole number.

Fuente: Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. Internat J Food Microbiol 2004; 94:223-253

ANEXO 3

Figura 1. Fórmula estructural de algunos componentes presentes en aceites esenciales



Fuente: Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. Internat J Food Microbiol 2004; 94:223-253

ANEXO 4

Tabla 3. Información general de las especies vegetales estudiadas

Familia	Especie vegetal	No. De herbario	Lugar de colecta	Georeferencia	Altura msnm**	Propiedades
Apiaceae	<i>Eryngium foetidum</i>	1110	Ecoparcela El Kakawatal Samayac Suchitepéquez	N14° 33'05.8" W91° 27'59.6"	465	Condimento Medicinal
Apocynaceae	<i>Fernaldia pandurata</i>	1152	Gualán, Zacapa	N15° 06'55.73" W89° 21'40.20"	691	Condimento
Asteraceae	<i>Tagetes lucida</i>	1127	Cuatro Caminos San Cristóbal Totonicapán	N14°55'05.70" W91°26'31.64"	2400	Medicinal
Lamiaceae	<i>Ocimum micranthum</i>	1064	Ecoparcela El Kakawatal Samayac Suchitepéquez	N14° 33'06.1" W91° 28'01.0"	465	Condimento Medicinal
Lamiaceae	<i>Psidium guajava</i>	1169	Ecoparcela El Kakawatal Samayac Suchitepéquez	N14° 36' 7.14" W91° 28' 2.22"	468	Medicinal
Myrtaceae	<i>Pimenta dioica</i>	1171	Salamá, Baja Verapaz	N 14°33'7.9" W 91°28'2.6"	471	Condimento Medicinal
Piperaceae	<i>Piper auritum</i>	1170	Ecoparcela El Kakawatal Samayac Suchitepéquez	N14° 33'6.8" W91° 28'0.7"	470	Medicinal
Piperaceae	<i>Piper jacquemontianum</i>	1098	Ecoparcela El Kakawatal Samayac Suchitepéquez	N14° 33'05.4" W91°27'57.2"	462	Medicinal
Verbenaceae	<i>Cornutia grandifolia</i>	04706*	San Juan Chamelco Alta Verapaz	N15°25'26.05" W90°19'41.23"	1368	Medicinal
Verbenaceae	<i>Lippia alba</i>	1131	CEDA Facultad de Agronomía, USAC	N14° 34.811' W90° 33.220'	1465	Medicinal
Verbenaceae	<i>Lippia chiapasensis</i>	43411*	Paraje Juchanep Totonicapán	N14° 56.106' W91° 22.259'	2570	Medicinal
Verbenaceae	<i>Lippia graveolens</i>	1132	CEDA Facultad de Agronomía, USAC	N14° 34.811' W90° 33.220'	1465	Condimento Medicinal

CEDA: Centro Experimental Docente de Agronomía

*No. de herbario perteneciente al Herbario de la Escuela de Biología (BIGU), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

El resto pertenece al herbario de Farmaya, S.A.

**msn: Metros sobre el nivel del mar