

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

EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA EN *Campylobacter jejuni* DE
EXTRACTOS DE: *Equisetum giganteum*, *Mentha spicata*, *Litsea guatemalensis*, *Thymus
vulgaris*, *Apium graveolens* e *Hibiscus sabdariffa*

Vera Lucía Velásquez Ordóñez

Química Bióloga

Guatemala, junio de 2011

ÍNDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	2
III.	ANTECEDENTES	4
	A. Antecedentes históricos	4
	B. Clasificación	4
	C. Epidemiología	5
	D. Características microbiológicas y bioquímicas	6
	E. Patogenicidad	7
	F. Ciclo de infección	8
	G. Sintomatología	8
	H. Diagnóstico	9
	I. Tratamiento	12
	J. Resistencia a antibióticos	12
	K. Uso de plantas para tratamiento de enfermedades gastrointestinales	13
	1. <i>Equisetum giganteum</i>	17
	2. <i>Mentha spicata</i>	21
	3. <i>Litsea guatemalensis</i>	25
	4. <i>Thymus vulgaris</i>	27
	5. <i>Apium graveolens</i>	32
	6. <i>Hibiscus sabdariffa</i>	34
IV.	JUSTIFICACIÓN	39
V.	OBJETIVOS	40
VI.	HIPÓTESIS	41
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	42
VIII.	RESULTADOS	49
IX.	DISCUSIÓN	51
X.	CONCLUSIONES	53
XI.	RECOMENDACIONES	54
XII.	REFERENCIAS	55
XIII.	ANEXOS	64

I. RESUMEN

Campylobacter jejuni es el agente causal de la mayoría de gastroenteritis bacteriana en niños menores de 5 años y pacientes inmunosuprimidos. Las condiciones especiales para el crecimiento de la bacteria han dificultado su estudio en relación a otros enteropatógenos. Sin embargo, su importancia clínica y el incremento de la tasa de resistencia a los antibióticos de *C. jejuni*, hacen necesaria la búsqueda constante de agentes con propiedades antimicrobianas, siendo las plantas un excelente recurso para ello.

El presente estudio evaluó la actividad inhibitoria contra *Campylobacter jejuni* (cepa ATCC 33291) con las siguientes plantas: *Equisetum giganteum* (Cola de Caballo), *Mentha* . (Hierbabuena), *Litsea guatemalensis* (Laurel), *Thymus vulgaris* (Tomillo), *Apium graveolens* (Apio) e *Hibiscus sabdariffa* (Rosa de Jamaica).

Para evaluar la actividad antibacteriana, se realizó un bioensayo basado en la técnica de difusión en agar, que consistió en enfrentar a la bacteria con los diferentes extractos de plantas (aceites y etanólicos), mediante discos impregnados por los mismos, utilizando agar Columbia-sangre. Para validar el método utilizado se realizó una curva de susceptibilidad a eritromicina, sometiendo a la bacteria a diferentes concentraciones de la misma.

El estudio fue experimental de diseño completamente aleatorizado. Los resultados mostraron que no existe efecto inhibitorio contra la cepa ATCC 33201 de *C. jejuni*, en los seis extractos de plantas estudiados ($p > 0.05$), concluyéndose que ninguna de las plantas empleadas en este estudio inhibe el crecimiento de *C. jejuni*.

II. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas constituyen una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial entre niños pequeños y pacientes inmunodeprimidos. Las consecuencias más graves de la diarrea son deshidratación y desnutrición, que pueden incluso ocasionar la muerte. Usualmente los cuadros de diarrea empeoran por la aplicación retardada del tratamiento. Este retraso suele ser debido a la falta de conocimientos sobre factores ambientales, la epidemiología, los agentes causales y a prácticas inadecuadas. La causa más común de diarreas es infecciosa (1).

Campylobacter jejuni es el agente causal de la mayoría de gastroenteritis bacteriana en Estados Unidos y su incidencia es considerable en países en vías de desarrollo, superando a las shigelosis. En la mayoría de personas la infección producida por *C. jejuni* es autolimitada y se resuelve en 3 a 7 días, por lo que generalmente no se recomienda tratamiento antibiótico. Sin embargo en pacientes menores de 5 años y pacientes con algún grado de inmunodeficiencia, la infección puede ser severa, siendo necesaria la aplicación de terapia antimicrobiana con antibióticos tales como: eritromicina, tetraciclina y ciprofloxacina. No obstante, el uso indiscriminado de éstos, ha provocado el desarrollo y aumento de resistencia de *C. jejuni* a dichos antibióticos (2).

Investigaciones realizadas alrededor del mundo han demostrado la actividad antimicrobiana de extractos de plantas utilizados popularmente para el tratamiento de infecciones gastrointestinales provocadas por microorganismos enteropatógenos.

En Guatemala en 2005 fue iniciada la búsqueda del poder inhibitorio contra *C. jejuni* en diversas plantas utilizadas por la población para el tratamiento de enfermedades diarreicas, así como en plantas que han mostrado alguna actividad antimicrobiana. Sin embargo, no ha sido encontrada acción alguna después de haber estudiado más de veinte plantas.

En el presente estudio se pretendió seguir con la búsqueda de actividad inhibitoria contra *C. jejuni* en las siguientes plantas: *Equisetum giganteum* (Cola de Caballo), *Mentha spicata* (Hierbabuena), *Litsea guatemalensis* (Laurel), *Thymus vulgaris* (Tomillo), *Apium graveolens* (Apio) e *Hibiscus sabdariffa* (Rosa de Jamaica). Dichas plantas son cultivadas en Guatemala, siendo algunas de ellas utilizadas popularmente para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales en la población. La mayoría de éstas son consumidas en alimentos como condimentos o en la preparación de bebidas. Estudios publicados refieren que todas estas plantas pueden ser utilizadas para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales contra diferentes agentes etiológicos (3, 4, 5).

Para la determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* se aplicó el método de difusión en agar, utilizando la cepa ATCC 33291 de *C. jejuni*, enfrentada a los extractos etanólicos y aceites esenciales de las especies vegetales propuestas.

III. ANTECEDENTES

A. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El microorganismo clasificado actualmente como *Campylobacter jejuni* fue descubierto en 1931 por Jones y col., como agente causal de la disentería invernal del ganado bovino. Pasaron veintiséis años antes de que King describiera un grupo de bacilos curvos móviles, microaerófilos, aislados de sangre de niños con disentería aguda, denominados entonces “relacionados con vibriones”, por ser similares en muchos aspectos al *Vibrio fetus*. King mencionó que los vibriones aislados a partir de la sangre de los niños podían estar estrechamente relacionados con el microorganismo descrito como *V. jejuni* por Jones en 1931, y que era factible que la importancia del microorganismo como causa de síndromes diarreicos de la infancia de etiología desconocida, fuera mayor que lo que se creía (6).

Esa fue una declaración profética; no obstante, pasaron otros 15 años antes de que esta asociación fuera confirmada por el laboratorio. En 1972, Dekeseyer y col., aislaron los “relacionados a vibriones” a partir de heces de pacientes con enteritis aguda, mediante una técnica de filtración que permitía que los pequeños bacilos curvos atravesaran la membrana, pero que retenía los microorganismos fecales más grandes. Se sucedieron varios trabajos que asociaban los “relacionados a vibriones” (*V. fetus* subespecie *jejuni*; *C. jejuni*) con la gastroenteritis humana, con distribución en todo el mundo (6).

B. CLASIFICACIÓN

Mediante una variedad de técnicas moleculares, que incluyen hibridación de ADN-ARNr, análisis de secuencia de ARN ribosomal 16S (ARNr) y análisis de inmunotipificación, se ha determinado que todas las especies del género *Campylobacter*, pertenecen al mismo grupo filogenético denominado superfamilia VI de ARNr. Actualmente se incluyen cinco géneros en la superfamilia: *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, *Wolinella* y *Flexispira* (6, 7).

En la actualidad se conocen 13 especies de *Campylobacter*: *C. fetus* subesp. *fetus*, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. laridis*, *C. pyloridis*, *C. concisus*, *C. sputorum* subesp. *sputorum*, las cuales han sido relacionadas con el hombre, y *C. sputorum* subesp. *bulbulus*, *C. mucosalis*, *C. nitrofigilis*, *C. hyointestinalis*, *C. cryaerofil* y *C. fetus* subesp. *veneralis* (6, 8).

C. EPIDEMIOLOGÍA

C. jejuni subespecie *jejuni* es el patógeno del ser humano más importante de las campilobacterias. Tiene distribución mundial, y se le recupera a partir de 4 – 35% de muestras de materia fecal de pacientes con enfermedad diarreica aguda. Se encuentra en animales domésticos. La ingestión de leche cruda, de carnes de aves cocidas en forma parcial, o agua contaminada es la fuente habitual de infección humana. Los estudios con pollos, patos y ganado bovino han demostrado que hasta 50 – 100% de los grupos de estos animales excretan *C. jejuni* (2, 6 – 7).

Se calcula que *C. jejuni* causa unos dos millones de casos de gastroenteritis o campilobacteriosis con diarrea en Estados Unidos. De todos los tipos de bacteria, *C. jejuni* es la principal causa de diarrea a nivel mundial y la segunda causa más común en los Estados Unidos. En general, los niños menores de un año, los adolescentes y los adultos jóvenes son los más afectados (7, 8, 9).

La incidencia del campilobacteriosis en pacientes VIH-infectados es más alta que en la población en general (1).

La Organización Mundial de la Salud estima que, cada año, en los países en vías de desarrollo (África y América Latina), se presentan 1 300 millones de episodios de diarrea en niños menores de cinco años, los cuales ocasionan cuatro millones de decesos, lo que ubica a la diarrea entre las principales causas de muerte en estos países (10).

En Latinoamérica la frecuencia relativa de aislamiento de *Campylobacter* sp en gastroenteritis aguda es de 5-20% y en Chile, en estudios efectuados hace 20 años, ocupaba el tercer lugar entre las diarreas agudas de causa bacteriana en niños menores de 2 años de edad (10).

En Guatemala, según la OMS la tasa de aislamiento en niños menores de cinco años es de 12.1%. En una investigación realizada en el municipio de Santa María de Jesús en el Departamento de Sacatepéquez durante los años 1988 a 1989 se reporta como causante del 12.1% de niños con diarrea y del 7% de las disenterías. En las áreas marginales de la ciudad de Guatemala, se le reporta en el 9.5% de los niños con diarrea. Torres MF, lo reporta como la causa del 10% de las diarreas en niños menores de 5 años; y Torres OR y colaboradores lo reportan como el causante del 5.6% de diarreas en áreas urbano-marginales de Guatemala (11 – 13).

D. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS

Campylobacter es una bacteria curva espiralada microaerófila (5% de oxígeno) y capnofílica (10% de CO₂), que además necesita 85% de nitrógeno. Se moviliza por medio de un flagelo no envainado único, polar. Su tamaño es pequeño (0.3 – 0.6 µm de largo y 0.5 – 5 µm ancho). No fermenta ni oxida, y obtiene energía de la utilización de aminoácidos e intermediarios de cuatro y seis carbonos del ciclo de Krebs. Habita en una amplia variedad de nichos ecológicos y medios ambientales, tales como en animales (ganado bovino, porcinos), produciendo infertilidad y aborto (6 - 9).

C. jejuni tiene una temperatura óptima de crecimiento de 42°C, por lo que es práctica habitual en el laboratorio la incubación a esta temperatura con el fin de facilitar su aislamiento selectivo. Su velocidad de desarrollo es más lenta que la de las bacterias de la microbiota normal entérica, por lo que para su aislamiento a partir de materias fecales se requieren medios de cultivo selectivos que inhiban esta microbiota (7, 8).

Campylobacter muestra una gran diversidad serotípica; se han identificado por lo menos 90 serotipos en base a antígeno somático (O) y más de 50 serotipos en base a los antígenos capsulares y flagelares; estos últimos pueden experimentar variación de fase (7).

E. PATOGENICIDAD

En *C. jejuni* se han detectado adhesinas, enzimas citotóxicas y enterotoxinas que se supone son las responsables de la patogenicidad. Segrega una toxina antigénicamente similar a la toxina del cólera. El período de incubación es de 2 – 10 días. Invade el epitelio del intestino delgado causando inflamación. Los microorganismos mueren cuando se exponen a los jugos gástricos, por lo que las situaciones que disminuyen o neutralizan la secreción de ácidos gástricos favorecen la enfermedad. El daño al huésped y las manifestaciones clínicas dependen principalmente de dos factores: el inóculo ingerido y el estado inmunológico del huésped (7, 8, 15).

Aunque se ha demostrado en voluntarios que *Campylobacter* es capaz de producir síntomas de diarrea con dosis tan bajas como 500 bacterias, la enfermedad es infrecuente si este inóculo es menor a 10. El principal mecanismo de patogenicidad es la invasión de la mucosa intestinal, en forma similar a como lo hace *Shigella*. La invasión de la lámina propia se observa tanto a nivel del intestino delgado como del colon, y el resultado es generalmente una enterocolitis inespecífica, que puede incluir los siguientes hallazgos: degeneración y atrofia glandular, pérdida de la producción de mucus, abscesos de las criptas, y ulceración de la mucosa epitelial. En otros casos, las características patológicas son similares a las observadas en infecciones por *Salmonella* o *Shigella*. Parece evidente que el lipopolisacárido de la pared bacteriana, con actividad endotóxica típica, desempeña un rol central en el daño inflamatorio (7, 15).

Aunque se ha reconocido una toxina termo-lábil similar a la de *Vibrio cholerae* y varias citotoxinas, la producción in vivo e *in vitro* de éstas parece de bajo nivel por lo que se duda que tenga alguna significación en la patogenia. Se cree que *Campylobacter* puede jugar un papel en el Síndrome de Guillain-Barré por un mecanismo que involucraría la similitud entre el ácido siálico de algunos antígenos O y los gangliósidos humanos (15).

F. CICLO DE INFECCIÓN

La enteritis tiene un período de infección de 2 – 5 días, aunque puede llegar a ser de 2 -11 días, suele ser autolimitante y el período prodrómico puede durar desde pocas horas a pocos días, caracterizándose por manifestaciones inespecíficas: dolor de cabeza, fiebre, anorexia, mialgias y artralgias (7).

El período diarreico o agudo es caracterizado por la aparición de diarrea profusa, que se acompaña de dolor abdominal, malestar y fiebre. Las heces son líquidas o acuosas y pueden contener sangre (7).

G. SINTOMATOLOGÍA

La enteritis producida por este microorganismo es caracterizada por dolor abdominal, cólico, diarrea sanguinolenta, escalofríos y fiebre. La diarrea puede derivar en deshidratación, la cual debe ser controlada. Los signos de deshidratación son: sed, irritabilidad, cansancio, somnolencia, ojos hundidos, boca y lengua secas, piel seca y disminución de la frecuencia de excreción urinaria, y (en bebés) un pañal seco durante varias horas. En la mayoría de personas la infección es autolimitada y se resuelve en 3 a 7 días. Los pacientes convalecientes pueden continuar excretando el microorganismo en su materia fecal durante dos semanas a un mes. A veces el dolor abdominal aparenta ser un síntoma más significativo que la diarrea. La infección podría confundirse con una apendicitis o un problema de páncreas (6, 14, 15).

Aunque la enteritis y síndromes diarreicos aun son las manifestaciones más frecuentes, en los últimos años han surgido otras enfermedades producidas por *Campylobacter*. Se publicaron casos de artritis séptica, meningitis y proctocolitis, producidos por *C. jejuni*. En el presente hay varias comunicaciones que aseguran la aparición del Síndrome de Guillain Barré (SGB) posterior a una infección por *C. jejuni*. El SGB es una enfermedad desmielinizante aguda de los nervios periféricos. Los datos provenientes de estudios serológicos y cultivo muestran que 20 – 40% de pacientes con SGB se infectaron con *C. jejuni* entre 1 y 3 semanas antes de la aparición de síntomas neurológicos. Sin embargo no se ha demostrado relación entre la gravedad de los síntomas gastrointestinales y la probabilidad de desarrollar SGB, incluso infecciones asintomáticas con desencadenar SGB (6, 14, 16).

De acuerdo a un estudio realizado por Jeremy H. Rees y col., el 26% de los pacientes muestreados (96 pacientes), presentaron *C. jejuni* como antecedente de SGB. Muchos de estos pacientes presentaron infección asintomática (16).

La campilobacteriosis también se asocia al síndrome de Reiter, una artropatía reactiva. En el aproximadamente 1% de pacientes con campilobacteriosis, el proceso ocurre de 7 – 10 días después del inicio de la diarrea (1).

Tanto GBS y el síndrome de Reiter se puede deber a respuestas autoinmunes estimuladas por la infección. Muchos pacientes con el síndrome de Reiter presentan el marcador antigénico de HLA B27 (1).

H. DIAGNÓSTICO

1. Identificación presuntiva en heces

Es posible hacer un diagnóstico presuntivo de enteritis por *Campylobacter* si se observan las características: formas curvas, Gram negativo, en forma de S, en ala de gaviota o en

largas espirales en preparados teñidos con Gram, realizados a partir de heces diarreicas. En algunos laboratorios es una práctica habitual examinar primero los preparados en fresco o frotis teñidos de todas las muestras diarreicas en busca de leucocitos polimorfonucleares y formas bacterianas que sugieran especies de *Campylobacter*. En algunos laboratorios, las muestras para diagnóstico de *Campylobacter* no son procesadas a menos que se encuentren leucocitos polimorfonucleares. La base racional de esta práctica es que es improbable que se recuperen especies de *Campylobacter* en muestras carentes de leucocitos (6, 8, 16).

2. Métodos de aislamiento en el laboratorio

El aislamiento exitoso de *C. jejuni* a partir de heces depende de la utilización de medios selectivos (por ejemplo, Campy-Thio, Campy-BAP), de la incubación a temperaturas altas (42°C) y de la atmósfera de incubación adecuada (5% de O₂, 10% de CO₂ y 85% de N₂). Se ha informado que una técnica de filtración utilizada con placas de medios sólidos no selectivos es tan eficaz como el uso de medios con antibióticos para el aislamiento de *C. jejuni*. Este método posee la ventaja de permitir el aislamiento de especies de *Campylobacter* sensibles a antibióticos (6).

En la mayoría de los laboratorios clínicos se utiliza el medio selectivo de Butzler, el de Blazer (Campy-BAP) y el agar sangre de Skirrow. Merino y col., encontraron que el medio para *Campylobacter* de Preston, libre de sangre y con cefoperazona, proporcionaba la mayor cantidad de aislamientos de *C. jejuni*. Kormali y col., hallaron que un medio selectivo libre de sangre basado en carbón (CSM), compuesto por una base de agar Columbia, con carbón activado, hematina, piruvato de sodio, cefoperazona, vancomicina y cicloheximida, es más selectivo que el medio Skirrow, y tiene una tasa de aislamiento más elevada de *C. jejuni* a partir de cultivos mixtos. El carbón activado, la hematina, el sulfato ferroso y el piruvato de sodio funcionan como sustitutos de sangre en medios de desarrollo para campilobacterias (6, 7).

Los hisopos rectales o muestras tomadas con hisopo a partir de las muestras de materia fecal pueden sembrarse directamente en una pequeña superficie de alguno de los medios sólidos selectivos recomendados. Las muestras de materia fecal formadas, también pueden ser procesadas emulsionando una pequeña porción en amortiguador de fosfato o en caldo antes de sembrar 1 ó 2 gotas en la superficie del agar con una pipeta Pasteur, en forma similar, pueden sembrarse de manera directa 1 ó 2 gotas de heces líquidas (6).

3. Identificación a partir de cultivos

La aparición de colonias en alguno de los medios salinos para *Campylobacter* que haya sido incubados a 42°C en el medio gaseoso descrito ya es una evidencia presuntiva que el microorganismo pertenece a alguna de las especies de *Campylobacter* termófilas. La morfología de las colonias de especies de *Campylobacter* en medios sólidos selectivos varía desde planas, grises, de forma irregular que pueden ser secas o húmedas, a colonias redondas y convexas, brillantes, de bordes enteros. Existe una tendencia de las colonias a formar un desarrollo confluyente a lo largo de las estrías en la superficie del agar. En agar sangre de carnero no se observan reacciones hemolíticas. La identificación puede ser confirmada mediante una reacción de catalasa y citocromooxidasa (*C. jejuni*, *C. coli*, y *C. lari* son positivos) (6).

Los preparados coloreados con Gram de las colonias de *C. jejuni* después de 24 – 48 horas de incubación en agar sangre, muestran las características gramnegativo en forma de “S”, ala de gaviota o largas espirales. Dado que las especies de *Campylobacter* suelen teñirse en forma débil, se ha adoptado la práctica de prolongar el tiempo de coloración con el colorante de contraste safranina, al menos 10 minutos, para obtener mayor intensidad de tinción. Asimismo, el agregado de medio gramo de fucsina básica por litro de safranina mejora la intensidad de la coloración de contraste (6, 8).

C. jejuni son las únicas que hidrolizan el hipurato, además son resistentes a cefalotina y susceptibles a ácido nalidíxico (6).

I. TRATAMIENTO

La gastroenteritis por *Campylobacter* es típicamente una infección autolimitada que se trata mediante la reposición de los líquidos y de los electrolitos que se han perdido. El tratamiento antibiótico se puede usar en los pacientes con infecciones graves o con septicemia. *Campylobacter* es sensible a una amplia variedad de antibióticos, como los macrólidos (p. ej., eritromicina, acitromicina y claritromicina), las tetraciclinas, los aminoglucósidos, cloranfenicol, fluoroquinolonas, clindamicina, amoxicilina/ácido clavulánico e imipenem. La mayor parte de las cepas es resistente a las penicilinas, las cefalosporinas y las sulfamidas. Eritromicina es el antibiótico de elección para el tratamiento de la enteritis, y las tetraciclinas o las quinolonas se administran como fármacos de segunda elección. En los niños pequeños se ha utilizado amoxicilina/ácido clavulánico en lugar de las tetraciclinas, que están contraindicadas. Las infecciones sistémicas se tratan con aminoglucósidos, cloranfenicol o imipenem (8, 14, 18).

En muchas ocasiones se prefieren las fluoroquinolonas (ciprofloxacina), ya que ésta es más eficaz a muchos de los patógenos entéricos. Sin embargo la resistencia a las fluoroquinolonas ha aumentado, por lo que estos fármacos pueden ser menos eficaces (8, 9, 14).

J. RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

La infección por *Campylobacter* no requiere tratamiento en la mayoría de los casos, pero en otros se recomienda la administración de agentes antimicrobianos como eritromicina o fluoroquinolonas, antibióticos a los cuales la bacteria presenta susceptibilidad natural a fluoroquinolonas. Sin embargo la tasa de resistencia ha ido en incremento, especialmente en países en vías de desarrollo, a causa del uso indiscriminado de los mismos (18).

Las fluoroquinolonas son frecuentemente prescritas para el tratamiento de diarrea, incluyendo la diarrea del viajero, ya que son efectivos contra las enterobacterias. Desde 1980, la resistencia de *Campylobacter* a fluoroquinolonas, se ha incrementado, especialmente en Europa. Los investigadores han propuesto la relación entre el uso de fluoroquinolonas en animales, aumentando la resistencia de *Campylobacter* a estas. En un estudio realizado en Irán (2004 – 2005), se comprobó el incremento de tasa de resistencia a fluoroquinolonas en un 62%. Un estudio realizado en Polonia (2003 – 2005), demostró que la resistencia a fluoroquinolonas es de 56% (2, 19, 20).

Según estudios realizados en el Departamento de Salud de Minnesota, demostraron una resistencia de *C. jejuni* a ácido nalidíxico y ciprofloxacina (del 1.3% a 10.2%) en los aislamientos obtenidos, en un período de 6 años (1992 a 1998). Dicha resistencia fue resultado del uso de estos antibióticos en el tratamiento de productos aviaros de uso doméstico (carne de pollo) (2).

K. USO DE PLANTAS PARA TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES

La utilización de sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades, incluidas las de etiología infecciosa, constituye en la actualidad un desafío en la medicina y se ofrece como una alternativa, especialmente en aquellas dolencias para las que no existe un tratamiento adecuado. Sin duda el reino vegetal es el que ofrece mayor variedad de sustancias potencialmente útiles aplicables en enfermedades humanas. Se han aislado alrededor de 12,000 compuestos procedentes de organismos vegetales y se estima que constituyen tan solo el 10% de los metabolitos secundarios. Un porcentaje importante posee cierta actividad frente a los microorganismos (21).

1. Sustancias con acción antimicrobiana procedentes de plantas

La aparición de bacterias multirresistentes a antibióticos, reacciones secundarias que éstos provocan, así como la necesidad de contar con nuevos medicamentos accesibles y efectivos, han motivado el estudio de las plantas como una alternativa terapéutica. En muchos productos sintetizados, se ha demostrado una sensibilidad *in vitro* de carácter antimicrobiano, con concentraciones mínimas inhibitorias altas, en comparación con los antimicrobianos utilizados convencionalmente (21, 22 – 24).

Los componentes activos en muchas plantas y especias son compuestos fenólicos y aceites esenciales. Los aceites esenciales son los compuestos antimicrobianos mayoritarios presentes en las especias. La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales puede ser el daño a los sistemas enzimáticos de la célula, incluyendo aquellos asociados con la síntesis y producción de compuestos estructurales (22).

Los aceites esenciales son productos obtenidos de materias primas naturales por destilación, habitualmente con agua o vapor. Los aceites esenciales consisten en mezclas de productos químicos, constituidos por terpenos. Las destilaciones por arrastre de vapor duran entre 3, 4 o más horas, según la planta que se trate, obteniéndose muy poca cantidad de esencia. Esto se debe a que el contenido en aceites de las plantas es bajo, y por ello hace falta destilar abundante cantidad para obtener un volumen que justifique el gasto de destilación. Los rendimientos suelen ser menores al 1%. Algunos inconvenientes de los aceites esenciales son que se oxidan fácilmente, no contienen antioxidantes naturales, se alteran fácilmente, son muy concentrados y por lo tanto son difíciles de dosificar, no se dispersan con facilidad, sobre todo en productos secos. Las ventajas son: higiénicos, exentos de bacterias, sabor suficientemente fuerte, calidad del sabor conforme con la materia prima, no colorea el producto, y es exento de enzimas y taninos (27).

2. Uso de plantas como opción terapéutica contra infecciones en Guatemala

Guatemala es un país que posee una amplia diversidad de flora, la cual es aprovechada por la población para uso alimenticio y medicinal entre otros. Las culturas autóctonas utilizan las plantas como opción terapéutica, desde tiempos remotos (28, 29).

Por lo menos 623 plantas se usan para tratamiento de infecciones en Guatemala, lo que ha motivado investigaciones para analizar los extractos de las mismas y comprobar la actividad *in vitro*, contra diversos patógenos. Hasta 1996 se había tamizado la actividad de 1022 extractos de 243 plantas, de las cuales el 19.5% mostró tener actividad contra las bacterias patógenas ensayadas (28, 29).

Dentro de las entidades que realizan estudios *in vitro* de plantas, se encuentran la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, Universidad del Valle de Guatemala, Centro de Estudios Mesoamericanos sobre Tecnología Apropriada –CEMAT- y el Laboratorio de Productos Naturales FARMAYA de Guatemala. Estas entidades se encargan de investigar efectos tóxicos, propiedades antibacterianas, antifúngicas y antiparasitarias de las plantas (3).

3. Búsqueda de actividad contra *Campylobacter jejuni* en plantas

Son varios los estudios realizados en plantas alrededor del mundo en busca de actividad contra agentes infecciosos causantes de enteritis, y especialmente contra *Campylobacter* spp. Ankli y col., como parte de un estudio etnofarmacológico, estudiaron 48 plantas, de las cuales *Piscidia piscipula*, *Jatropha gaumeri* y *Casimiroa tetrameria* mostraron una marcada actividad contra la bacteria *Helicobacter pylori*. Otros extractos activos fueron *Dorstenia contrajerva*, *Psidium sartoriaum*, *Microgramma nitida* y *Chrysophyllum mexicanum*. El extracto no polar de *J. gaumeri* presentó actividad contra *Bacillus cereus* (30).

La raíz de *Terminalia macroptera* es utilizada en Guinea Bissau y otros países de África occidental para el tratamiento de diversas infecciones. Se probó un extracto etanólico de la planta contra cien cepas de *Campylobacter* sp., encontrándose una CIM similar a cotrimoxazol y mayor a sulfametoxazol. La fermentación de Kombucha, un hongo de té fue investigado contra una variedad de microorganismos patógenos, entre ellos *Campylobacter*. Los resultados mostraron una buena actividad contra *Campylobacter jejuni* (31, 32).

Los aceites esenciales de *Zingiber cassumuna*, *Cinnamomum bejolghota*, *Mentha arvensis*, *Cymbopogon citratus* y *Ocimum basilicum* var. *citratum*, mostraron actividad inhibitoria contra *Salmonella* spp., *Escherichai coli* O157, *C. jejuni* y *Clostridium perfringens*, en un estudio realizado en Tailandia en 2004 (33).

En Malasia en 2008, se demostró un efecto inhibitorio de extractos metanólicos de *Zingiber officinale*, *Curcuma longa* y *Alpinia galanga* contra *E. coli*, *Salmonella enteriditis*, *C. perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *C. jejuni*, *Bacillus cereus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula anomala*, *Mucor mucedo* y *Candida albicans* (34).

En un estudio llevado a cabo en 2008 por Cwikla y col., los extractos de *Calendula officinalis*, *Matricaria recutita*, *Zingiber officinale*, *Salvia officinalis*, *Foeniculum vulgare* mostraron efecto inhibitorio contra *C. jejuni* (35).

Aslim y Yucel estudiaron el efecto bactericida de *Origanum minutiflorum* contra *Campylobacter* spp resistentes a ciprofloxacina. En dicho estudio se demostró que el aceite esencial de *O. minutiflorum* tiene una alta actividad bactericida contra *Campylobacter* spp resistentes a ciprofloxacina, por lo que dicho aceite esencial puede ser utilizado como un preservativo natural en las comidas, para evitar la Campilobacteriosis (36)

En Guatemala, Paz en 2005 utilizó extractos de 10 plantas utilizadas popularmente en el país para el tratamiento de gastroenteritis, en la búsqueda de actividad contra especies de *C. jejuni*. En dicho estudio no se encontró ninguna actividad en los mismos contra la bacteria. Álvarez en 2007 utilizó extractos de 5 plantas de clima cálido utilizadas popularmente en Guatemala para el tratamiento de infecciones gastrointestinales, en la búsqueda de actividad contra *C. jejuni*, sin obtener un resultado que demostrase la misma. Alvarado en 2007 utilizó 5 extractos etanólicos de plantas utilizadas popularmente para el tratamiento de infecciones gastrointestinales, en la búsqueda de actividad contra *C. jejuni*, sin encontrar actividad inhibitoria (37 - 39).

Las plantas seleccionadas para el presente estudio, tanto por su uso tradicional en el tratamiento de diarreas como por su actividad antibacteriana demostrada en otras especies enteropatógenas fueron: *Equisetum giganteum*, *Mentha spicata*, *Litsea guatemalensis*, *Thymus vulgaris*, *Apium graveolens* e *Hibiscus sabdariffa*, las cuales no han sido investigadas por su actividad bactericida contra *C. jejuni*.

Se utilizarán aceites esenciales por las ventajas mencionadas anteriormente. En el caso de *Equisetum giganteum* e *Hibiscus sabdariffa* se utilizarán extractos etanólicos, ya que no poseen aceites esenciales.

1. *Equisetum giganteum* L.

a. Nombres populares

Cola de caballo, barba de jolote, canutillo, carricillo (3, 40).

b. Partes usadas medicinalmente

Hojas y tallos (3, 40).

c. Familia

Equisetaceae

d. Descripción botánica

Son pteridofitas perennes, de tallo rollizo, hueco y cabezuelas con esporas. Tiene raíz expandida, tallo erecto, verde, 4 cm de grueso, hasta 9 m de altura, con 20 – 40 ranuras, unidas por placas barbadas en cada junta, ramas numerosas esparcidas. Ramas fértiles con 6 – 8 ranuras y una cabezuela conteniendo esporas. Estas plantas tienen ciclos de vida, alternando las fases gametofítica (haploide) y esporofítica (diploide) (3, 40).

e. Hábitat

Nativas de América. Crecen en lugares húmedos, arenosos y pantanosos, taludes, bordes de caminos, pedregales, hasta 2000 msnm (3).

f. Obtención

Crecen silvestres en regiones templadas, se obtiene por recolección, aunque hay pequeñas zonas manejadas. La propagación es por cortes del rizoma o esporas. Los tallos y hojas se usan frescos o secos. Se recolectan los tallos sanos estériles sin frutos, se secan a la sombra (3, 40).

g. Usos y propiedades medicinales

Usada desde la antigüedad, descrita en el *Pen Tsao* y por Dioscórides, es oficial en Europa desde el siglo XVI. Se usan indistintamente todas las especies del género. La decocción o maceración de tallo y hojas frescos o secos se usan por vía oral para tratar afecciones digestivas, respiratorias y genitourinarias (cistitis, disuria, flujo, gonorrea, hemorragia, inflamación, prostatitis, litiasis, vaginitis), astenia, anemia, gota, sobrepeso acompañado de retención de líquidos, epistaxis, metrorragias, dismenorrea, reumatismo, taquicardias e hipertensión (3, 40 – 47).

El cocimiento se usa tópicamente en lavados, enjuagues o cataplasmas para evitar la caída del cabello y en abscesos, alergia, heridas, quemaduras, úlceras (dérmicas, bucales o corneales), faringitis, vulvovaginitis, callosidades, urticaria, eccema, raspones y tinea (3, 46, 47).

Se le atribuye propiedad astringente, diurética, emoliente, hemostática, remineralizante y vulneraria. Por su actividad contra hongos fitopatógenos se usa para tratar flores de jardín, vegetales y frutales. El extracto es moluscocida y antiviral. El polvo de las plantas es insecticida (*A. aegypti*) (3).

h. Farmacología

La tintura de hojas no tiene actividad antimicrobiana. La decocción de hojas y el extracto clorofórmico son moderadamente diuréticos en forma similar a la hidroclorotiazida, con una marcada elevación en la excreción de sodio, potasio y cloruros y aumento del pH urinario. Se usa como diurético para limpiar el organismo de la intoxicación por plomo. El extracto butanólico induce en el conejo actividad relajante del músculo liso (3, 40).

En 16 pacientes con tensión premenstrual un extracto acuoso de *Equisetum giganteum* y *Z. mays* demostró resultados excelentes y buenos (79%), regularizando su leve hipertensión en una forma natural y segura (3).

i. Composición química

Contiene ácidos (aconítico, cafeico, ferúlico, hidroxibenzoico, silícico (3 – 16%), oxálico, málico, gálico, cumárico y vinílico), glucósidos saponínicos (equisetonina), flavonoides (galutolina, dihidroquercetina, equisetrina, naringenina), alcaloides (nicotina, palustrina), β - sitosterol, taninos, principios amargos, resina y sales minerales (sílice, potasio, oro y plata). La composición química de 5 especies de *Equisetum* indica que todas son muy similares (3, 42, 45).

La actividad diurética es moderada y se debe a las flavonas glicosiladas y saponinas; no se ha demostrado la hipótesis que el sílice y los derivados del ácido silícico promueven la curación de lesiones tuberculosas sangrantes del pulmón, el ácido silícico ha demostrado actividad insecticida y el sílice favorece la consolidación de fracturas. La palustrina es un alcaloide de espidina que podría ser el responsable de algunas de las actividades biológicas de la planta e incluso de su toxicidad (3, 40).

j. Farmacognosia

Los flavonoides y sales de potasio justifican su acción diurética. La abundancia de sales silícicas le confiere propiedades remineralizantes y contribuye al mantenimiento de la sustancia fundamental del tejido conjuntivo (colágeno) por los fibroblastos, aumentando la elasticidad de los tejidos. Aumenta las defensas inespecíficas del organismo. Por la abundancia de taninos, el equiseto es astringente (antidiarreico, hemostático por vasoconstricción local, cicatrizante) (41).

k. Indicaciones terapéuticas

Unas especies se encuentran en algunas de las farmacopeas. Es considerada por el FDA como una hierba de seguridad indefinida. Se distribuyen diversos preparados como infusión, extracto, tintura, tabletas y polvo para tratamiento alopático y homeopático (3).

Por su actividad astringente, antiséptica, diurética, hemostática y vulneraria su uso por vía oral está indicado en enuresis, enfermedad prostática, cistitis, incontinencia e infección urinaria, hematuria y uretritis. Por su propiedad antiséptica y cicatrizante se aplica a lesiones de la piel como llagas y úlceras (3, 43).

1. Estudios de actividad bactericida

En México, Graniel, *et al.*, realizaron un estudio sobre efecto bactericida contra *C. jejuni* y *Campylobacter coli*, de *Equisetum giganteum* (Cola de caballo). Dicho estudio se realizó con extractos metanólicos de la planta, encontrándose que ésta no ejerce un efecto bactericida contra ninguna de las dos bacterias anteriormente mencionadas. Sin embargo, se ha encontrado que esta planta ejerce efecto moluscocida y antiviral, además de actividad insecticida. Además, también se ha demostrado el efecto bactericida en bacterias tales como *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*. No existen estudios que demuestren la actividad del extracto etanólico de *Equisetum giganteum* contra *C. jejuni* (3, 25, 48, 49).

2. *Mentha spicata* L.

a. Nombres populares

Hierbabuena, albaina, arvino, menta dulce, pan sut, yerba buena (3).

b. Partes utilizadas

Hojas

c. Descripción botánica

Hierba aromática perenne, tallo rastrero cuadrangular, pubescente, 1 m de alto. Hojas verde brillante, sin peciolo, elíptico-oblongas, lanceoladas, ápice puntiagudo, 3 – 8 cm de largo, dentadas. Inflorescencias delgadas, flores funeliformes, 4 lóbulos, lavanda o rosada, brácteas delgadas, al final de las ramas. Presenta 4 semillas, aunque la mayoría son abortadas (3).

d. Hábitat

Origen desconocido posiblemente europeo, ampliamente naturalizada en lugares soleados, húmedos y templados de Europa y Norte América de 1500 – 2700 msnm (3).

e. Obtención

Cultivada en el Altiplano central en huertos y jardines familiares. Planta domesticada desde épocas remotas, su propagación y conservación es fácil, aunque su entrecruzamiento es muy frecuente, por lo que es difícil conservar especies puras. Requiere suelo profundo, húmífero y clima templado. Se propaga por estolones, que luego forman masas que se dividen para propagación; su crecimiento es rápido, se hacen dos cortes al año. Las hojas se colectan al máximo follaje antes de la floración, se separan del tallo y se secan a la sombra a no más de 35°C (3).

f. Usos y propiedades medicinales

Desde Dioscórides son utilizadas las mentas con fines aromáticos y medicinales. Se menciona en varios herbarios medievales, que demuestran que era cultivada en jardines de los conventos desde el siglo IX. La infusión o decocción de la planta se usa por vía oral para tratar afecciones digestivas (cólico, indigestión, diarrea, dispepsia, flatulencia, gastralgia, náusea), dismenorrea, reumatismo y neuralgia (3, 42, 46).

Tópicamente se usa en cataplasma y compresas para tratar abscesos, piodermia, reumatismo y tumores; en baños para desodorizar los pies, lavar heridas y raspones. La decocción de hojas se aplica en cataplasmas y baños para tratar cáncer, endurecimientos, tumores y úlceras (3, 46).

Se le atribuye propiedad analgésica, antiséptica, antiemética, calmante, carminativa, digestiva, diurética, emenagoga, espasmolítica, estimulante, estomáquica, expectorante, febrífuga, hipotensora y sudorífica (3).

Las hojas frescas se usan para condimentar ensaladas y ceviches, las hojas cocidas se usan para condimentar diversas comidas y el extracto para saborizar chicles y caramelos (3).

g. Farmacología

El extracto etanólico es activo contra *Streptococcus pyogenes* y *S. aureus*; la tintura es inactiva contra bacterias gramnegativo. El extracto etanólico es activo contra el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. El aceite esencial es antibacteriano. El extracto etéreo es activo contra *Ancylostoma duodenale* y *Strongyloides stercoralis*. El extracto acuoso tiene actividad contra herpesvirus tipo II (3, 50).

La infusión de hojas administrada por vía oral tiene una moderada actividad diurética en ratas. El extracto etanólico tiene actividad espasmolítica, calmante y carminativa (3).

h. Composición química

La composición es variable y compleja. El tamizaje fitoquímico demuestra alcoholes, ácidos orgánicos, derivados diterpénicos, flavonoides (timonina) y aceite esencial, compuesto de L-carvona (50 – 70%), L-limoneno (13 – 20%), felandreno, α -y β -pineno (2 – 5%), δ -pineno, mentol, β -bourboneno, cariofileno, 1,8-cineol, hidrato de trans sabineno, alcohol octílico, acetato de dihidrocarveol y cineol (2 – 4%) (3, 50).

Contiene importantes cantidades de ácido rosmarínico (4.3% del peso seco) y derivados hidroxicinámicos totales (6.5% de peso seco), que son responsables de su actividad antioxidante (3).

El aceite esencial se obtiene por destilación a vapor de hojas, es incoloro o ligeramente amarillo, contiene carvona (57 – 71%), soluble a 25°C en volúmenes iguales de etanol 80%. Es usado como saborizante y aromático, tiene propiedades carminativas y se usa ampliamente en la industria de pasta de dientes, lavados orales y gomas de mascar. Potencializa el efecto del barbiturato por administración IP en ratones y ejerce una acción depresora del SNC por aplicación externa en peces dorados (3, 50).

La carvona es un líquido incoloro, olor herbáceo, con ácido fuerte se isomeriza en carvacrol; se usa industrialmente para saborizar alimentos y bebidas, en productos de higiene oral, perfumería y cosmética; farmacológicamente se ha demostrado que tiene efecto espasmolítico, carminativo y estimulante (3).

i. Indicaciones terapéuticas

Es de uso oficial (plantas usadas como medicamentos) en algunos países, por lo que se encuentra en varias farmacopeas. Es considerada por la FDA como una hierba de uso seguro. Se comercializan productos fitofarmacéuticos como infusión, jarabe, tintura y extracto (3).

Por su actividad espasmolítica, carminativa y calmante está indicada en el tratamiento de afecciones gastrointestinales y dolores espasmódicos. El aceite esencial se recomienda para prevenir náusea y dolores espasmódicos. Tópicamente se usa como analgésico, anestésico y antipruriginoso (3).

j. Estudios sobre efectos bactericidas

Vaishnavi y col., realizaron un estudio, en el cual utilizaron especias y condimentos de consumo popular en la India, entre ellos el extracto acuoso de *Mentha spicata*, el cual demostró una inhibición disminuida frente a los enteropatógenos en estudio (*Salmonella typhi*, *Salmonella thypimurium*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *E. coli*, *Yersinia enterocolitica* y *Campylobacter jejuni*). En México se demostró actividad bactericida de extractos metanólicos de *Mentha spicata* contra *C. jejuni* y

C. coli. También se ha demostrado el efecto bactericida de extractos etanólicos contra *S. pyogenes* y *S. aureus*. Otros estudios han demostrado la actividad antibacteriana y antiparasitaria que tiene el aceite esencial de *M. spicata* (3, 4, 25, 51).

3. *Litsea guatemalensis* Mez.

a. Nombres populares

Laurel, Aguairel, laurelillo, spac-tz'é, sufricalla, zit Duch (3)

b. Familia

Lauraceae

c. Descripción botánica

Es un árbol de 6 m de alto, ramas delgadas, cafés. Hojas coriáceas, peciolo 1.5 cm de largo, elíptico-lanceoladas, 8 cm de largo, agudas en la base, lustrosas, glabras. Flores axilares, pedúnculo simple, solitarias, 15 mm de largo, 5 – 11 flores pequeñas de color amarillo verdoso; brácteas de involucreo deciduo, filamentos glabros. Los frutos son pequeños (7 – 9 mm de diámetro), redondos, negros, rodeados por una cúpula, y contienen semillas carnosas de sabor amargo y olor muy aromático (3, 5, 51).

d. Hábitat

Endémico de Guatemala, crece en bosques abiertos de pino y matorrales de 1500 – 3150 msnm; descrito en Chimaltenango, Guatemala, Jalapa, Sacatepéquez y Sololá. (3, 5).

e. Obtención

Se recolecta en los campos de crecimiento silvestre en regiones frías y montañosas del Altiplano del país. Es frecuente en el país, pero raramente se encuentra en forma abundante en una localidad determinada. Se propaga por semilla, no existen cultivos establecidos en el país. Florea de febrero a junio, las hojas y flores se colectan hacia finales de la floración y se secan a la sombra (3).

f. Usos y propiedades medicinales

El cocimiento o infusión de hojas por vía oral se usa para el tratamiento de afecciones respiratorias (amigdalitis, tos, tos ferina) y gastrointestinales (cólico), carencia de leche en la madre, mordeduras de perro y culebra e hinchazón. Tópicamente se usa en lavados y baños para cansancio, úlceras, piernas hinchadas y epilepsia; en sahumerios se usa para parálisis y en gargarismos para la inflamación de la garganta (3, 5, 42).

Se le atribuye propiedad aromática, antiséptica, astringente, balsámica, carminativa, emenagoga, emoliente, estimulante, espasmolítica, febrífuga y pectoral. Las hojas tienen uso como condimento para sazonar sopas, carnes y repostería (3, 5).

g. Farmacología

La tintura de hojas de *L. guatemalensis* no tiene actividad contra enterobacterias, pero tiene moderada actividad contra *C. albicans*, *Epidermophyton floccosum* y *Microsporium canis*. El extracto etanólico presenta actividad insecticida contra hormigas (3, 53).

h. Composición química

Tiene un aceite esencial rico en derivados terpénicos y glicéridos de los ácidos láurico, oleico, palmítico y linoleico. El tamizaje fitoquímico de *Litsea guatemalensis* indica en las hojas la presencia de alcaloides cuaternarios y no cuaternarios, saponinas, esteroides insaturados, cardenólidos, bufadienólicos,

flavonoides, leucoantocianinas, quercitina, estilbina, taraxon y aceite esencial que contiene limoneno y citral (3, 42, 53).

El aceite esencial de *L. guatemalensis* contiene 1,8-cineol (26%), α -terpineol (1%), linalol (10%), terpinen-4-ol (6%) y eugenol, además de 70 compuestos más. El aceite esencial tiene olor característico. La presencia del limoneno en el aceite esencial reduce la dismenorrea por inhibición de la biosíntesis de prostaglandina. En el fruto se encuentran ácidos como linoleico y oleico (3, 52, 54).

i. Indicaciones terapéuticas

No es de uso oficial, por lo que no se encuentra en ninguna farmacopea. Está indicado su uso en el tratamiento de anorexia, digestión lenta, espasmo gastrointestinal, meteorismo y bronquitis crónica. Para su uso tópico se recomienda la decocción en el tratamiento de estomatitis, faringitis y sinusitis, también puede ser usada como colutorio, gargarismo o compresa; en alcoholato o pomada se usa como antirreumático, pediculicida y parasiticida (3, 53).

j. Estudios sobre efectos bactericidas

En Colombia se realizó un estudio sobre los efectos bactericidas de extractos acuosos de laurel contra *E. coli*, *Salmonella spp*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *B. cereus*. En este estudio se pudo demostrar que la planta tiene efecto inhibitorio contra *S. aureus*, y en menor proporción contra *E. coli*, *Salmonella spp* y *B. cereus*. Sin embargo contra *P. aeruginosa* no se comprobó efecto inhibitorio (5).

4. *Thymus vulgaris* L.

a. Nombres populares

Tomillo, albar, tomello (3).

b. Familia

Lamiaceae

c. Descripción botánica

Hierba aromática perenne, 20 – 50 cm de alto, tallo ramificado, ligeramente leñoso. Las hojas son pequeñas (3 – 8 mm), abundantes, opuestas, obtusas, agudas, lanceoladas, sin cilios, con el peciolo o sus márgenes revueltos hacia abajo y blanquecinas por su envés. Flores terminales numerosas, agrupadas en la extremidad de las ramas, púrpura pálido, tubulares, bilabiadas, grupos de 2 – 3 florecitas; flores bisexuales de mayor tamaño, estambres protuberantes, femeninas más pequeñas. Semilla lisa ovalada (3, 55 - 57).

d. Hábitat

Nativa del Mediterráneo en alturas de 0 – 1800 msnm y del oeste de Asia entre 1500 – 4000 msnm, ampliamente cultivada en clima montañoso, templado y subtropical de América y el Caribe. Resiste bien las heladas y sequías, pero no el encharcamiento ni exceso de humedad ambiental. Se cultiva en el altiplano central y occidental en lugares secos y soleados (3, 56).

e. Obtención

Requiere suelo ligero, calcáreo y fértil, en suelo pesado y húmedo. La planta es menos aromática y se seca antes. Se propaga por semilla, germina el 90% en 16 días en oscuridad en suelo fino y limpio; o por división de plantas adultas que enraizadas se trasplantan, se deben fertilizar orgánicamente. Colectar ramas durante 4 – 6 años; para aceite esencial se procesa inmediatamente, para uso doméstico se seca a la sombra (3, 55).

f. Usos y propiedades medicinales

Según Font Quer, los grandes de la Antigüedad no llegaron a conocer el tomillo, porque es planta que apenas alcanza Grecia, propia de España y países mediterráneos occidentales. Dioscórides ya lo prescribía, entró en las farmacopeas en el siglo XVI como parte de preparados galénicos; Plinio lo recomendaba como antídoto para mordeduras de serpientes (3).

La infusión de hojas por vía oral se usa para tratar afecciones digestivas y respiratorias (amigdalitis, asma, bronquitis, resfrío, ronquera, tos), anemia, diabetes, fiebre, gota, reumatismo, desórdenes uterinos, neuralgia y ciática; el vino se toma contra cáncer y tumores. Por vía tópica se aplica para cicatrizar heridas; en enema para las lombrices, en baño para la debilidad de los niños y reumatismo, en enjuague para la halitosis y gingivitis; los lavados se aplican en eccema, quemaduras, psoriasis y tineas; las cataplasmas, emplastos y ungüentos se aplican en cáncer, induraciones, tumores, úlceras y verrugas (3, 44, 46).

Se le atribuye propiedad antiséptica, antitusiva, carminativa, colerética, depurativa, desodorante, digestiva, diurética, emenagoga, espasmolítica, estimulante, expectorante, secretolítica, sudorífica, tónica y vermífuga. Tópicamente es antiséptica, cicatrizante, emoliente, vulneraria y aumenta el flujo sanguíneo del área. Se cultiva en huertos como planta para sazonar comidas y preservar carnes, en la industria alimenticia y cosmética se usa por su olor y sabor (3, 58).

g. Farmacología experimental y clínica

El extracto de hojas inhibe *S. aureus*. El aceite esencial es activo contra *Corynebacterium diphtheriae*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Streptococcus pneumoniae* y *S. pyogenes*, tiene efecto fungistática y fungicida contra *M. canis* y *Microsporium gypseum*. También se ha demostrado que tiene efectos contra *Trypanosoma cruzi* (3, 54, 59).

El extracto aumenta la secreción bronquial, es espasmolítico y expectorante, aunque no es antiinflamatorio en el edema inducido en la oreja del ratón (3).

Existen múltiples estudios sobre el uso de preparaciones con extracto de tomillo o timol, por su propiedad antiséptica y desinfectante para afecciones respiratorias y dermatomucosas. Un meta-análisis demostró efectividad similar a las drogas de síntesis en el tratamiento de afecciones respiratorias (3, 47).

h. Composición química

La planta contiene aceite esencial (1 – 2%), saponinas triterpenoides, flavonoides (derivados de apigenina y luteolol), ácido ursólico y cafeico, resinas y amargos. El aceite esencial es muy heterogéneo en cuanto a sus componentes, contiene: timol (44%), p-cimeno (15 – 50%), alcanfor (11 – 16%), carvacrol, borneol, limoneno, linalol, α - y β -pineno, citral, mirceno, α -felandreno, 1,8-cineol, geraniol, β -cariofileno y otros compuestos volátiles. Tiene propiedad antiespasmódica, carminativa, antiséptica, aperitiva, eupéptica, colerética, antitusiva y expectorante (3, 44, 55 - 58).

La actividad antiséptica y antihelmíntica se atribuye al timol, carvacrol y flavonoides. El carvacrol y timol tienen actividad neuro y musculotrópica por reducción de la disponibilidad de Ca^{+2} ; tiene una débil actividad relajante de la tráquea, que no depende de la excitación de receptores β_2 , el valor terapéutico depende de los polifenoles del aceite. La actividad broncoespasmolítica es producida por flavonoides (timonina, cirsilineol) según se demuestra en tráquea de cobayo (3, 44).

Los flavonoides le dan propiedad diurética. Contiene moderada cantidad de ácido rosmarínico, eriodictol y derivados hidroxicinámicos, responsables de su actividad antioxidante, además de otros flavonoides que inhiben la producción de superóxido (3, 44).

i. Indicaciones terapéuticas

Es oficial en varios países desde el siglo XVII, por lo que se encuentra en la mayoría de las farmacopeas. Se comercializan productos fitoterapéuticos como infusión, enjuague bucal, tintura, jarabe, aceite y extractos (3, 56).

Por su acción antiséptica, carminativa, espasmolítica, antitusiva, expectorante, secretoria, antihelmíntica y astringente, está indicado su uso oral en afecciones respiratorias (asma, catarro, bronquitis, enfisema, tos) y digestivas (indigestión, parásitos, inapetencia). Además es estimulante de la corteza suprarrenal, antiinflamatorio. Tópicamente se aplica por su acción rubefaciente y conirritante para aliviar neuralgia y reumatismo; el aceite y timol están indicados como antibacteriano y antifúngico en lociones, cremas y ungüentos (3, 44, 56).

j. Estudios sobre efecto bactericida

En un estudio llevado a cabo por Friedman y col., se demostró actividad bactericida de *T. vulgaris* contra *E. coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica*, comprobándose que el timol es uno de los compuestos activos que inhibe el crecimiento de los patógenos. Además se comprobó que el timol es un componente que inhibe el crecimiento de *C. jejuni*. Sokmen y col., también demostraron efecto inhibitorio del timol contra una gran variedad de bacterias, entre ellas: *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, entre otras. (60, 61).

En México se realizó un estudio sobre actividad antimicrobiana de aceites esenciales de tomillo frente a *S. typhimurium*, *E. coli*, *L. monocytogenes* y *Shigella* spp, en el cual se encontró que el tomillo tiene actividad inhibitoria contra estos agentes patógenos. También se ha demostrado que el aceite esencial de tomillo presenta efecto bactericida contra *Salmonella* spp, *B. cereus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Sin embargo no se encontró evidencia de inhibición de parte de *Thymus vulgaris* contra *C. jejuni* (3, 5, 58, 62).

5. *Apium graveolens* L.

a. Nombres populares

Apio (62)

b. Familia

Apiaceae

c. Descripción botánica

La planta mide 30-90 cm de altura y se reconoce con facilidad por su aroma característico. Sus hojas son pinnadas y brillantes, grandes, opuestas en su base y alternas en la parte superior del tallo. Las inferiores están divididas en 5 segmentos, mientras que las superiores tienen sólo 3 más pequeños y estrechos. El tallo, erecto y hueco, está surcado externamente por estrías longitudinales profundas. Tiene raíz pivotante, potente y profunda, con raíces secundarias superficiales. En el segundo año emite el tallo floral. Las flores, que aparecen en la estación cálida, son blancas y pequeñas; se agrupan en umbelas axilares y terminales. El fruto es pequeño, sin pelo, redondeado, con su base acorazonada y comprimido lateralmente. Tiene una facultad germinativa media de 5 años; en un gramo de semilla entran aproximadamente 2.500 unidades (63, 64).

d. Hábitat

Según Thompson y Kelly, la floración en el apio se motiva principalmente por la acción de temperaturas vernalizantes durante un cierto tiempo (normalmente temperaturas por debajo de 7 a 10°C, actuando por un período comprendido entre 14 y 28 días), cuando la planta ya tiene un cierto tamaño, momento en que es capaz de recibir el estímulo vernalizador. Desde que se planta hasta que se recolecta tiene una duración aproximadamente de unos 4 meses (64).

Es un cultivo de clima templado, que al aire libre no soporta los fríos del invierno en las zonas del interior: cuando la planta está en el periodo de desarrollo, si ocurre una disminución fuerte de temperatura durante algunos días, puede dar lugar a que la planta florezca antes de tiempo; este problema se ve disminuido cuando el suelo está acolchado con lámina de plástico. Necesita luminosidad para su crecimiento (62).

e. Obtención

El apio es cosechado cuando el cultivo en su totalidad alcanza el tamaño deseado para el mercado y antes que los pecíolos desarrollen esponjosidad. Los campos de apio presentan un crecimiento uniforme y son cosechados de una sola vez. Los tallos son empacados por tamaño después de eliminarse los pecíolos y hojas exteriores (64).

Normalmente la recolección se realiza de forma manual con ayuda de una espátula metálica de bordes afilados, con el frontal corto se secciona la planta y con los laterales los restos de raíces y parte apical de las hojas (64).

f. Usos y propiedades medicinales

Aperitivo, eupéptico, carminativo, remineralizante, vitamínico, diurético. Cicatrizante en uso externo (46, 55).

Su cualidad medicinal más importante es la de ser diurética, y se han tratado con éxito algunos tipos de nefritis crónicas. Se utiliza el zumo del tallo y hojas recién recolectadas. En crudo despierta al apetito y cocido facilita las funciones intestinales (46, 63).

g. Composición química

Aceite esencial (2 – 3%): Limoneno (60%), selineno, β -terpineol, β -cariofileno, p-cimeno, β -pineno, α -santalol, dihidrocarvona, butilftálidos (sedanolido, sedenólido), furanocumarinas y otros heterósidos cumáricos (55).

h. Indicaciones terapéuticas

Estados en los que se requiera un aumento de la diuresis: afecciones genitourinarias (cistitis, ureteritis, reinitis, pielonefritis, oliguria, urolitiasis), hiperazotemia, hiperuricemia, gota, hipertensión arterial, edemas, sobrepeso acompañado de retención de líquidos. Inapetencia, meteorismo, dispepsias hiposecretoras. La tintura de apio se puede utilizar en heridas, como efecto cicatrizante con acción antiséptica (55, 65).

i. Estudios de efecto bactericida

En México se realizó un estudio de efecto bactericida contra *E. coli*, *S. flexneri*, *S. aureus* y *Streptococcus faecalis*. En dicho estudio se encontró un efecto bactericida contra las 4 especies, sin embargo *E. coli* fue quien mayor inhibición presentó. Dicho efecto bactericida está atribuido al grupo amida, que se encuentra en el aceite esencial. Otros estudios han demostrado efectos bactericidas y fungicidas. Además se ha demostrado que el apio protege al organismo de bacterias y hongos. El estudio realizado por Graniel y col., demostró que el extracto metanólico de apio no posee actividad antibacteriana contra *C. jejuni* (3, 25, 65).

6. *Hibiscus sabdariffa* L.

a. Nombres populares

Rosa de Jamaica, Hibisco, Karkadé, Roselle, Sorrel (3).

b. Descripción botánica

Hierba semileñosa, anual, erecta, 1 – 2 m de alto. Hojas con pecíolos cortos, lóbulos angostos, borde aserrado, nervadura central. Flores con bracteolas unidas con el cáliz, acrescentes en la fructificación, forman una copa grande, carnosa, rojo oscura. Cáliz en número de 5; amarillo pálido; estambres numerosos, ovario superior con 5 carpelos cerrados, placentación axial. Fruto en cápsula densamente estrigosa, más corta que el cáliz. Semillas puberulentas (3, 67 - 70).

c. Hábitat

Nativa de India Oriental o Angola, naturalizada como maleza en América tropical, se cultiva en grandes extensiones en África Central, Sudán, México e India. Se cultiva en tierras bajas de Baja Verapaz, El Progreso, Izabal, Huehuetenango y Santa Rosa (3, 67, 68).

d. Obtención

Crece en bosque seco y monte espinoso subtropical, clima cálido, suelo arenoso-arcilloso rico en materia orgánica; resiste la sequía, se adapta a lugares secos. Se propaga por semillas que se siembran en caja a 1 – 2 cm de profundidad; se trasplanta al campo definitivo. Se cortan los cálices en plena madurez; el tallo se corta a 30 cm del suelo y vuelve a retoñar (3, 67 - 70).

e. Usos y propiedades medicinales

Algunos autores la consideran nativa de América, otros que es paleotrópica; la primera mención histórica de uso medicinal y culinario es de Bontius en 1668; la primera mención de su uso en América es en Jamaica por Sloane en 1707 (3).

Con los cálices se prepara una bebida refrescante; el cocimiento se bebe caliente para tratar afecciones digestivas, respiratorias (gripe, catarro, fiebre, tos), debilidad, afecciones renales, hipertensión, sarampión, viruela, estados biliosos y arterioesclerosis (3, 53).

A los cálices se les atribuye propiedad antiescorbútica, antiséptica, aperitiva, astringente, colagoga, digestiva, diurética, emoliente, febrífuga, laxante, mucolítica, refrescante, sudorífica y tónica (3).

Con los cálices se preparan jaleas, jarabes, mermeladas y refrescos; las semillas se comen tostadas; las hojas tiernas se comen cocidos. Con los tallos se fabrica una fibra fuerte de calidad similar a la del kenaf que puede contribuir a la rentabilidad del cultivo (3).

f. Farmacología experimental y clínica

Los extractos de cálices son activos contra bacterias Gram positivo (*S. aureus*) y Gram negativo (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Neisseria* spp y levaduras) (25).

El extracto acuoso tiene actividad diurética en ratas, aumenta la excreción de sodio, potasio y ácido úrico y disminuye los niveles sanguíneos de ácido úrico. El extracto acuoso induce actividad estrogénica en ratas inmaduras por vía IP e inhibe el tono de varios tejidos musculares (aorta de conejo, útero rítmicamente contráctil, diafragma de rata y tráquea de cobayo) e inhibe otros (útero de rata en reposo y rectus abdominis de rana) a dosis de 125 mg. Los cálices en la dieta produjeron una actividad hipocolesterolemica. El extracto alcohólico no presentó actividad hipoglucémica, antilipémica, cardiovascular, espasmolítica ni antiinflamatoria en modelos animales (5, 25).

El extracto acuoso es relajante del músculo uterino por inhibición del flujo de Ca^{+2} y disminuye la presión sanguínea en ratas; el extracto lo hace también en humanos; el ungüento a base del extracto tiene actividad antiflogística y antiedema. La administración crónica del extracto atenúa la hipertensión en ratas, lo que se confirmó en estudios clínicos controlados y aleatorizados (3).

g. Composición química

Los cálices contienen ácidos orgánicos (cítrico, hibiscico, málico, tartárico, oxálico), mucílago, flavonoides, polifenoles y saponinas; antocianinas (delfidina, gosipetina, hidroxiflavonas, hibiscina y glucósidos), fitosteroles, mucílago, pectina, ácido aspártico y galacturónico y azúcares (ramnosa, galactosa, arabinosa, xilosa, manosa) (3, 45, 69).

A los flavonoides y derivados antociánicos se les atribuye actividad diurética, colerética, sedante y laxante disminuye la viscosidad de la sangre, reduce la presión sanguínea, estimula la peristalsis intestinal y puede mitigar la hepatotoxicidad. La actividad antiflogística se atribuye al contenido de mucílago (3, 45).

Los polisacáridos solubles (HIB 1, 2, 3) han demostrado actividad inmunomoduladora y antitumoral (transplante alogénico de sarcoma 180 en ratón CD-1). Las antocianinas son las responsables del color vino tinto característico de la infusión. La hibiscina es un colorante de vinos y de diversas preparaciones farmacéuticas; presenta además otro colorante rojo (gosipetina), así como un colorante amarillo, la gositrina (3, 45).

El ácido hibísico o lactona del ácido alohidroxícítrico es específico de la droga y le confiere un agradable y refrescante sabor ácido, se encuentra hasta en un 15.3% de los cálices secos (3, 67).

h. Indicaciones terapéuticas

Se comercializan productos fitoterapéuticos como infusión, tintura, jarabe y extracto (3).

Por su propiedad diurética, laxante, refrescante, hipotensora y sudorífica está indicado su uso por vía oral para el tratamiento de disuria, infección urinaria, estreñimiento, gota, hipertensión y exantemas. Por su propiedad antiflogística su uso tópico está indicado en las lesiones supurativos del eczema alérgico (3, 44, 45).

i. Estudios de efecto bactericida

Se ha demostrado que los extractos son activos contra bacterias tales como *S. aureus*, *Sarcina lutea*, *Mycobacterium phlei*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Neisseria* spp. García y col., mostraron que extractos metanólicos de *Hibiscus sabdariffa* son activos contra *C. jejuni* y *C. coli* (22).

Yin y Chao demostraron que el ácido protocatéquico contenido en *Hibiscus sabdariffa* es quien brinda la acción bactericida anti-*Campylobacter*, ya que ellos mostraron efecto inhibitorio del ácido protocatéquico contra cepas de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. fetus* (71).

IV. JUSTIFICACIÓN

La enteritis y síndromes diarreicos causados por *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* son formas clínicas de gran importancia mundial, con tasas de infección que se han incrementado alrededor del mundo, siendo la ingesta de alimentos contaminados su causa principal. Los grupos más afectados son niños, ancianos y personas con algún grado de inmunodeficiencia. Recientemente *C. jejuni* ha sido asociado a otras enfermedades tales como: artritis séptica, meningitis, proctocolitis y Síndrome de Guillain Barré y su diagnóstico puede hacerse erróneo o tardío, ya sea porque se autolimita o porque es un microorganismo fastidioso para su aislamiento.

Existen fármacos para el tratamiento de la campilobacteriosis como macrólidos y fluoroquinolonas. Sin embargo, el microorganismo ha mostrado una creciente tasa de resistencia a los antibióticos, lo que hace necesaria la búsqueda constante de agentes con propiedades antimicrobianas, siendo las plantas un excelente recurso para ello.

Las sustancias naturales como los aceites esenciales han demostrado ser protectoras del cuerpo humano en contra de un número considerable de enfermedades gastrointestinales, ya que en los aceites esenciales generalmente se encuentran compuestos antimicrobianos.

En la búsqueda de actividad contra *C. jejuni* en nuestro país, no han sido encontradas plantas inhibidoras, por lo que se justifica seguir los estudios de tamizaje. El presente trabajo realizado propuso estudiar seis plantas que son utilizadas en la medicina popular tradicional para tratamiento de diarreas, siendo algunas de ellas activas contra otros patógenos entéricos, aunque en los extractos metanólicos de varias de ellas no se ha demostrado actividad contra esta bacteria. Dichas plantas estudiadas son: *M. spicata* (Hierbabuena), *L. guatemalensis* (Laurel), *T. vulgaris* (Tomillo), *A. graveolens* (Apio), *E. giganteum* (Cola de Caballo) e *H. sabdariffa* (Rosa de Jamaica).

V. OBJETIVOS

A. General

Evaluar el efecto bactericida en *C. jejuni* de seis extractos de plantas utilizadas popularmente en el tratamiento de infecciones gastrointestinales.

B. Específicos

1. Buscar actividad inhibitoria de extractos de plantas, especias y condimentos de: *E. giganteum*, *M. spicata*, *L. guatemalensis*, *T. vulgaris*, *A. graveolens* e *H. sabdariffa* contra *C. jejuni* ATCC 33291 mediante el método de difusión.
2. Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos que presenten inhibición contra *C. jejuni*.

VI. HIPÓTESIS

Al menos uno de los extractos etanólicos de *E. giganteum* e *H. sabdariffa* o aceites esenciales de *M. spicata*, *L. guatemalensis*, *T. vulgaris*, *A. graveolens*, posee actividad antimicrobiana contra *C. jejuni*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. UNIVERSO

Plantas medicinales utilizadas en Guatemala para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales.

B. MUESTRA

1. Extractos etanólicos de: *E. giganteum* (Hoja) e *H. sabdariffa* (Hoja).
2. Aceites esenciales de: *M. spicata* (Hoja), *L. guatemalensis* (Hoja), *T. vulgaris* (Hoja) y *A. graveolens* (Semilla).

C. RECURSOS

1. Humanos
 - Tesista: Br. Vera Lucía Velásquez Ordóñez
 - Asesora: MA. Ana Margarita Paz de Ramírez
2. Institucionales
 - Laboratorio de Bioensayos, Departamento de Citohistología Humana, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
 - Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT)
 - Laboratorio de Productos Naturales FARMAYA

3. Equipo

- Balanza analítica
- Destilador de aceites
- Baño maría
- Autoclave
- Campana de bioseguridad tipo I
- Campana de bioseguridad tipo II
- Congelador a -80°C
- Incubadora a 42°C
- Jarra Gas – Pack
- Mechero Bunsen
- Microscopio óptico
- Refrigerador a 4°C

4. Materiales

- Guantes
- Algodón
- Etiquetadores
- Viales
- Pipetas automáticas de 10 a 100 µL y de 100 a 1000 µL
- Papel parafilm
- Cajas de Petri de 9 cm de diámetro
- Cinta testigo
- Asas de nicromo
- Espátulas
- Gradilla
- Láminas portaobjetos
- Láminas cubreobjetos
- Discos de ácido nalidíxico (30 µg)
- Discos de eritromicina (15 µg)
- Sobres para crear sistema microaerofílico (Campy pack BBL™)

5. Reactivos

- Pentano
- Etanol al 70%
- Colorantes de Gram modificado para *C. jejuni* (Cristal violeta, lugol, carbol fuscina) (6)
- Estándar de MacFarland al 0.5
- Reactivo de oxidasa
- Peróxido de hidrógeno al 3%

6. Medios de cultivo

- Medio de cultivo Columbia (Oxoid TM)
- Agar Sangre de carnero al 7.5%
- Caldo tripticasa soya
- Caldo tripticasa soya y glicerol al 15%

7. Cepa de *C. jejuni* ATCC 33291

D. METODOLOGÍA

1. Obtención de extractos vegetales de acuerdo a los Procedimientos Operativos Estándar validados en la Unidad de Bioensayos de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

a. Selección de plantas

- i. Las plantas se seleccionaron por su uso popular en el tratamiento de infecciones gastrointestinales, así como su uso en forma de condimentos y alimentos, además de estudios realizados que reportan actividad inhibitoria contra *C. jejuni* y otros agentes enteropatógenos.

- b. Obtención de aceites esenciales de: *M. spicata*, *L. guatemalensis*, *T. vulgaris* y *A. graveolens*. Dicha obtención será por medio de destilación: (72)
 - i. Se determinó la humedad de las plantas a utilizar.
 - ii. Se tamizó la planta (3 mm).
 - iii. Se pesaron 50 g de la planta (hoja o semilla)
 - iv. Se introdujeron en un balón de destilación de 1000 mL y agregar 400 – 500 mL de agua destilada (hasta cubrir los 50 g de material)
 - v. Se colocó el balón de destilación en el equipo, destilando a temperatura constante durante 2 – 3 horas.
 - vi. Se recogió el aceite con pentano
 - vii. Se eliminó el pentano por calentamiento en baño maría (40 – 42°C)
 - viii. Se pesó y obtuvo el porcentaje de rendimiento de los aceites.
 - ix. Se almacenó a 4°C en viales

- c. Los extractos etanólicos de *E. giganteum* e *H. sabdariffa* serán obtenidos por método de percolación.

2. Resiembra de *Campylobacter jejuni* (5, 6, 37, 73, 74)

- a. Se realizaron resiembras en medio de cultivo Columbia – Agar Sangre. Se incubaron a 42°C por 72 horas, en ambiente microaerofílico en jarra Gas-Pack (5% de oxígeno, 10% de CO₂ y 85% de nitrógeno), para probar la calidad de la cepa ATCC.
- b. A las colonias crecientes se les identificó con Tinción de Gram modificada para *C. jejuni*, Prueba de Oxidasa y Prueba de Catalasa.
- c. Los cultivos se preservaron en Tripticasa Soya y Glicerol al 15% a -20°C, hasta el momento de realizar el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana.

3. Curva de susceptibilidad (5,74)

Se realizó una curva de susceptibilidad de la cepa ATCC 33291 frente a la eritromicina.

- a. La acción antimicrobiana se evaluó a diferentes concentraciones de eritromicina: 6 mg/mL, 12.5 mg/mL, 25 mg/mL y 50 mg/mL.
- b. Se impregnó en discos estériles 50 μ L de cada concentración de eritromicina.
- c. La cepa ATCC 33291 fue enfrentada a las diferentes concentraciones de eritromicina en Agar Columbia-sangre, e incubar a 37°C por 48 horas en microaerofilia.
- d. Se realizó la lectura de halos de inhibición.
- e. Se realizó la curva de susceptibilidad.

4. Ensayo de actividad contra *C. jejuni* por extractos y aceites esenciales de plantas (5, 41).

Se realizó el ensayo de actividad antimicrobiana *in vitro*, por el método de difusión en agar. Se enfrentó a la bacteria con los extractos y aceites esenciales de las plantas mediante discos impregnados con los mismos, utilizando agar Columbia - sangre.

- a. Preparación de dilución de los extractos a concentración conocida (1 mg/mL).
 - i. Se pesó 1 mg de cada extracto y se disolvió en etanol al 50%.
- b. Impregnación de discos de difusión con extractos etanólicos (37 - 39)

Se impregnaron los discos de difusión con extractos etanólicos, de acuerdo a los Procedimientos de Operación Estándar validados en la Unidad de Bioensayos de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

 - i. Se impregnaron 10 μ L diarios de los extractos etanólicos a concentración de 1mg/mL por 5 días.

- c. Impregnación de discos con extractos de aceites esenciales (72)
Se realizó una estandarización de la cantidad de aceite esencial, necesaria para la inhibición de *C. jejuni*
 - i. Los discos de difusión se impregnaron con 5, 10 y 20 μL (en alícuotas de 10 μL por dos días) de aceite esencial.

- d. Preparación del inóculo del microorganismo (36, 74, 75)
 - i. Se tomaron colonias de *C. jejuni* en un tubo con 1 mL de caldo Tripticasa soya
 - ii. Se incubaron a 36°C por 30 minutos, después de los cuales se comparó la turbidez con el estándar de MacFarland 0.5
 - iii. Se inoculó con hisopo estéril en 4 direcciones sobre los medios Agar Columbia-sangre.
 - iv. Los discos impregnados con extractos etanólicos y aceites esenciales fueron colocados.
 - v. Los discos de eritromicina fueron colocados como controles positivos y discos impregnados con etanol al 50% como controles negativos.
 - vi. Las cajas fueron incubadas a 37°C durante 48 horas en medio microaerofílico en jarra Gas-pak.

- e. Interpretación de resultados (37, 74).
 - i. Se consideró una inhibición positiva, si el halo de inhibición fue \geq a 20 mm.
 - ii. Se consideró una inhibición negativa, si el halo fue $<$ 20 mm o si no se presentó halo de inhibición.

5. Diseño estadístico

a. Tipo de estudio

El diseño utilizado fue de tipo completamente aleatorizado. El número de repeticiones para cada ensayo con los diferentes extractos fue de 5, según la tabla de función de distribución acumulada de la probabilidad binomial, para un nivel de $\alpha = 0.05$.

b. Variables

- i. Variable dependiente: Actividad inhibitoria contra *C. jejuni*
- ii. Variable independiente: Extractos etanólicos y aceites esenciales de plantas de uso popular en Guatemala, para tratamiento de enfermedades gastrointestinales.

c. Análisis de resultados

Se realizó una prueba de hipótesis binomial donde $H_0: p \leq 0.5$ (no tiene efecto) y $H_a: P > 0.5$ (si tiene efecto). Si la hipótesis nula no se rechazaba, los datos sobre los cuales se basa la prueba no proporcionan evidencia que cause el rechazo. Es decir, el extracto etanólico o extracto de aceite esencial debería tener 5 éxitos al nivel de $\alpha = 0.05$, para considerar que presentaba efecto significativo.

VIII. RESULTADOS

El presente estudio evaluó la actividad contra la cepa ATCC 33291 de *Campylobacter jejuni*, de 4 extractos de aceites esenciales (*M. spicata*, *L. guatemalensis*, *T. vulgaris* y *A. graveolens*) y 2 extractos etanólicos (*E. giganteum* e *H. sabdariffa*), de plantas utilizadas popularmente por la población guatemalteca.

Los extractos de aceites esenciales fueron obtenidos por el método de hidrodestilación (ver anexo 1). Los extractos etanólicos fueron obtenidos por el método de percolación con etanol, seguido de concentración (ver anexo 2).

La tinción de Gram y las pruebas de producción de catalasa, producción de oxidasa y susceptibilidad a eritromicina, confirmaron que era un bacilo gram negativo, catalasa positivo, oxidasa positivo y susceptible a la eritromicina, características de *C. jejuni*.

En la curva de susceptibilidad con eritromicina a la cepa ATCC 33291, cuyos resultados se muestran en el anexo 3, demostraron que a una concentración de 6 mg/mL el halo de inhibición es de 16 mm de diámetro, mientras que en la concentración mayor (50 mg/mL de eritromicina) se obtuvo una inhibición de 26 mm de diámetro.

Se realizaron cinco repeticiones por ensayo de cada uno de los extractos, con la cepa ATCC 33291 de *C. jejuni*. Ninguna de las repeticiones del ensayo efectuadas para cada extracto de aceite esencial y extracto etanólico, mostró actividad contra *C. jejuni* ($p > 0.05$) (Tabla 1). El ensayo fue validado, ya que el control interno positivo, constituido por los discos de eritromicina, demostró actividad sobre *C. jejuni* y por otro lado, el control negativo, discos impregnados únicamente con etanol al 50%, no mostraron ninguna inhibición. El crecimiento de *C. jejuni* fue homogéneo y no se encontró contaminación en ninguna de las placas estudiadas.

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

Extracto de planta utilizada	Órgano de planta utilizado	Concentración utilizada	Cepa ATCC 33291
<i>Equisetum giganteum</i>	Hojas	1 mg/mL	Inactivo
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	Hojas	1 mg/mL	Inactivo

Fuente: Datos experimentales

Tabla 2. Evaluación de actividad contra *C. jejuni* de extractos de aceites esenciales

Extracto de planta utilizada	Órgano de planta utilizado	Concentración utilizada	Cepa ATCC 33291
<i>M. spicata</i>	Hojas	5 µL	Inactivo
<i>M. spicata</i>	Hojas	10 µL	Inactivo
<i>M. spicata</i>	Hojas	20 µL	Inactivo
<i>L. guatemalensis</i>	Hojas	5 µL	Inactivo
<i>L. guatemalensis</i>	Hojas	10 µL	Inactivo
<i>L. guatemalensis</i>	Hojas	20 µL	Inactivo
<i>T. vulgaris</i>	Hojas	5 µL	Inactivo
<i>T. vulgaris</i>	Hojas	10 µL	Inactivo
<i>T. vulgaris</i>	Hojas	20 µL	Inactivo
<i>A. graveolens</i>	Semilla	5 µL	Inactivo
<i>A. graveolens</i>	Semilla	10 µL	Inactivo
<i>A. graveolens</i>	Semilla	20 µL	Inactivo

Fuente: Datos experimentales

IX. DISCUSIÓN

Campylobacter jejuni es un importante agente causal de infección gastrointestinal que presenta un espectro amplio de sintomatología, siendo en la mayoría de los casos un cuadro diarreico, febril, con dolor abdominal severo, el cual puede evolucionar a disentería. Aunque la enteritis y síndromes diarreicos aun son las manifestaciones más frecuentes, en los últimos años han surgido otras enfermedades producidas por *C. jejuni*, tales como artritis séptica, meningitis y proctocolitis. Además, existen varias comunicaciones que aseguran la aparición del Síndrome de Guillain Barré (SGB) posterior a una infección por *C. jejuni* (6, 10, 12).

Este organismo ha presentado variaciones en sus patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos de elección, por lo que es necesario buscar fuentes terapéuticas alternativas. Además, la necesidad de contar con nuevos medicamentos accesibles y efectivos, así como la aparición de bacterias multirresistentes a antibióticos han motivado el estudio de las plantas como una alternativa terapéutica.

La presente investigación evaluó la actividad de cuatro extractos de aceites esenciales y dos extractos etanólicos de plantas utilizadas popularmente en el tratamiento de afecciones gastrointestinales, siendo éstas: *Equisetum giganteum* (equiseto), *Mentha spicata* (hierbabuena), *Litsea guatemalensis* (Laurel) *Thymus vulgaris* (tomillo), *Appium graveolens* (apio) e *Hibiscus Sabdariffa* (rosa de Jamaica). Si alguna de las especies mencionadas hubiese tenido efecto inhibitorio sobre *C. jejuni*, se hubiese podido iniciar el proceso de preparación de fármacos a base de estas plantas. Esto contribuiría a disminuir las desventajas y los efectos adversos que se observan por el uso de antibióticos de síntesis farmacéutica.

La metodología fue validada por medio de la curva de sensibilidad y control de calidad, sin embargo, se sugiere ampliar este tipo de investigaciones utilizando al menos dos metodologías, para evaluar la actividad anti *C. jejuni*, tales como el método de dilución descrito por Mitscher y el de concentración mínima inhibitoria (37 – 39, 72).

Los resultados obtenidos no fueron los esperados, ya que al menos en los aceites esenciales se ha reportado la presencia de moléculas con mayor efecto bactericida (5, 21, 25, 27).

En la búsqueda de actividad antimicrobiana contra *C. jejuni* de las plantas en estudio, no fue posible obtener resultados significativos en cuanto a inhibición se refiere ($p > 0.05$). Todos los extractos, tanto aceites esenciales como los etanólicos, fueron inactivos contra esta bacteria.

A pesar de no haberse observado actividad antimicrobiana, este estudio se suma a las investigaciones previas realizadas por Paz M., en el 2005, Álvarez C., Alvarado C. y Ordóñez E., en 2007, quienes estudiaron extractos etanólicos de otras plantas en la búsqueda de actividad anti *C. jejuni* sin obtener resultados de actividad antimicrobiana contra esta bacteria. Se tiene entonces una base de datos de plantas no activas contra esta importante bacteria.

X. CONCLUSIONES

1. Los aceites esenciales de *Mentha spicata*, *Litsea guatemalensis*, *Thymus vulgaris* y *Apium graveolens*, no poseen actividad bactericida contra *Campylobacter jejuni*.
2. Los extractos etanólicos de *Equisetum giganteum* e *Hibiscus sabdariffa*, no poseen actividad bactericida contra *Campylobacter jejuni*.
3. No es posible determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los aceites y extractos de las seis plantas estudiadas, ya que ninguno fue capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de *Campylobacter jejuni*.

XI. RECOMENDACIONES

1. Continuar con la búsqueda de actividad bactericida contra *C. jejuni*, en plantas de uso popular y nativas de Guatemala que no hayan sido evaluadas.
2. Utilizar plantas diferentes a las utilizadas en este estudio, que contengan aceites esenciales, ya que estos son los componentes bactericidas más eficaces en cuanto a actividad inhibitoria se refiere, considerando además los mecanismos de resistencia que puede poseer la bacteria.
3. Aplicar otras metodologías para evaluar actividad antimicrobiana de extractos vegetales contra *C. jejuni*.

XII. REFERENCIAS

1. Navarro D. y Domingo Jaen. Enfermedad diarreica aguda, guía de prevención y tratamiento. Venezuela Red de Sociedades Científicas: Venezuela, 2004. 11p.
2. Pearl E. y Ben Joseph. Infecciones por *Campylobacter*. Rev. Nemours Found. 2003;9: 6 – 7.
http://www.kidshealth.org/parent/en_espanol/infecciones/campylobacter_esp.
3. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria, USAC, 1999. 402 p.
4. Pavlusha K., Luyando J. Fitoterapia gastrointestinal. España: Universidad San Juan Bautista, 2006. 256 p. <http://www.slideshare.net/guest82ab5f/fitoterapia-gastrointestinales>
5. Arias F. C., García R.O. Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario. Rev. Bistua 2006;4: 13 -19.
6. Koneman E., *et al.* Diagnóstico microbiológico, texto y atlas a color. 5 Ed. Argentina: Editorial Panamericana, 1999. 1432 p.
7. Prescott L., Harley J., Donald K. Microbiología. 5ª Ed. España: McGraw-Hill International, 2004. 1240 p.
8. Murray P. Microbiología Médica. España: Elsevier España S.A, 2006. 927 pp.
9. Inglis G. D., et al. Effects of subtherapeutic administration of antimicrobial agents to beef cattle on the prevalence of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter hyointestinalis*. Appl Environ Microbiol. 2005;71: 3872 – 3881.

10. Chanqueo L., et al. Evaluación de la tinción de Hucker para la búsqueda rutinaria de *Campylobacter* sp en el estudio de un síndrome diarreico agudo. Rev. Chil. Infectol. 2005;22:242 – 246.
11. Cruz JR, et al. Infection, diarrhea, and dysentery caused by *Shigella* species and *Campylobacter jejuni* among Guatemalan rural children. Pediatr Infect Dis J 1994;13:216-223.
12. Cruz, JR, et al. Etiología de diarrea aguda en infantes de áreas marginales de Guatemala. Memorias del III Congreso Nacional de Microbiología. Guatemala, 1986.
13. Torres MF. Coprocultivo para *Campylobacter jejuni*. Manual Práctico de Bacteriología Médica. 1ª Edición. Guatemala, 1996. 71-74.
14. Smith K., et al. Quinolone-Resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992–1998. New Eng, J. Med. 1999;340: 1525 – 1532.
15. Macedo M. *Campylobacter*. Rev. Bv. Sops. 2005;2: 69 – 77.
<http://www.bvsops.org.uy/pdf/campylobacter.pdf>
16. Rees J., et al. *Campylobacter jejuni* infection and Guillain-Barre syndrome. New Eng, J. Med. 1995;333: 1374 – 1379
17. Desmonts M. H., et al. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* strains isolated from French broilers before and after antimicrobial growth promoter bans. J. Antimicrob. Chemoth. 2004;54:1025 – 1030.
18. Hakanen A. J., et al. Multidrug resistance in *Campylobacter jejuni* strains collected from Finnish patients during 1995 – 2000. J. Antimicrob. Chemoth. 2003;52: 1035 – 1039.

19. Feizabadi M. M., et al. Isolation and drug resistant patterns of *Campylobacter* strains cultured from diarrheic children in Tehran. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2007;60: 217 – 219.
20. Wardak S., et al. Antibiotic Resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Clinical Isolates from Poland. *Antimicrob Agents Chemoth.* 2007;51: 1123 – 1125.
21. Domingo D., López M. Plantas con acción antimicrobiana. *Rev. Esp. Quimioterap.* 2003;16: 385-393.
22. García M., et al. Efectos de extractos etanólicos de plantas comestibles sobre el crecimiento de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. México: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 2006. 13 p.
http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2006/ee-02-2006/documentos/cartel/metodos_de_control.pdf.
23. Venegas G., et al. Efecto de extractos y mezclas de extractos de plantas medicinales de México sobre el crecimiento de *Vibrio cholerae*. México: Universidad Autónoma de Nuevo León, 2005. 13 p.
http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2006/ee-02-2006/documentos/cartel/metodos_de_control.pdf.
24. González WP. Determinación de resistencia antimicrobiana en cepas guatemaltecas de *Campylobacter jejuni*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 2001. 85 p.
25. Graniel M.J., et al. Extractos de especias y condimentos contra el crecimiento de *Campylobacter coli* y *C. jejuni*. México: Universidad Autónoma de Nuevo León, 2005. 13 p.
http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2006/ee-02-2006/documentos/cartel/metodos_de_control.pdf.

26. Del Carmen L. Agentes antimicrobianos. España: Doc. Tec. No. 4, 2005. 24 p. (8 – 31).
27. Programa Desarrollo Económico Sostenible en Centroamérica. Aceites esenciales. Costa Rica: Doc. Tec. No.17, 2004. 20 p. (2 – 4).
28. Cáceres A., et al. Screening of sixteen plants of treatment of respiratory disease. J. Ethnopharmacol. 1990;1: 55 – 67.
29. Cáceres A., et al. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. J. Ethnopharmacol. 1990;30: 55 – 73.
30. Ankli A., et al. Yucatec Mayan medicinal plants: Evaluation based on indigenous uses. J. Ethnopharmacol. 2002;79: 43 – 52.
31. Paulo A., et al. *Cryptolepis sanguinolenta* activity against diarrhoeal bacteria. J. Ethnopharmacol. 1994;44: 73 – 77.
32. Sreeramulu G., et al. Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. J. Ethnopharmacol. 2000;48: 2589-2594
33. Wannissorn B., et al. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. Fitoterap. 2005;76: 233 – 236.
34. Sunilson J., et al. In vitro antimicrobial evaluation of *Zingiber officinale*, *Curcuma longa* y *Alpinia galanga* extracts as natural food preservatives. Am. J. Food Technol. 2009; 9: 1 – 8.
35. Cwikla C., et al. Investigations into the antibacterial activities of phytoterapeutics against *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*. Fitoterap. 2009; 10: 240 – 243.

36. Aslim B. y Nihal Yucel. In vitro antimicrobial activity of essential oil from endemic *Origanum minutiflorum* on ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* spp. Rev. Food Chem. 2008; 107: 602 – 606.
37. Paz A. M. Búsqueda de actividad contra especies de *Campylobacter* en plantas nativas de Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis maestría multidisciplinaria en producción y uso de plantas medicinales, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia): Guatemala, 2005. 60 p.
38. Álvarez C. 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 de Guatemala (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 2007. 63 p.
39. Alvarado C. Búsqueda de actividad contra *Campylobacter jejuni* en cinco plantas de uso popular guatemalteco. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 2007. 50 p.
40. Rojas M. Cola de Caballo. Tlahui-Medic. 2001;11: 145 – 159.
41. Patricio Leal, D., et al. A hysteretic invertase from *Equisetum giganteum* L. Phytochemistry. 1999;52: 1009 – 1016.
42. Rosales R. Algunas plantas medicinales y sus usos. Perú: Doc. Tec. No. 4, 2000. 7 p. <http://www.daneprairie.com>.
43. Pérez Gutiérrez, R. M. et al. Diuretic activity of Mexican *Equisetum*. J. Ethnopharmacol. 1985;14: 269 - 272
44. Hall V., et al. Plantas Medicinales. Costa Rica: Centro Nacional de Información de Medicamentos, 2002. 130 p.

45. Arteché A., et al. *Fitoterapia Vademécum de Prescripción*. 3ª Ed. España: Editorial Masson, 1998. 1148 p.
46. Cerón C. Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. *Rev. Bot. Ec. Andes Centrales*. 2006;30: 285 – 293.
47. Del Vito L., et al. Recursos herbolarios de San Luis (República de Argentina). *Lat. Am. Journal Nat. Resources*. 1997;6: 49 – 66.
48. Ovalle H. Efecto inhibitorio de la infusión de cola de caballo (*Equisetum giganteum*) sobre el crecimiento de microorganismos cariogénicos (*Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*) in vitro. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de Graduación, Facultad de Odontología), 1996.
49. Kloucek P., et al. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. *J. Ethnopharmacology*. 2005;99: 309 – 312.
50. Marongiu B., et al. Extraction and isolation of *Salvia desoleana* and *Mentha spicata*. Flavour and fragrance. 2001;16: 384 – 388.
51. Vaishnavi C., et al. Bactericidal activity of kitchen spices and condiments on enteropathogens. *Nat. Prod. Rad.* 2007;6: 40 – 45.
52. CEMAT – FARMAYA. Fichas populares sobre plantas medicinales, Serie 2. 2ª Ed. Guatemala: FARMAYA, 1992.
53. Gupta M. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Colombia: Editorial Presencia Ltda., 1995. 617 p.
54. Valleverdu C., et al. Composition of the essential oil from leaves of *Litsea guatemalensis*. Flavour and fragrance. 2005;20: 415 – 418.
55. Nicolas JP. Plantes médicinales des mayas K'iche du Guatemala. Paris : Ibis Prosa, 1999. 310 p.

56. Husain A., et al. Major Essential Oil-Bearing Plants of India. India: Central Institute of Medicinal and aromatic plants, 1988. 237 P.
57. Reda F., et al. Effect of some growth regulators and vitamins on essential oil, phenolic content and activity of oxidoreductase enzymes of *Thymus vulgaris*. World Journ. Agricult. Scienc. 2007;3: 630 – 638.
58. Mora L., et al. Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de extractos de aceites esenciales frente a *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria Monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Shigella* sp. México: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 2005. 13 p.
http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2006/ee-02-2006/documentos/cartel/metodos_de_control.pdf.
59. Santoro G., et al. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* growth and ultrastructure. Parasitology res. 2007;100: 783 – 790.
60. Friedman M., et al. Bactericidal activities of plant essential oils and some their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. J. Food Prot. 2002; 65: 1545 – 1560.
61. Sokmen A., et al. The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. J. Food Cont. 2004;15: 627 – 634.
62. Gimeno Gasca J. M. Tomillo. Fitoterap. 2001; 3: 173 - 175
63. Álvarez R. Plantas Medicinales. Guía de curas y remedios con plantas medicinales: España, 2008. http://www.canal-medicina.es/Medicina_Natural/082_apium_graveolens_plantas_medicinales

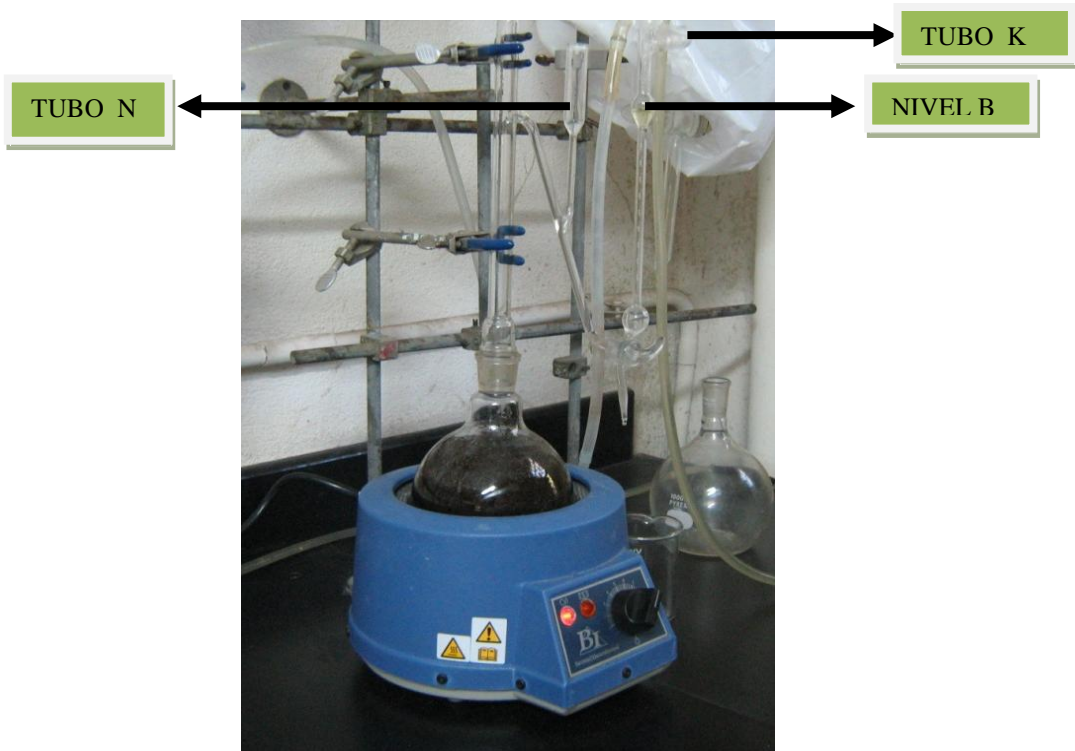
64. El cultivo del apio. Infoagro: Doc. Tec., 2008. 22 p.
<http://www.infoagro.com/hortalizas/apio2.asp>
65. Cucufate C. Formulación y elaboración de una tintura con acción antiséptica cicatrizante a base del extracto del tallo de apio (*Apium graveolens*). El Salvador: Universidad Nueva San Salvador (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Puras y Aplicadas), 2005. 56 p.
66. Marroquín G. I., et al. Identificación de sustancias con actividad antimicrobiana en apio. México: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 2005. 13 p.
http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2006/ee-02-2006/documentos/cartel/metodos_de_control.pdf.
67. Cañigueral S. Plantas medicinales y drogas vegetales. Rev. OFFARM 2003;22: 185 – 186.
68. Vaidya K. Natural cross-pollination in roselle *Hibiscus sabdariffa*. Genetics and Molecular Biology. 2000;23: 667 – 669.
69. Jinez T., et al. Efecto de niveles elevados de semilla de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) en dietas para pollos sobre el comportamiento productivo y funcionamiento hepático. Vet Mex. 1998;29: 35 – 40.
70. Méndez J., et al. Efecto de la aplicación de insecticida, fungicida y su combinación en semillas de flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) almacenadas bajo refrigeración y al ambiente sobre la emergencia y desarrollo de plántulas en un suelo de Maturín, Venezuela. Rev. NDO agrícola. 2007;7: 237 – 244.
71. Yin M. y Che Chao. Anti-*Campylobacter*, anti-aerobic, and anti-oxidative effects of roselle calyx extract and protocatechuic acid in ground beef. J. Food Microb. 2008;127: 73 – 77.

72. Hersch P., et al. Antibacterial effects of commercial essential oils over locally prevalent pathogenic strains in Mexico. *Fitoterapia*. 2005;76: 453 – 457
73. Malbrán C. Manual de procedimientos *Campylobacter*. Argentina: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, 2001. 29 p.
74. Fernández H. Manual de Procedimientos. Diagnóstico de *Campylobacter* en muestras clínicas y de alimentos. Global Salm-Surv, WHO, CDC, CSR, Universidad Austral de Chile. 2002.
75. Rivera N., et al. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Campylobacter* aisladas de carcasas de aves, sangre y fecas humanas. *Latinoam. Actual. Biomed*. 2007;1: 32 – 37.

XIII. ANEXOS

ANEXO 1. Procedimiento de destilación de aceites

- a. Tamizar 50 g de materia vegetal a utilizar.
- b. Introducir a un balón de destilación de 1000 mL.
- c. Agregar 400 – 500 mL de agua destilada, hasta cubrir 50 g de material.
- d. Conectar el balón de destilación con recipiente colector.
- e. Conectar la bomba que circula la solución de enfriamiento por el refrigerante.
- f. Llenar con agua el tubo N hasta el nivel B del tubo graduado.
- g. Agregar 2 mL de disolvente orgánico (pentano) en el tubo K, utilizando pipeta Pasteur, y colocar el tapón al tubo hasta que empiece a destilar aceite.
- h. Destilar a temperatura constante durante 2 – 3 horas, mantener el flujo de destilación de 2 – 3 mL/min..
- i. Determinar el tiempo de destilación a partir que empieza a obtenerse el aceite.
- j. Medir la capa superior de aceite esencial recogido.
- k. Esperar 10 minutos después de terminar el calentamiento.
- l. Abrir la llave, dejar caer agua y descartar. Recibir la parte orgánica en un balón de 125 mL y agregar al tubo K aproximadamente 1 mL del disolvente orgánico utilizado, para lavar y arrastrar todo el aceite recuperado.
- m. Eliminar el disolvente orgánico utilizando rotavapor.
- n. Pesar el aceite obtenido, verterlo en vial de color ambar y almacenar a 4°C.
- o. Determinar el porcentaje de rendimiento a partir del peso del aceite entre el peso de la materia vegetal * 100.
- p. Lavar el destilador con metanol y agua destilada.



ANEXO 2. Procedimiento de extracción en medio etanólico

A. Procedimiento de extracción continua por percolación

- a. Tamizar las hojas a fin de reducir el material.
- b. Colocar algodón en la parte inferior del percolador para que sirva de filtro, además colocar bajo el algodón papel filtro.
- c. Pesar la cantidad de material que se va a utilizar.
- d. Humedecer la materia vegetal en un beaker con el disolvente a utilizar.
- e. Agregar a la materia vegetal preparada al percolador y añadir etanol al 95%, de modo que cubra toda la materia vegetal.
- f. Dejar reposar la materia vegetal, para que se disuelva en el tiempo necesario (18 – 48 horas).
- g. Dejar que gotee el líquido lentamente, abriendo la llave de la parte inferior del percolador.
- h. Agregar suficiente disolvente extra, según se requiera, hasta obtener el volumen de disolvente agregado al inicio.
- i. Recolectar el líquido en un erlenmeyer.
- j. Hacer presión al material sólido que haya quedado, agregar el líquido obtenido al percolador.

B. Procedimiento de concentración en rotavapor

- a. Verificar el nivel del agua del baño de María y llevarlo a 40°C
- b. Fijar con la llave respectiva el balón colector.
- c. Engrasar las bocas esmeriladas
- d. Armar el rotavapor, de acuerdo al instructivo específico.
- e. Observar que la llave de alimentación del refrigerante esté cerrada.
- f. Succionar la solución obtenida del percolador: alcohol más planta.

- g. Encender la bomba de vacío y el rotador, las veces que sea necesario, hasta que el disolvente del balón de evaporación, se haya terminado o ya no destile ningún líquido.
- h. Iniciar la destilación del extracto con la recuperación del disolvente, hasta que esté semisólido.
- i. Verter el extracto concentrado en cristalizador de vidrio, debidamente tarada y rotulada.
- j. Colocarlo en una desecadora durante 7 – 15 días.
- k. Cuando el extracto tenga consistencia sólida, pasar a viales tarados y rotulados.
- l. Calcular el rendimiento del extracto y guardar en viales o recipientes herméticos a 4°C.



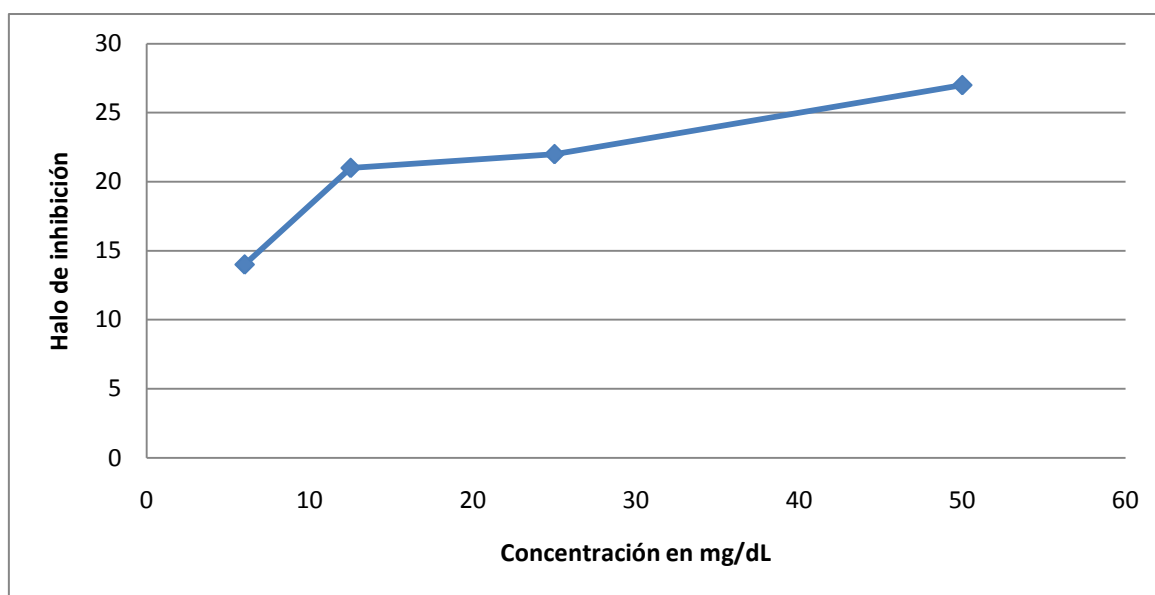
ANEXO 3. Validación de la metodología

A. Tabla . Medición de halo de inhibición a diferentes concentraciones de Eritromicina

Concentración mg/mL	Halo
6.0	16
12.5	20
25.0	22
50.0	26

Fuente: Datos experimentales

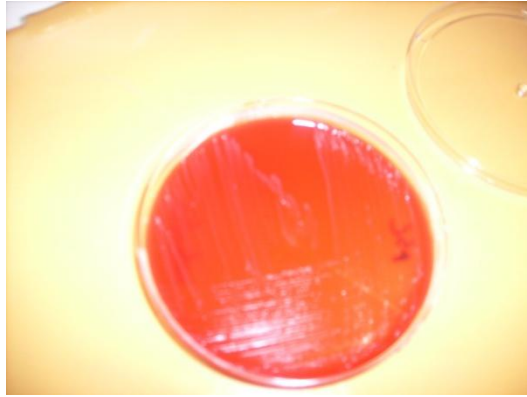
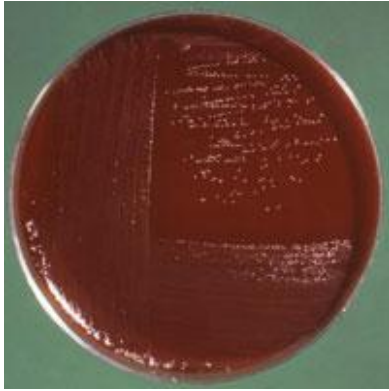
B. Curva de susceptibilidad de *C. jejuni* ATCC 33291 frente a la Eritromicina



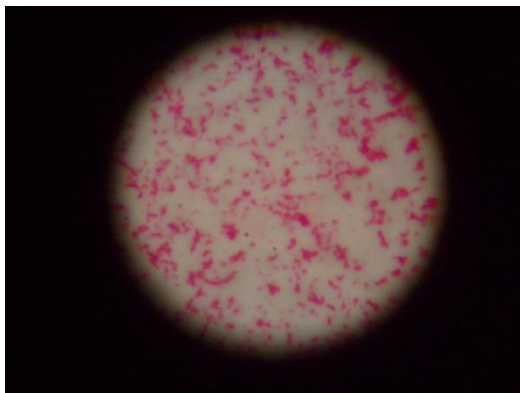
ANEXO 4. Procedimiento de bioensayo

A. Cultivo de *C. jejuni*

a.



b.

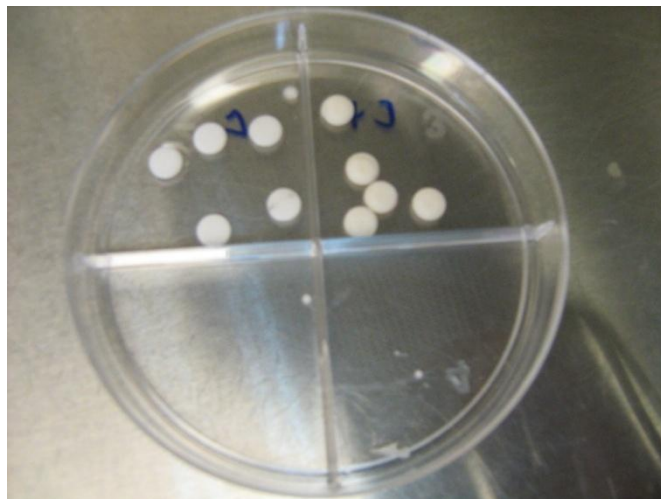


C.



- a. Cultivos de *C. jejuni* obtenido de siembra de cepa ATCC 33291. Se pueden observar las colonias pequeñas, grises y mucoides, características de la bacteria.
- b. Gram de colonias de *C. jejuni*. Se puede observar los bacilos curvos Gram negativo, formando alas de gaviota, características de la bacteria.
- c. Hidrólisis de hipurato. *C. jejuni* es hipurato positivo.

B. Impregnación de discos con extractos de plantas



C. Realización de bioensayo



Vera Lucía Velásquez Ordóñez
Autora

MA. Ana Margarita Paz de Ramírez
Asesora

Licda. María Luisa García de López
Revisora

Lic. Armando Cáceres
Revisor

Licda. Vivian Matta de García
Directora de Escuela Q.B

PhD. Oscar Cobar Pinto
Decano Facultad CC.QQ. y Farmacia