



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

OBTENCION DE UN EXTRACTO DE LAS HOJAS DE
GUAYABA POR UN METODO CRIOGENICO Y EVALUACION
DE SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

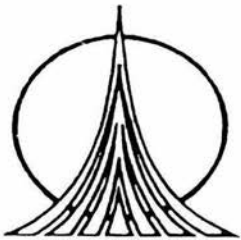
ROJAS ORDOÑEZ MICHEL

DIRECTOR: DR. MANUEL JIMENEZ ESTRADA

ASESOR: Q.F.B. EVANGELINA MERCADO MARIN

MEXICO, D.F.

2004



Universidad en la Diversidad:
Zaragoza Frente al Siglo XXI



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TODO EL TRABAJO EXPERIMENTAL SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 2-10 DEL INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

BAJO LA DIRECCIÓN DEL DOCTOR MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA

LAS PRUEBAS ANTIBACTERIANAS FUERON REALIZADAS POR INVESTIGADORES EN EL LABORATORIO DE FITOQUÍMICA UBICADO EN LA UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS (UBIPRO) PERTENECIENTE A LA FES IZTACALA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.



FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

ROJAS ORDOÑEZ MICHEL

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: "Obtención de un extracto de las hojas de guayaba por un método criogénico y evaluación de su actividad antibacteriana"

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE	Q.F.B. EVANGELINA MERCADO MARÍN
VOCAL*	DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
SECRETARIO	M. en C. BENITO REYES TREJO
SUPLENTE	Q.F.B. GABRIEL ALEJANDRO ROMERO DÍAZ
SUPLENTE	Q.F.B. LETICIA HUERTA FLORES

[Handwritten signatures and initials over horizontal lines]

DE ESTUDIOS SUPERIORES
ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a 19 de agosto de 2004.

[Handwritten signature]

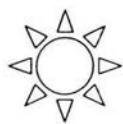
Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ
JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
DE Q. F. B.

c.c.p. Departamento de Control de Egresados
c.c.p. Interesado

A mis padres Salvador Rojas y Antonía Ordóñez

A mis hermanos Salvador y Angélica

A mi amigo que siempre estuvo presente



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Manuel Jiménez Estrada por la oportunidad y sobre todo por su apoyo y comprensión.

A la Profesora Evangelina Mercado Marín por su gran apoyo, tiempo y dedicación a este proyecto, y por ser un ejemplo a seguir como docente.

Al Dr. Guillermo Ávila integrante de la UBIPRO de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por la realización de las pruebas antibacterianas.

Al Maestro Benito Reyes Trejo por su valiosa colaboración.

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de este trabajo, el cual forma parte del proyecto con referencia 38608 M.

Lista de símbolos y abreviaturas

SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
(TSST-I)	Síndrome del Shock Tóxico
ATCC	American Type Culture Collection
FDA	Food and Drug Administration
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
SFE	Supercritical Fluid Extraction
UV	Ultravioleta
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CC	Cromatografía en Columna
AcOEt	Acetato de etilo
δ	Desplazamiento químico
cm^{-1}	Número de onda
m	multiplete
d	Señal doble
s	Señal simple
mOsm	miliosmoles
m.o	Microorganismo
CD_3OD	Cloroformo deuterado
$\text{DMSO-}d_6$	Dimetilsulfóxido deuterado

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	
2.1 ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES	2
2.1.1 Diarrea	
2.1.2 Factores microbianos	
2.1.3 La diarrea en cifras	
2.1.4 Como prevenir y tratar la diarrea	
2.2 ETIOLOGÍA	11
2.3 FÁRMACOS EMPLEADOS PARA TRATAR LA DIARREA	16
2.4 PLANTAS MEDICINALES ANTIDIARREICAS	19
2.5 <i>Psidium guajava</i>	20
2.5.1 Descripción botánica	
2.5.2 Nombres comunes	
2.5.3 Usos populares	
2.5.4 Farmacología	
2.5.5 Fitoquímica	
2.6 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS	31
2.6.1 Método de dilución en tubos	
2.6.2 Método de difusión en agar	
2.7 IMPORTANCIA DE LAS BACTERIAS EVALUADAS	34
2.8 MÉTODOS GENERALES DE EXTRACCIÓN	37
2.8.1 Extracción por arrastre de vapor	
2.8.2 Extracción por disolvente	
2.8.3 Extracción por centrifugación	
2.8.4 Extracción con fluidos supercríticos	
2.9 CROMATOGRAFÍA	41
2.9.1 Definición	
2.9.2 Fundamento	
2.9.3 Clasificación	

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	49
4. OBJETIVOS	50
4.1 General	
4.2 Particulares	
5. HIPÓTESIS	51
6. MATERIAL Y EQUIPO	52
6.1 Extracciones y fracciones	
6.2 Pruebas antibacterianas	
7. METODOLOGÍA	56
7.1 Extracciones y fracciones	
7.2 Pruebas antibacteriana	
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
9. CONCLUSIONES	77
10. RECOMENDACIONES	78
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la diarrea es uno de los cinco principales problemas de salud pública mundial.

Los altos índices de morbilidad y mortalidad infantil en los países en vías de desarrollo se deben, en gran parte, a las enfermedades diarreicas.

En México, la diarrea es la segunda causa de morbilidad en la población en general y la principal causa de demanda de consulta externa y hospitalaria en niños menores de cinco años, quienes representan el grupo más vulnerable y con mayor riesgo de evolución grave.

La diarrea ha sido por años una de las prioridades en los programas de salud en nuestro país a fin de disminuir la mortalidad en los menores de cinco años. Por ello es importante hacer conciencia de la gravedad del problema y tener presente que se deben de tomar medidas de prevención., algunas de estas son tan simples como la higiene.

El tratamiento farmacológico para tratar dichas enfermedades diarreicas consiste básicamente en fármacos derivados de los opioides, como lo son el difenoxilato y la loperamida análogos de la meperidina; los cuales se han seleccionado por su efecto antidiarreico máximo; sin embargo tienen efectos analgésicos sobre el sistema nervioso central (SNC) que afecta principalmente a los niños.

Es por ello que se tiene la necesidad de buscar nuevas alternativas que nos ofrezcan un efecto antidiarreico sin causar daño al organismo. Las plantas nos ofrecen una opción por su amplia variedad de compuestos biológicamente activos.

Una de las plantas más utilizadas por la medicina tradicional, es la guayaba (*Psidium guajava*), de la cual se sabe que sus frutos, raíces y hojas proporcionan un efecto antidiarreico, antibacteriano, antiespasmolítico, entre otros.

Estudios anteriores realizados por Lozoya *et al.*, (2001) demuestran que sus extractos metanólico y etanólico de las hojas de guayaba poseen actividad antimicrobiana y antiespasmolítica; así como también Cáceres *et al.*, (1993) reporta que el extracto etanólico de *Psidium guajava* posee actividad antibiótica, muestra inhibición de la acetilcolina y de la motilidad intestinal, así también reporta la actividad antiespasmolítica.

En el presente trabajo se realizó la extracción de metabolitos secundarios de las hojas de guayaba empleando hielo seco; para posteriormente evaluar su actividad antibacteriana, con ello se pretendió hacer selectiva dicha extracción, manteniendo y/o aumentando la actividad antibacteriana.

ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES

2.1 ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES

Las infecciones gastrointestinales comprenden una amplia variedad de síntomas complejos y de agentes infecciosos reconocidos. Se aplica el término *gastroenteritis* al síndrome de diarrea o vómitos, que tiende a producir infección inflamatoria en el colon. Otras infecciones e infestaciones entéricas producen síntomas sistémicos, en forma predominante (Guerrant, 1991)

La diarrea se manifiesta alrededor del mundo y causa el 4% de todas las muertes y 5% de la pérdida de salud a incapacidad. Las infecciones gastrointestinales causan comúnmente diarrea, la cual mata a cerca de 2.2 millones de gente alrededor del mundo cada año, en su mayoría a niños de países en vías de desarrollo.

La diarrea esta también asociada con otras infecciones como la malaria y el sarampión. La irritación química del intestino o enfermedades no-infecciosas intestinales pueden resultar también en diarrea (OMS, 2000)

2.1.1 Diarrea.

La diarrea es un síndrome que se caracteriza por aumento en la frecuencia de las heces y la disminución de su consistencia.

Generalmente se trata de un síndrome de naturaleza infecciosa en el que ocurre un proceso de secreción activa de líquidos en la pared intestinal, asociado o no a una condición en la que la absorción de agua esta disminuida (Terrés *et al.*, 2002)

En el cuadro agudo de la enfermedad existe pérdida de líquidos y nutrientes que de no ser manejada adecuadamente puede producir la muerte; la persistencia crónica del paciente puede generar desnutrición y detención del crecimiento y desarrollo en edades pediátricas (OMS, 1990).

La diarrea puede variar en intensidad de una molestia aguda autolimitada, a una enfermedad grave que pone en peligro la vida.

En estado normal, cerca de 10L de líquido penetran al duodeno diariamente, del cual aproximadamente 1.5L son absorbidos por el intestino delgado. El colon absorbe la mayor parte del líquido restante, con solo 100 mL perdidos en las evacuaciones (Kenneth y McQuaid;2001)

De acuerdo Kenneth y Mc Quaid (2001), una manera de clasificar a la diarrea es en aguda y crónica:

Diarrea aguda {
Diarrea inflamatoria.
Diarrea no inflamatoria.

Diarrea crónica {
Diarrea osmótica.
Trastornos de malabsorción.
Trastornos secretores.
Trastornos inflamatorios.
Trastornos de motilidad.
Infecciones crónicas.
Diarrea ficticia.

A continuación se presentan algunas características de cada tipo de diarrea.

Diarrea aguda.

Diarrea no inflamatoria.- la diarrea acuosa, no sanguinolenta, que se vincula con cólicos peri umbilicales, timpanismo, náuseas o vómito sugiere enteritis del intestino delgado.

Diarrea inflamatoria.- la presencia de fiebre y diarrea sanguinolenta (disentería) Indica daño del tejido colónico. La diarrea es de volumen pequeño y se relaciona con cólicos del cuadrante inferior izquierdo, urgencia y tenesmo.

Diarrea crónica.

Diarrea osmótica.- al abandonar las evacuaciones, la osmolalidad fecal es igual a la osmolalidad del suero, es decir, de cerca de 290 mOsm/ Kg. bajo circunstancias normales, los principales osmoles son Na^+ , K^+ , Cl^- y HCO_3^- .

La osmolalidad de las evacuaciones puede estimarse multiplicando la ecuación $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \cdot 2$, la brecha osmótica es la diferencia entre la osmolalidad medida de las evacuaciones o suero, y la osmolalidad estimada de las evacuaciones y es normalmente

menor a 50mOsm/Kg. Un aumento de la brecha osmótica implica que la diarrea es causada por ingestión o malabsorción de una sustancia osmóticamente activa.

Trastornos de malabsorción.- las manifestaciones principales son pérdida de peso, diarrea osmótica y deficiencias nutricionales.

Trastornos secretores.- el aumento o disminución de la secreción intestinal da lugar a una diarrea acuosa que puede ser de volumen muy grande (1 a 10L/día) pero con una brecha osmótica normal. Hay pocos cambios en el volumen de las evacuaciones durante el estado de ayuno y pueden desarrollarse deshidratación y desequilibrio electrolítico.

Trastornos inflamatorios.- la diarrea esta presente en la mayoría de los pacientes con enfermedad intestinal (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, colitis microscópica). Puede presentarse una diversidad de otros síntomas que incluyen dolor abdominal, fiebre, pérdida de peso y hematoquezia.

Trastornos de motilidad.- la motilidad intestinal anormal secundaria a trastornos sistémicos o cirugía pueden dar lugar a diarrea a causa de tránsito rápido o el éxtasis del contenido intestinal con sobrecrecimiento bacteriano que produce malabsorción.

Infecciones crónicas.- las infecciones crónicas parasitarias pueden causar diarrea por varios mecanismos. Los pacientes con SIDA son especialmente susceptibles.

Diarrea ficticia.- cerca de 15% de los pacientes con diarrea crónica tiene diarrea ficticia causada por abuso sobrepticio de laxantes o dilución ficticia de las evacuaciones.

Existen varias causas que provocan los diferentes tipos de diarrea. Remington (1999) indica que en general son las siguientes :

- Infecciones: {
- Virales
 - Bacterianas
 - Parasitarias
 - Fúngicas

Otras causas que provocan la diarrea son:

- Síndrome de colon irritable.
- Enfermedad inflamatoria intestinal (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y otros)
- Toxinas (envenenamiento por alimentos y colitis pseudo membranosa)
- Drogas.
- Adicción oculta a drogas.
- Tumores neuroendocrinos.
- Tumores secretores(adenoma vellosos)
- Síndromes de malabsorción(enfermedad celíaca, deficiencia de lactasa, etc)
- Trastornos de motilidad.
- Diverticulosis e ileostomía.

En el presente trabajo nos enfocaremos a las infecciones que causan la diarrea, y específicamente a las infecciones bacterianas.

En las infecciones gastrointestinales los principales hallazgos clínicos son la náusea, el vómito, el dolor abdominal, la diarrea y la fiebre. Los síntomas predominantes dependen del agente etiológico y de si éste resulta ser toxígeno o invasor, o ambos. Los microorganismos productores de enterotoxinas afectan el intestino delgado proximal y tienden a producir diarrea acuosa (por ejemplo, la *E.coli* enterotoxigena, el *Vibrio cholerae*)

Las bacterias invasoras o productoras de citotoxinas infectan el colon y producen dolor abdominal, diarrea con sangre y moco, fiebre y deshidratación, que en este caso se denomina disentería, y los microorganismos que la causan incluyen a *Salmonella*, *Shigellae*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* enteroinvasora, *Clostridium difficile* y *Entamoeba histolytica* (Jawetz et al., 1999)

2.1.2 Factores microbianos.

La patogenicidad, es la capacidad potencial del microorganismo para provocar la enfermedad, y se aplica a grupos o especies de microorganismos.

Mientras que la virulencia es el grado de patogenicidad de un grupo o especie y se mide generalmente por el número de microorganismos necesarios para producir la enfermedad (Burrows, 1979)

La virulencia depende al menos en gran parte de su poder invasor, es decir, la capacidad que tiene el microorganismo para establecerse en el interior del huésped.

La patogenicidad es en gran parte o totalmente debida a la toxicogenicidad, es decir, la capacidad de producir compuestos llamados toxinas (Burrows, 1979)

Varias características de virulencia bacteriana determinan los mecanismos patogénicos responsables de la diarrea. Los distintos tipos de *E. coli* demuestran este rango completo de características. *E. coli* puede producir una de tres familias de enterotoxinas, puede ser invasora (ECEI), enterohemorrágica (ECEH), y enteropatógena (ECEP)

Ha sido de gran ayuda el estudio de *E. coli* con estas características patogénicas variadas para desentrañar el modo en que los patógenos entéricos alteran la función de absorción intestinal normal para producir enfermedades diarreicas (Guerrant, 1991)

Así un microorganismo patógeno tiene el *potencial* para producir enfermedad pero lo hace solo si es lo suficientemente virulento para penetrar al cuerpo y vencer los mecanismos de defensa del huésped.

Algunos factores de virulencia.

Factores tóxicos: toxinas.

Algunos microorganismos producen sustancias venenosas de peso molecular elevado conocidas como *toxinas*. La capacidad de los microorganismos para producir toxinas es un factor importante en su capacidad para producir enfermedad. Las toxinas producidas por los microorganismos pueden ser excretadas al medio que los rodea, en este caso de llaman exotoxinas o retenidas dentro de la célula, y en este caso de llaman endotoxinas. (Pelczar *et al.*, 1977)

Las toxinas se clasifican en dos categorías:

Endotoxinas y Exotoxinas.

Endotoxinas : son compuestos complejos de polisacáridos, proteínas y lípidos, comprenden parte de la pared celular y son liberadas por autólisis de las células muertas, se encuentran en las bacterias gramnegativas (Burrows, 1979)

Las endotoxinas son altamente pirógenas, es decir, producen fiebre en el huésped. Algunas inhiben la fagocitosis (ingestión de microorganismos u otras partículas extrañas por leucocitos o células blancas de la sangre), pero otras la estimulan (Pelczar *et al.*, 1977)

Exotoxinas : son tóxicos proteínicos solubles secretadas por las células vivas de algunas bacterias, plantas y animales. Parte de las bacterias son semiparásitos, pero las especies que tienen mayor capacidad de producción de exotoxinas son saprófitos. Se han clasificado en tres tipos:

- Entero toxinas: que estimulan a las células del tracto gastrointestinal de una manera anormal.
- Citotoxinas : que matan a las células hospedadoras por ataque enzimático.
- Neurotoxinas : obstaculizan la transmisión normal de los impulsos nervios (Burrows, 1979)

Los componentes o productos tóxicos microbianos están relacionados con la capacidad patogénica de varios patógenos entéricos. Pueden clasificarse a las toxinas producidas por los patógenos entéricos en neurotoxinas, entero toxinas o citotoxinas. Por lo general, las neurotoxinas se ingieren como toxinas preformadas que, con frecuencia, son la causa de síntomas entéricos; incluyen las toxinas estafilocócicas, las del *Bacillus cereus* y las botulínicas.

Aunque la intoxicación alimentaria estafilocócica produce un síndrome gastrointestinal superior de instalación aguda atribuido a la entero toxina estafilocócica, el efecto parece deberse a la acción de esta toxina sobre el sistema nervioso autónomo central, más que a la destrucción o secreción intestinal.

Son entero toxinas verdaderas las que tienen un efecto directo sobre la mucosa intestinal, produciendo una neta secreción hídrica (Guerrant, 1991)

Adherencia.

La capacidad de muchos patógenos entéricos para producir enfermedad no sólo depende de la posibilidad del organismo de penetrar en la mucosa o de producir enterotoxinas o citotoxinas, sino de su habilidad de adherirse a ella y colonizarla.

Esta capacidad adherente ha sido bien descrita con *E. coli* enterotóxica, que debe, primero adherirse y colonizar el intestino delgado superior de humanos o animales, produciendo luego enterotoxinas, para poder causar enfermedad.

Como la enterotoxigenicidad, también parece ser codificada en forma genética la producción de estos antígenos de adherencia, mediante plásmidos transmisibles (Guerrant., 1991)

Invasividad.

La capacidad de microorganismos como *Shigella* y ciertas cepas de *E. coli* de invadir y destruir células epiteliales es responsable de la diarrea inflamatoria o disintérica que producen. Hay una destrucción celular e invasión inflamatoria en la mucosa del colon. (Guerrant., 1991)

2.1.3 La diarrea en cifras

La organización mundial de la salud (OMS) estimó un billón de episodios de diarrea en niños menores de cinco años en América Latina, África y Asia durante 1988. Se ha informado una frecuencia anual de diarrea de 3.6 episodios por niño en promedio, con una variación de 0.8 a 10.7, constituyendo la causa de por lo menos cinco millones de muertes al año en infantes menores de cinco años (OMS, 1990)

Afortunadamente, las enfermedades diarreicas han acusado un descenso continuo en su participación como causa de muerte en México. Hasta 1960 ocuparon el primer lugar como causa de mortalidad. Sin embargo, la diarrea aún ocupa el segundo lugar entre los padecimientos infecciosos, con una tasa de 3100 por cada 100 mil habitantes, siendo los menores de un año el grupo mas afectado, con una mortalidad de 10%. (Terrés *et al.*, 2002)

Durante 1990, en las instituciones públicas de la salud se registraron 2,389 365 casos de diarrea aguda en niños menores de cinco años, con un total de 14011 defunciones para una tasa de mortalidad de 146.3 por 100 mil niños.

No obstante los avances logrados, el numero de muertes por diarrea sigue siendo injustificadamente elevado; en 1995 esta enfermedad fue la cuarta causa de mortalidad infantil con una tasa de 127 por 100 mil nacidos vivos registrados, y la tercera en mortalidad preescolar con una tasa de 15 por 100 mil niños en este grupo de edad. El problema fue más evidente en algunos estados del país con condiciones de pobreza extrema, como Chiapas y Oaxaca. (Terrés *et al.*, 2002)

En el boletín semanal de epidemiología, emitido por la Secretaría de Salud, hasta la semana 53 del 2003 se reportaron 0 casos de cólera, 6442 de fiebre tifoidea en hombres y 12311 en mujeres. En cuanto a Shigelosis se reportaron 12524 casos en hombres y 14284 en mujeres. La infección intestinal debida a virus y otros organismos, y las mal definidas se reportaron 1947837 casos en hombres y 2330748 casos en mujeres., en la intoxicación alimentaria bacteriana se reportaron 14539 en hombres y 16126 en mujeres y por último las enfermedades infecciosas intestinales se reportaron 2502265 de casos en hombres y 3038314 en mujeres.

Estas últimas cifras muestran el panorama general durante todo el año 2003, en cuanto a infecciones gastrointestinales.

2.1.4 Como prevenir y tratar la diarrea

Como la diarrea es un padecimiento grave que de acuerdo a las estadísticas ocupa un segundo lugar muy importante dentro de los principales padecimientos de nuestra población., es importante hacer conciencia de la gravedad del problema y tener presente que se deben de tomar medidas de prevención.

Algunas de estas medidas son muy simples y debemos de participar tanto la población como los encargados de la salud.

A continuación se mencionan algunas medidas de prevención

Capacitar a toda la población para mejorar la preparación y conservación higiénica de los alimentos.

Beber agua potable, de preferencia hervida (Terrés *et al.*, 2002)

Lavado de manos antes de preparar o consumir alimentos, y después de ir a defecar.

Las comunidades mas desprotegidas reciban atención médica constante y que se mejoren las condiciones de salubridad.

Información constante por parte de las autoridades a las comunidades para la prevención de la diarrea (Dávila *et al.*, 2001)

Capacitar a los padres de familia para que detecten los signos graves de la diarrea en el caso de los niños para acudir oportunamente al médico.

No automedicarse, ni automedicar a los niños.

Hidratar a los niños constantemente (preparar correctamente Vida Suero Oral)

Mantener la alimentación habitual.

Capacitar al personal médico para manejar correctamente la diarrea de acuerdo a la gravedad, y no hacer mal uso de los fármacos antidiarreicos (Terrés *et al.*, 2002)

Concentrar las acciones preventivas y de educación en los sectores más desprotegidos de la población.

Continuar la capacitación de los estudiantes de áreas de salud en las universidades.

Establecer criterios que permitan seleccionar en forma oportuna los niños que deben ser hospitalizados o remitidos. Por ejemplo: deben hospitalizarse todos los niños con diarrea persistente que presenten deshidratación y los niños con diarrea aguda que presenten dos o más de los siguientes factores de riesgo:

- a) edad menor de un año
- b) diarrea de más de siete días de evolución
- c) desnutrición avanzada
- d) reingreso por deshidratación

Deben preferirse los sistemas de vigilancia epidemiológica activa para el caso de las muertes, lo que permite pensar que de alguna manera el ambiente deteriorado y la carencia de los servicios públicos inciden en la presencia de la enfermedad diarreica.

(Arias *et al.*, 2001)

2.2 ETIOLOGÍA

Es más común la diarrea cuando no hay higiene, agua limpia para beber. Limpiar y tener higiene básica es una forma de prevenir. El agua contaminada con heces humanas por ejemplo; las aguas negras, los tanques, las letrinas son de especial atención.

Las heces de los animales también contienen microorganismos que causan la diarrea. La diarrea también puede ser transmitida de persona a persona, por la poca higiene personal; los alimentos son otra causa cuando estos no son preparados en condiciones de higiene.

El agua puede contaminar los alimentos durante la irrigación, así como los pescados u mariscos contaminados pueden causar diarrea (OMS, 2000)

La enfermedad diarreica es un síndrome de etiología multicausal en la que el evento primario suele ser la interacción del organismo con agentes infecciosos virales, bacterianos y parasitarios (Larrosa *et al.*, 2001)

Los eventos secundarios corresponden a las consecuencias del daño producido por estos agentes al organismo, particularmente al epitelio digestivo, en forma de pérdidas anormales de agua y sales, en la alteración en la digestión y absorción de nutrimentos (Kenneth y McQuaid, 2001)

Los mecanismos de acción de los agentes infecciosos asociados con la enfermedad diarreica son muy diversos, ya que mientras los virus no suelen inducir respuesta inflamatoria, en las infecciones por bacterias entero invasoras pueden presentarse evacuaciones con moco y sangre; además de leucocitos en las heces.

En la actualidad es ampliamente reconocida la importancia de estudiar y comprender los mecanismos de producción de diarrea por distintas etiologías, para establecer esquemas de tratamiento apropiados y evitar los efectos indeseables del mal uso de los antimicrobianos (Terrés *et al.*, 2002)

Se ha aprendido mucho sobre agentes bacterianos y virales capaces de producir enfermedades gastrointestinales agudas, en las dos últimas décadas. Estas incluyen *Escherichia coli*, enteroxigénica, que causa diarrea secretora, otros *E. coli* capaces de causar destrucción e inflamación tisular, patógenos recién apreciados y crecientemente reconocidos, como *Yersinia*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Cryptosporidium*, rota virus y virus semejantes al de Nolwak (Kenneth y McQuaid, 2001)

A continuación se presentan los agentes etiológicos de infecciones gastrointestinales (tabla 1)

Tabla 1. Agentes etiológicos de infecciones gastrointestinales.

Microorganismo	Período de incubación	Signos y síntomas	Epidemiología	Patogenia	Características clínicas
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 a 18 horas	Náusea y vómito	Los estafilococos crecen en las carnes, los lácteos y otros alimentos producen enterotoxina.	La enterotoxina actúa sobre los receptores en el intestino los cuales transmiten al centro del bulbo raquídeo los impulsos que controlan el vómito.	Muy común, inicio rápido, vómitos intensos hasta por 24 horas. Se presenta en las personas que comieron el mismo alimento. Por lo general no se requiere tratamiento, solo para restaurar líquidos y electrolitos.
<i>Bacillus cereus</i>	2 a 16 horas	Vómito o diarrea	Arroz frito recalentado es un vehículo común	La enterotoxina formada en los alimentos o en el intestino proviene del crecimiento de <i>B.cereus</i>	Con un período de incubación de 2 a 8 horas, principalmente vómitos. Con un período de incubación de 8 a 16 horas sobre todo diarrea.
<i>Clostridium perfringens</i>	8 a 16 hrs.	diarrea acuosa	Los clostridios crecen en los platos de carne recalentados. Se ingieren grandes cantidades.	La enterotoxina producida durante la esporulación en el intestino causa hipersecreción.	Inicio abrupto de diarrea profusa; en ocasiones vómitos. La remisión por lo general acontece sin tratamiento de 1 a 4 días. Muchos clostridios en los cultivos del alimento y de las heces de los pacientes.
<i>Clostridium botulinum</i>	18 a 24 horas	Parálisis	Crece en los alimentos con anaerobiosis y produce toxina.	La toxina absorbida del intestino bloquea la acetilcolina en la unión neuromuscular.	Diplopía, disfagia, dificultad respiratoria. El tratamiento requiere apoyo ventilatorio y antitoxina.
<i>Escherichia coli</i> (enterotoxigena)	24 a 72 horas	Diarrea acuosa	Causa más común de "diarrea del viajero"	La ECET en el intestino produce enterotoxinas termolábiles o termoestables. Las toxinas producen hipersecreción en el intestino delgado.	Por lo general inicio abrupto de diarrea; vómito rara vez. Una infección grave en los recién nacidos. En los adultos por lo general se autolimita en 1 a 3 días.

Tabla 1 (continuación)

<i>Escherichia coli</i> (enteroinvasora)	48 a 72 horas	Disentería	Brotos ocasionales de disentería, causa infrecuente de la infección esporádica.	Invasión inflamatoria de la mucosa colónica; similar a la shigellosis. La ECEI se parece mucho a la <i>shigella</i> .	Diarrea aguda sanguinolenta con malestar, cefalea, fiebre alta y dolor abdominal. Enfermedad grave en los niños desnutridos, leucocitos presentes en las heces.
<i>Escherichia coli</i> (enterohemorrágica)	24 a 72 horas	Diarrea acuosa y sanguinolenta	Diarrea sanguinolenta vinculada con hamburguesas mal cocidas en los restaurantes de comida rápida.	La ECEH verotoxina (toxina similar a la <i>shiga</i>) Con frecuencia se identifica al serotipo O157:H7.	Produce diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica y la mayor parte de las causas del síndrome urémico hemolítico.
<i>Escherichia coli</i> (enteropatógena)	Inicio lento	Diarrea acuosa	Causa común de diarrea en neonatos de los países en desarrollo. De manera clásica produce diarrea epidémica en las guarderías y cuneros con grandes tasas de mortalidad.	La ECEP se adhiere a las células de las mucosas epitelial y da lugar a cambios en su citoesqueleto; puede invadir las células, difiere de otras con propiedades enteroadherentes o enteroagregantes que producen diarrea.	Inicio incidiioso en el transcurso de 3 a 6 días con indiferencia, escasa alimentación y diarrea. Por lo general dura de 5 a 15 días. La deshidratación, el desequilibrio electrolítico y otras complicaciones son capaces de producir la muerte.
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	6 a 96 horas	Diarrea acuosa	Los microorganismos crecen en mariscos y pescados en el intestino y producen toxinas o invaden.	La toxina produce hipersecreción; los vibriones invaden el epitelio; las heces pueden ser sanguinolentas.	Inicio abrupto de diarrea en grupos que consumieron el mismo alimento, en especial mariscos y cangrejos. La recuperación por lo general es completa en 1 a 3 días. Los cultivos del alimento y heces resultan positivos.

Tabla 1 (continuación)

Microorganismo	Período de incubación	Signos y síntomas	Epidemiología	Patogenia	Características clínicas
<i>Vibrio cholerae</i>	24 a 72 horas	Diarrea acuosa	El microorganismo crece en el intestino y produce toxinas	La toxina produce hipersecreción en el intestino delgado. Dosis infectante de $> 10^5$ microorganismos	Inicio abrupto de diarrea líquida en las regiones endémicas. Se requiere de la reposición rápida de líquidos y electrolitos por vías IV u oral.
Especies de <i>shigella</i> (casos leves)	24 a 72 horas	disentería	El microorganismo crece en el epitelio de la superficie del intestino	Los microorganismos invaden las células epiteliales; presencia de sangre, moco y PMN en las heces. Dosis infectante $< 10^3$ microorganismos	Inicio abrupto de diarrea, puede haber sangre o pus en las heces, cólicos, tenesmo y letargo, leucocitos en las heces resultan positivos. A menudo leve y autolimitado.
<i>Shigella dysenteriae</i> tipo 1 (bacilo shiga)	24 a 72 horas	Disentería, diarrea sanguinolenta	Produce brotes en los países en desarrollo.	Produce citotoxina y neurotoxina	Diarrea sanguinolenta intensa en los niños de los países en desarrollo; tasa de mortalidad grande.
Especies de <i>salmonella</i>	8 a 48 horas	Disentería	El microorganismo crece en el intestino. No produce toxina	Infección superficial en el intestino con ligera invasión. Dosis infectante $> 10^5$ microorganismos	Inicio gradual o abrupto de diarrea y de fiebre de poca intensidad. Leucocitos en las heces. Los cultivos de heces son positivos. Es frecuente el estado de portador durante mucho tiempo.
<i>Clostridium difficile</i>	días a semanas después de la terapéutica antibiótica.	disentería	Colitis pseudomembranosa vinculada con antibiótico.	Elabora enterotoxina y citotoxinas, las cuales producen diarrea y necrosis en la células epiteliales	Inicio abrupto de diarrea sanguinolenta y de fiebre. Toxina en las heces. Es clásico que los pacientes hayan recibido antibióticos.

Tabla 1 (continuación)

<i>Campylobacter jejuni</i>	Disenteria 2 a 10 días	Infección por vía oral debida a alimentos, mascotas. El microorganismo crece en el intestino delgado	Invasión de la membrana mucosa	Fiebre, diarrea y sangre fresca en las heces, especialmente en los niños. Por lo general autolimitada. Requiere medios especiales para cultivo a 42°C.
<i>Rotavirus</i>	Diarrea acuosa 48 a 96 horas	Los virus son la principal causa de enfermedad diarreica en los lactantes y niños pequeños de todo el mundo.	Induce cambios histopatológicos en las células de la mucosa intestinal	La fiebre y el vómito por lo general preceden a la molestia abdominal y a la diarrea.
<i>Giardia lamblia</i>	Diarrea acuosa 1 a 2 semanas	El parásito intestinal identificado con más frecuencia. Patógeno frecuente en los brotes de diarrea transmitidos por agua	Interacción compleja y poco comprendida del parásito con las células de la mucosa y con la respuesta inmunitaria del paciente.	Diarrea que se autolimita de 1 a 3 semanas, los síntomas crónicos de diarrea intermitente, malabsorción y pérdida de peso pueden durar hasta seis meses.
<i>Entamoeba histoyitica</i>	Disenteria Inicio gradual de 1 a 3 semanas	La prevalencia más grande en los países en desarrollo: puede estar infectado 10% de la población mundial	Invade mucosa colónica y lisa las células, incluso los leucocitos	Son comunes la diarrea, el dolor abdominal, la pérdida de peso y la fiebre. Puede dar origen a muchas complicaciones las cuales incluyen colitis fulminante, perforación y abscesos hepáticos.
<i>Salmonella typhi</i> (<i>s. paratyphi</i> A Y B, <i>s. choleraesuls</i>)	Fiebre entérica 10 a 14 días	Los humanos son el único reservorio de la <i>S. typhi</i>	Invade la mucosa intestinal y se multiplica en los macrófagos de los folículos linfáticos intestinales; ingresa a ganglios linfáticos mesentéricos y a la sangre y se disemina.	Inicio insidioso de malestar, anorexia, mialgias y cefalea, fiebre alta que remite, puede presentarse constipación o diarrea. Hepatoesplenomegalia en cerca de 50 % de los pacientes. Diagnóstico mediante el aislado en cultivo de sangre, heces o de otros sitios. Es importante la terapéutica antibiótica.

Información obtenida de Jawetz et al. Microbiología médica. 16ª. ed. México D.F: El manual Moderno, 1999 pp 843-847.

2.3 FÁRMACOS EMPLEADOS PARA TRATAR LA DIARREA

Esta bien demostrado que el uso de los fármacos antidiarreicos, antiespasmódicos, antieméticos y anticolinérgicos, además de no tener utilidad en el manejo de la diarrea incluso pueden agravar la misma (Térres *et al.*, 2002)

Los antidiarreicos utilizados con mayor frecuencia son los anticolinérgicos, los narcóticos opiáceos, los análogos de la meperidina (1) (difenoxilato y loperamida), (Remington, 1999)

Estos agentes se pueden usar con seguridad en pacientes con enfermedades diarreicas de grado leve a moderado. Los agentes opiáceos ayudan a disminuir el número y consistencia líquida de las evacuaciones y controlan la incontinencia fecal. No obstante, no deben usarse en pacientes con diarrea sanguinolenta, fiebre alta o toxicidad sistémica.

La loperamida es el fármaco preferido en su presentación de 4 mg, seguida de la de 2 mg (máximo 16 mg al día)

El subsalicilato de bismuto (Pepto- Bismol) dos tabletas o 30 mL cuatro veces al día, reduce los síntomas en los pacientes con diarrea del viajero en virtud de sus propiedades antiinflamatorias y antibacterianas (Kenneth y McQuaid, 2001)

Los agentes antimicrobianos tienen efectos que pueden agravar los síntomas o el episodio diarreico y facilitar la de más agresivos (Terrés *et al.*, 2002)

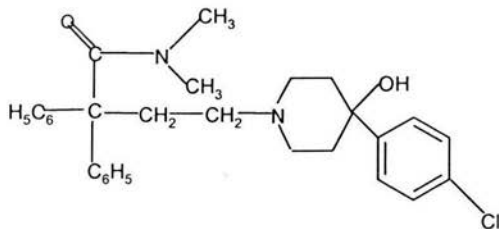
Terapéutica antibiótica.- los antibióticos no se recomiendan en los pacientes con infección con *Salmonella typhi*, *campylobacter*, *aeromonas*, *yersinia* o *E. coli*. en enfermedad grave.

En innumerables estudios se ha demostrado que es conveniente no usar antibióticos de rutina en diarrea aguda, ya que solo deben emplearse en casos de diarrea con sangre (disentería), cólera, giardiasis o en pacientes inmunocomprometidos, ya que en el resto de los pacientes la diarrea aguda es autolimitada (Kenneth y McQuaid, 2001)

De acuerdo a una revisión realizada en el Vademécum Farmacéutico (1998) sobre los fármacos utilizados para tratar la diarrea se encuentran los siguientes:

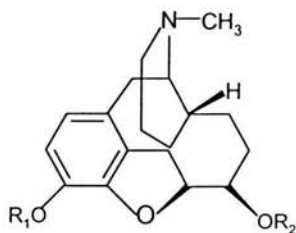
Atropina, belladona, caolín, homatropina, loperamida, opio, pectina, pizenzolato, clinidio, dicitolmina, escopolamina, fentonio, floroglucinol, hexahidroadifenina, hioscina, homatropina, isopramida, papaverina, pinaverio, prifinio, propantelina, trimebutina, trimetoxibenceno, ácido amino salicílico, sulfasalazina, cloramfenicol, diiodohidroxiquinoleína, ftalilsulfatiazol, furazolidona, metronidazol, neomicina, nifuroxazida, nifurzida, polinoxilina, succinilsulfatiazol, yodoclorohidroxiquinoleína., fenpiverinio, trihidroxibenceno.

A continuación solo se presentan algunas estructuras químicas, las más representativas de los fármacos antidiarreicos, debido a que son bastantes.



Loperamida (1)

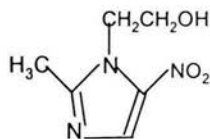
La loperamida(1) esta indicada en el control sintomático de las diarreas agudas y crónicas. Se adhiere al receptor opiáceo en la pared intestinal alrededor, inhibe la liberación de acetilcolina y prostaglandina, de ese modo reduce la peristalsis propulsiva, incrementando el tiempo de tránsito intestinal (Clarke,1978)



Opio

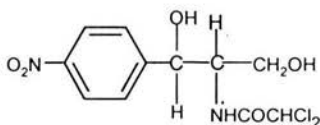
- Morfina: $R_1=R_2=H$ (2)
- Heroína: $R_1=R_2=COCH_3$ (3)
- Codeína: $R_1=CH_3, R_2=H$ (4)

Es el látex seco de la cápsula seminal verde de la amapola del opio y contiene alrededor de un 30% de una compleja mezcla de alcaloides como la morfina(2), heroína(3) y codeína(4) (Clarke.,1978)



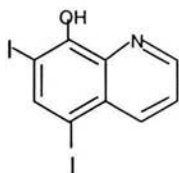
Metronidazol (5)

Se puede utilizar el metronidazol (5) cuando se sospecha infección por giardia, ya que mas de la mitad de las muestras de evacuaciones arroja resultados negativos en la detección de Giardia lamblia (Kenneth y McQuaid, 2001)



Cloramfenicol (6)

Algunas bacterias no muestran la marcada sensibilidad al cloramfenicol (6) que se encuentra a menudo en otros antibióticos, pero en su mayoría se inhiben con 1 a 4 µg/ml y la resistencia adquirida no es habitual (Jawetz *et al.*, 1999)



Diyodohidroxiquinoleina (7)

Otro de los fármacos empleados para tratar la diarrea, es el diyodoquin o 5,7-diyodo-8-hidroxiquinoleína (7)

2.4 PLANTAS MEDICINALES ANTIDIARREICAS

Existen varias plantas que son utilizadas en nuestro país para tratar la diarrea, además de otros padecimientos. A continuación se mencionan algunas plantas con antecedentes en enfermedades antiparasitarias y otras actividades biológicas evaluadas (tabla 2)

Tabla 2. Plantas utilizadas para tratar la diarrea.

NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO	ACTIVIDAD BIOLÓGICA
Ahuehuete	<i>Taxodium mucronatum</i>	Espasmolítica
Balletilla	<i>Hamelia patens</i>	Estimuladora de la respuesta contráctil
Cedro	<i>Cedrela odorata</i>	Anticercaria, antiasmática
Chirimoya	<i>Annona cherimola</i>	Antiparasitaria citotóxica
Cinco negritos	<i>Lantana camara</i>	Analgésica
Doradilla	<i>Selaginella lepidophylla</i>	Inhibidora de la respuesta contráctil
Epazote de zorrillo	<i>Telexys graveolens</i>	Fasciolicida
Escobilla	<i>Sida rhombifolia</i>	Antibacteriana
Guanábana.	<i>Annona muricata</i>	Citotóxica
Hierba del aire.	<i>Satureja brownei</i>	Antialérgica
Hierba del cáncer	<i>Cuphea aequipetala</i>	Citotóxica
Llantén	<i>Plantago mayor</i>	Antioxidante
Pericón	<i>Tagetes lucida</i>	Antimicrobiana
Poleo de monte	<i>Cunila lythrifolia</i>	Antiparasitaria
Rosillo	<i>Phyllanthus niruri</i>	Antibacteriana
Santa María	<i>Crysanthemum parhenium</i>	Analgésica
Sáuco	<i>Sambucus mexicana</i>	Citotóxica
Tapacola	<i>Waltheria americana</i>	Antimicrobiana
Tlalchichinole	<i>Kohleria olepeana</i>	Antiparasitaria
Verbena	<i>Verbena carolina</i>	Antioxidante.

Información obtenida de Márquez *et al.* Plantas Medicinales de México II. Composición, usos y actividad biológica. Instituto de Química, 1ª edición, Dirección General De Publicaciones y Fomento Editorial, 1999.

2.5 *Psidium guajava*

2.5.1 Descripción botánica

La especie *Psidium guajava* denominada comúnmente guayaba, pertenece a la familia Myrtaceae, Género: *Psidium*, Especie: *guajava* (Martínez *et al.*, 1997)

Es un arbusto o árbol de 4 a 10 m de altura, con la corteza lisa y de color café (Argueta y Cano, 1994).

Tronco generalmente torcido con la corteza de color pardo rojiza, hojas enteras olorosas al estrujarse, flores aromáticas de color blanco, fruto carnoso, redondeado de color crema amarillento con muchas semillas (Aguilar, 1994)

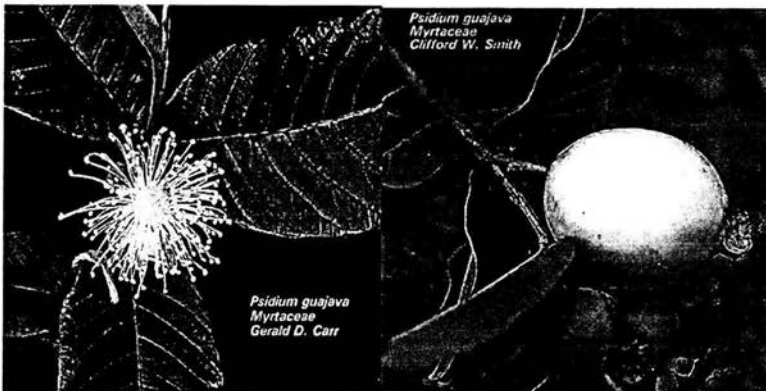
Ecología.

La guayaba es originaria de los trópicos del viejo mundo y se encuentra en climas cálido, semicálido, semiseco, seco y templado, desde el nivel del mar hasta los 2500 m.

Cultivada en huertos familiares, presente a orillas de caminos o de riachuelos, asociada a vegetación perturbada en dunas costeras, bosques tropicales caducifolio, bosque espinoso, matorral xerófilo de tipo subtropical, pastizal, bosque mesófilo de montaña, bosques de encino, de pino y de encino-pino (Argueta y Cano., 1994).

A continuación se presenta dos fotografías de la guayaba, en donde se puede apreciar su flor, hojas, y su fruto.

Figura 1. *Psidium guajava*



Fuente: Internet.

2.5.2 Nombres comunes

De acuerdo a Argueta y Cano, (1994) en varias regiones de nuestro país se le conoce a la guayaba de diferente manera.

Entre los nombres más comúnmente utilizados se encuentran lo siguientes:

Guava, guayabilla, guayabilla cimarrona, guayabo, guayabo morado, hojas de guayaba, palo de guayabo blanco.

Y en los diferentes estados de la República Mexicana los habitantes la conocen con distinto nombre, pero conocen sus importantes propiedades que nos ofrece. A continuación se muestra una lista de algunos estados y los nombres que le dan a la guayaba.

Chiapas: pata, pocs-cuy, potoj, potos, pox, sumbadam.

Guerrero: xaxokotl (náhuatl), xolxocatl.

Hidalgo: xalxocotl (nahuatl).

Michoacán : enendi (purhépecha).

Morelos : coloc, jaljocote, pichí, xalxócotl.

Nayarit: ca-arú ó carú (cora), ushca- aru (tepehuano).

Oaxaca : lacow (huave), tzon t kichi kichi, tzon t kichi nchjon, tzon t kichi (amusgo), jukoin papoxtik, pox.

Puebla: asiuit ó asiwit (totonaco), xaxokotl, xaxucotl (náhuatl); aci`huit, xalxocotl, xapeni, xocoyot.

Quintana Roo: pichí (maya), kolok, jul, pachi`, sakpichi.

Veracruz: asiwit, cuympatan, patan, pitchcuuy.

Yucatán : piichi`.

San Luis Potosí : bek (tenek).

En nahuatl significa arena agria.

2.5.3 Usos populares

La guayaba (*Psidium guajava*) es una planta que estudios anteriores han demostrado que es uno de los recursos antidiarreicos más difundidos en la medicina tradicional mexicana. (Lozoya *et al.*, 2001)

El uso medicinal de la infusión preparada con las hojas del árbol de guayaba para aliviar enfermedades gastrointestinales es una práctica común originalmente de la medicina tradicional azteca en México. (Lozoya *et al.*, 2002)

Diferentes partes de la planta son usados en la medicina tradicional para el tratamiento de varios padecimientos humanos como lo son heridas, úlceras, intestinos y cólera.

Las hojas jóvenes son usadas como tónico en enfermedades de la función digestiva. La cocción de las hojas es prescrita como espasmolítico. La corteza es valorada como astringente y como antidiarreico en niños. Las flores son refrescantes para el cuerpo y usadas para el tratamiento de bronquitis y enfermedad de los ojos. El fruto es un tónico y laxante. (Begum *et al.*, 2002)

Se ha encontrado que es utilizada con frecuencia en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, principalmente la diarrea. El tratamiento mas usual consiste en hacer una cocción o infusión con las hojas de guayaba y administrarla por vía oral tres veces al día o como agua de uso.

Los tzotziles usan la guayaba en té para aliviar la diarrea fuerte, debilidad, vómito, dolor de estómago.

En la Huasteca veracruzana y potosina, al igual que entre los mixes, zapotecas y totonacas, se le utiliza también para la disentería. El fruto comido en ayunas o preparado en cocción actúa como desparasitante, contra lombrices y amibas. Otro uso que tiene es para el " empacho " en Michoacán.

Entre los padecimientos de la piel que son tratados con la infusión o cocción de las hojas, aplicada de forma local en lavados, enjuagues o cataplasmas, están la caída de cabello, granos, salpullido, jotes, acné, prurito, sarampión, escarlatina y sarna.

Tradicionalmente y con frecuencia se recomienda en el tratamiento de enlechados, dolor de vientre, caries, sofocamiento, " cuajo ", " pujos ", " bilis ", " clasolado ", prurito, escarlatina, hemorragia vaginal, estimular la leche, heridas, hinchazón, tos, tos ferina, calentura, deshidratación y nervios entre otros (Argueta y Cano, 1994)

2.5.4 Farmacología

Son abundantes los estudios farmacológicos y toxicológicos que se han realizado con esta planta, entre los que se encuentran la actividad antibacteriana de las hojas de los extractos acuosos, salinos e hidroalcohólicos, frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhosa*, *Sarcina lutea*, *Neisseria gonorrhoea*, y los extractos metanólicos, acetona, n-hexano, frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *S. pyogenes* (Martinez *et al.*, 1997)

En 1993, Maurice demostró que el extracto alcohólico-acuoso tiene actividad sedativa, en dosis orales de 188.5, 377 y 1131 mg/Kg causa un decremento de la actividad motora por 90 minutos después de la administración de el extracto.

De acuerdo a Duke (2002), tiene propiedades antibacterianas, antidiarreicas, anti -HIV, antimutagénico, antioxidante, antiséptico, antiespasmódico, antitumoral, astringente, candidicida, expectorante, hipoglucémico, radioprotectivo, sedativo y vasoconstrictor.

Lutterodt en 1988 reporta que la administración intraperitoneal de fracciones liposolubles obtenidas a partir de extractos metanólicos de hojas de *Psidium guajava* provocan mo efecto sedante moderado sobre el sistema nervioso central en los ratones; el mismo autor en 1989 afirma que el extracto alcohólico conteniendo los flavonoides, quercetina y quercetin-3- arabinósido, inhibe el peristaltismo intestinal del cobayo *in vitro*, aplicados al baño donde se encuentra el tejido.

Lozoya *et al.*, en 1990 confirman la actividad antiespasmódica de los extractos acuosos y liposolubles de las hojas de guayaba en ileon de cobayo, inhibiéndose el peristaltismo, probada *in vivo* en el ratón, esta planta disminuye de manera significativa el tránsito intestinal.

También se ha demostrado que un extracto etanólico (al 80 %) y la fracción liposoluble del extracto metanólico de las hojas administrados por vía oral, el primero y por vía intraperitoneal en segundo, ejercen una actividad sedante en ratón. Asimismo se ha detectado la actividad antibacteriana *in vitro* contra *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans* y los extractos liposoluble y metanólico de las hojas inhiben el crecimiento *in vitro* de *Plasmodium falciparum*. (Argueta y Cano, 1994)

Las hojas de guayaba, semillas y frutos, han sido empleados para la prevención y tratamiento de la diarrea, diabetes y también tienen efecto antimutagénico.

Se ha reportado la actividad antimicrobiana de las hojas de *Psidium guajava* contra *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus* (Hidetoshi y Gen-ichi, 2002).

La capacidad antioxidante de algunos glucósidos de quercetina, principales constituyentes de las hojas de guayaba en el extracto metanólico, ha atraído la atención en la búsqueda para la aplicación de estos productos en otras áreas de la farmacología moderna (Lozoya *et al.*, 2002)

2.5.5 Fitoquímica

Investigaciones previas han demostrado la presencia de ceras, resinas, azúcares, aceites esenciales, β -sitosterol, y una mezcla de cuatro ácidos triterpenoides.

La presencia de quercetina y dos isómeros 3- α -arabinósidos : avicularina y guaijaverina (Seshadri y Krishna, 1964)

Estudios fitoquímicos realizados por diferentes grupos de investigadores sobre diferentes partes de la planta han resultado en el aislamiento e identificación de varios terpenoides, flavonoides y taninos (Begum *et al.*, 2002)

Los flavonoides derivan de la ruta del malonato y shikimato, emergiendo para ser importantes compuestos en la defensa y sobrevivencia de las plantas.

(Machikanti *et al.*, 1997)

Flavonoides como naringenina, flavona y flavonol, incluyendo kaemferol, morina y quercetina constituyendo un amplio grupo de metabolitos secundarios han sido reportados con actividades antibacterianas de las hojas de *Psidium guajava* (Hidetoshi y Gen-ichi, 2002)

De acuerdo a Harborne y Baxter (1999) la guayaba posee una lista grande de flavonoides entre los que podemos mencionar son los siguientes:

Avicularina, Guaijaverina, Quercetina 3- β -L- arabinopiranosido, Reynoutrina, Prodelphinidina B₁, Psidinina A, Psidinina B, Psidinina C, Psiguavina, Guajavina B, Eugenigrandina A, Guajavina A, Guavina A, Guavina C, Guavina D.

Las hojas contienen un aceite esencial rico en cariofileno, nerolidiol, 3-bisaboleno, aromandreno y para-selineno. También se han detectado el β -sitosterol, los triterpenoides como lo son el ácido oleanólico, ursólico, catególico y guayabólico; 10% de taninos derivados del ácido elágico y los flavonoides quercetina y quercetín -3- arabinósido.

En la raíz se ha detectado leucocianidinas, esteroles y ácido gálico. El fruto es rico en vitamina C (Argueta y Cano, 1994)

También se han encontrado una larga lista de triterpenoides de la guayaba entre los que se encuentran:

Ácido guajavanoico, obtusinín, ácido goreishico (Begum *et al.*, 200), guajavolide, ácidos guavenoico, oleanólico, guavanoico, guavacoumárico, 2 α -hydroxyursólico, jacoumarico, isoneriuoumárico, asiático, ursólico, maslínico, arjunolico y también ilelatifol-D (Begum *et al.*, 2002)

Meckes *et al.*, en 1996 reportaron que las propiedades relajantes de *Psidium guajava* del extracto hexánico son muchas y se atribuyen a terpenos especialmente óxido de cariofileno y β -selineno.

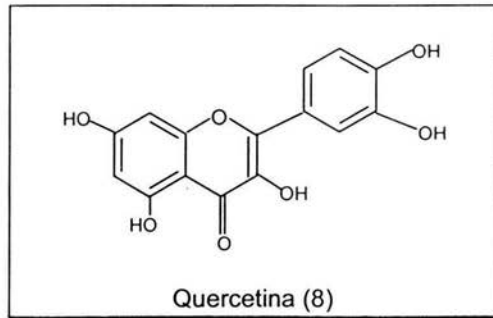
Ya desde 1978 Charles *et al.* reportaban que la guayaba poseía hidrocarburos terpénicos:

β -Pinenos, Limoneno, β -Copaeno, β -Cariofileno, Farneseno, α - y β -Humuleno, β -Bisaboleno, α -Selineno, β -Selineno, Δ -Canineno y Curcumeno.

También se reportan: vitamina C, aceite esencial, carbohidratos, taninos, flavonoides, esteroides y alcaloides (Martínez *et al.*, 1997)

A continuación se muestra la estructura química de la quercetina (8) flavonoide que le proporciona las propiedades antidiarreicas y antimicrobianas a la guayaba, además de varios glicósidos de flavonoides que se encuentran en mayor proporción en las hojas de *Psidium guajava*.

(Argueta y Cano. 1994)



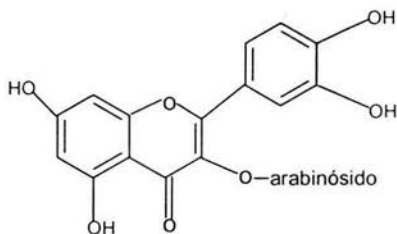
La quercetina influye sobre las fibras del músculo liso como un agente antagonista del calcio, y es responsable del efecto antiespasmódico y antimotilidad como un antiguo remedio (Lozoya *et al.* 2002)

En nuestros alimentos, la quercetina está usualmente glicosilada, unida a glucosa y rutinosa. Con altas concentraciones en: cebollas, té y manzanas.

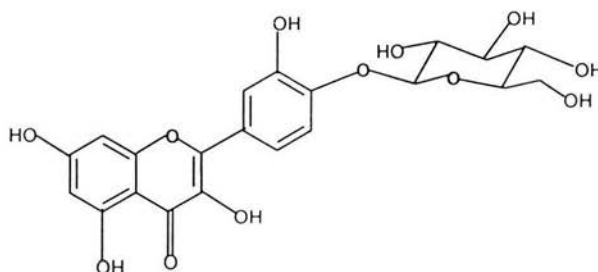
Algunos estudios epidemiológicos puntualizan los efectos benéficos de una dieta rica en flavonoides para la prevención de enfermedades cardiovasculares (Eva *et al.* 2001)

A continuación se muestran algunas estructuras químicas de los glicósidos de la quercetina 9, 10, 11 y 12.

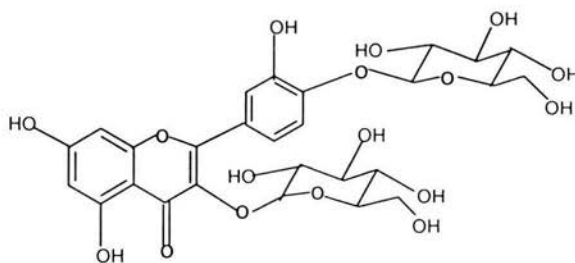
Flavonoides :



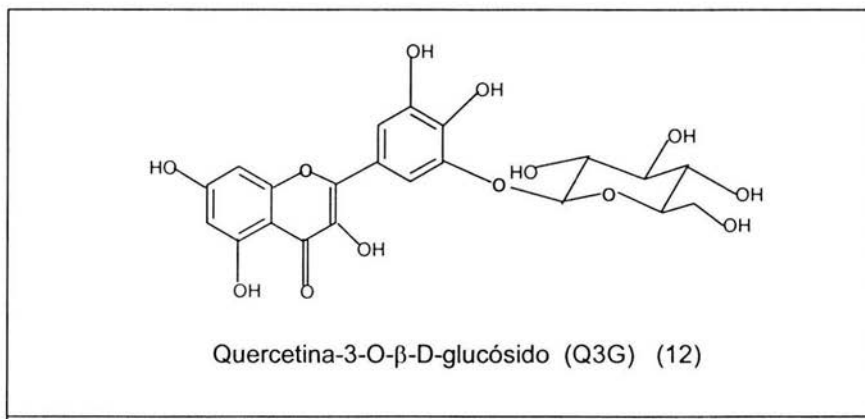
Quercetina-3-arabinósido (9)



Quercetina-4'-O-β-D-glucósido (Q4'G) (10)



Quercetina-3,-4'-di-O-β--D-glucósido (Q3,4'G) (11)

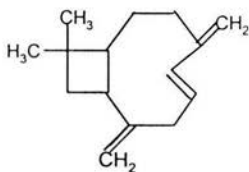


Los glucósidos de quercetina están considerados como compuestos muy eficaces de fitomedicinas (por ejemplo, en té) utilizados en el tratamiento de insuficiencia venosa crónica. Estos efectos protectivos derivan de la capacidad antioxidante y antirradicales libres que la quercetina muestra en muchos experimentos *in vitro* (Eva *et al.*, 2001)

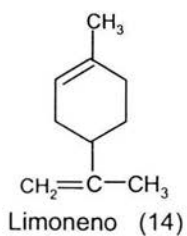
Las primeras investigaciones sobre la composición química de los aceites esenciales demostraron que entre los constituyentes fundamentales había hidrocarburos de fórmula $C_{10}H_{16}$; a estos hidrocarburos de 10 carbonos se les llamó **terpenos**. Luego se vio que algunos constituyentes, que también contenían 10 átomos de carbono, poseían funciones oxigenadas (alcoholes y cetonas, principalmente). Por otro lado, de las plantas también pueden aislarse a menudo otros componentes, menos volátiles, que contienen 15, 20, 30 o 40 átomos de carbono. A menudo se utiliza la palabra < terpeno > para designar genéricamente a todos estos compuestos (Pavia *et al.*, 1978).

A continuación se muestran algunas estructuras de terpenos (13,14 y 15),esteroles (16) y taninos (17,18,19 y 20) presentes en las hojas de guayaba.

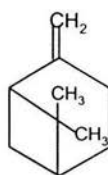
Terpenos:



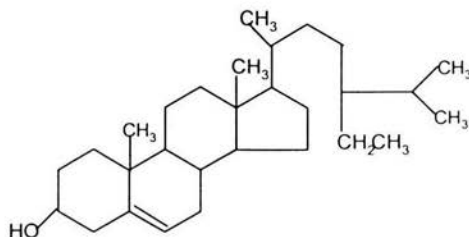
Cariofileno (13)



Limoneno (14)

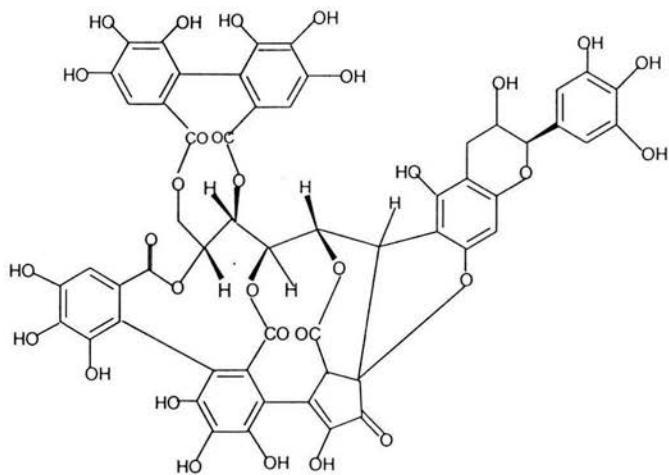


β -Pineno (15)

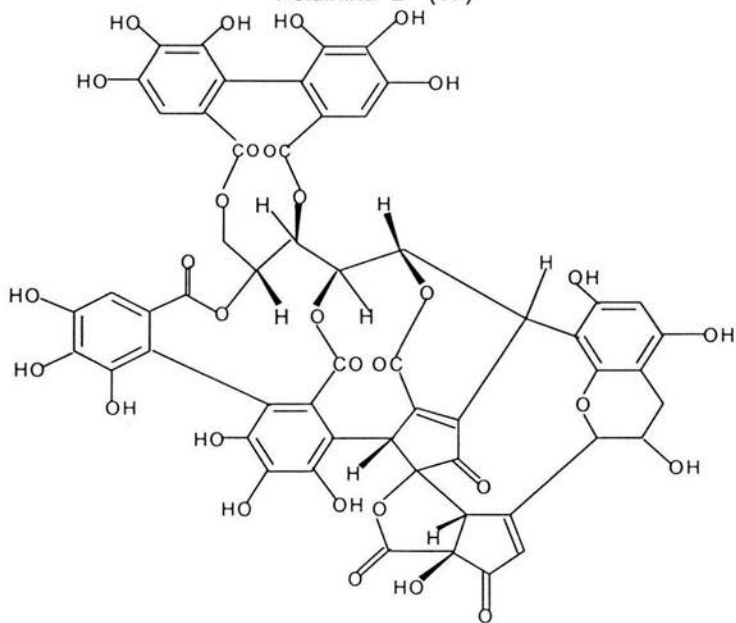


β -Sitosterol (16)

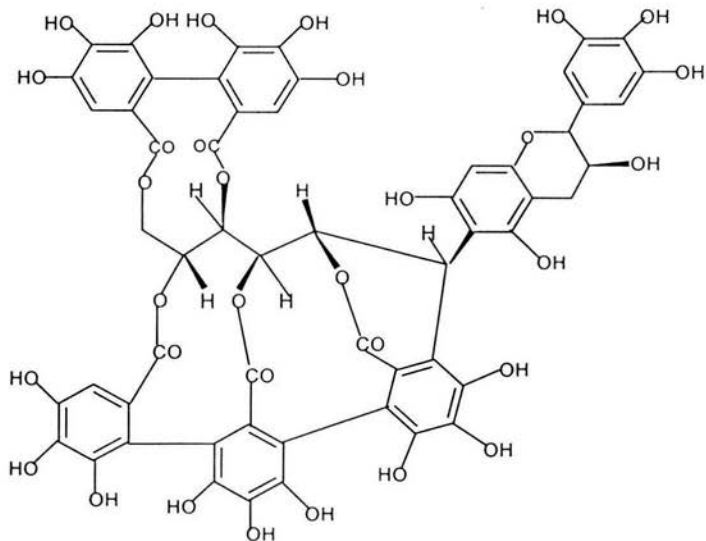
Taninos:



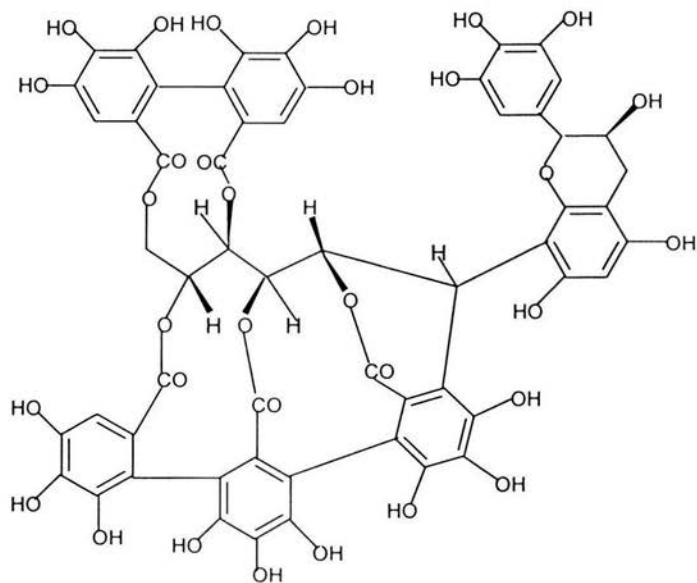
Psidinina B (17)



Psiguavina (18)



Guayabina B (19)



Eugenigrandina A (20)

2.6 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Las diferentes especies y cepas de un microorganismo tienen grados variables de susceptibilidad a cada uno de los antibióticos. Además la susceptibilidad de un organismo a cierto antibiótico puede cambiar, especialmente durante el tratamiento. Es importante que el clínico conozca la identidad del microbio y la del antibiótico del que se debe esperar el mejor resultado en el tratamiento.

La susceptibilidad de un microorganismo a un antibiótico y a otros agentes quimioterapéuticos se determina por dos técnicas principalmente: técnica de dilución en tubo y por la del disco en placa (Pelczar *et al.*,1977)

2.6.1 Método de dilución en tubo

Por esta técnica se puede determinar la cantidad más pequeña del agente quimioterapéutico requerida para inhibir el desarrollo del microorganismo *in vitro* esta cantidad se refiere como CMI (Pelczar *et al.*,1977)

Dicha técnica consiste en lo siguiente:

En una serie de tubos que contienen el medio de cultivo adecuado y sembrados con el microorganismo que se prueba, se ponen cantidades crecientes del antibiótico que se estudia. La concentración de cada tubo se indica con etiquetas en cada uno de los tubos. Uno de los tubos no contiene antibiótico y es de control.

Después de la incubación se determina la concentración de la droga necesaria para inhibir el desarrollo del organismo que se prueba por la falta de desarrollo

Serie de tubos a distintas concentraciones del antibiótico

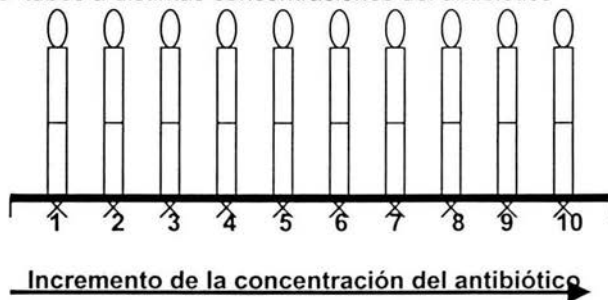


Figura 2. Método de dilución en tubo

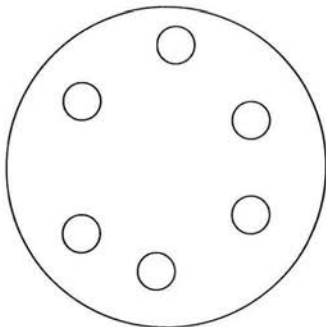
2.6.2 Método de difusión en agar o Kirby-Bauer

El método del disco en placa de agar es el que se usa comúnmente para determinar la susceptibilidad de los microorganismos (m.o) a los agentes quimioterapéuticos (Pelczar *et al.*, 1977)

Dicho método consiste en colocar pequeños discos de papel impregnados con cantidades conocidas del agente quimioterapéutico (disponibles en el comercio) sobre la superficie de una placa sembrada con los microorganismo a evaluar (Placa 1).

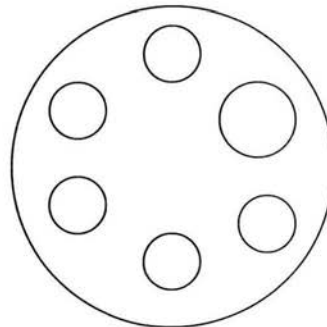
Los microorganismos deben estar a una concentración de 10^8 microorganismos/ mL.

Después de la incubación se examina la placa buscando zonas de inhibición del crecimiento microbiano alrededor de los discos. Una zona de inhibición (área clara) alrededor del disco indica que el microorganismo fue inhibido por el agente difundido en el agar desde el disco (Placa 2). Como se muestra en la figura 3.



Placa 1

Placa de agar sembrada con m.o y discos
Impregnados del agente antibiótico



Placa 2

Placa de agar donde se han
desarrollado halos de inhibición

Figura 3. Método de difusión en agar o Kirby- Bauer

El método del disco único para cada antibiótico es la prueba de susceptibilidad recomendada usualmente por la FDA de Estados Unidos; contiene una ligera modificación al procedimiento ideado por Bauer, Kirby, Sherris y Turck en 1966. Es una técnica muy normalizada en la que se especifica la cantidad del agente antimicrobiano contenido en el disco, así como el medio de prueba, volumen de inóculo, condiciones de incubación y otros detalles. Cuando la prueba de susceptibilidad se ejecuta conforme al procedimiento de la FDA se pueden correlacionar los tamaños de las zonas de inhibición con el CMI del agente para el microorganismo en cuestión; es posible determinar si el microorganismo es resistente o susceptible al agente antimicrobiano (Pelczar *et al.* 1977)

2.7 IMPORTANCIA DE LAS BACTERIAS EVALUADAS

Anteriormente se han reportado (Argueta y Cano.,1994) diversas pruebas contra microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *S. enteritidis*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Plasmodium falciparum*, *Bacillus cereus*, y *Candida albicans* etc, principalmente bacterias causantes de la diarrea.

En el presente trabajo se evaluaron las siguientes bacterias, por su importancia en provocar diarrea, además de que se tomaron en cuenta las bacterias disponibles en el laboratorio de Fitoquímica de la FES- Iztacala.

A continuación se mencionan los aspectos más relevantes de cada una de ellas (Wolfgan *et al.*, 1994)

Staphylococcus. Es un coco inmóvil, de 0.8 a 1µm de diámetro, que se divide en tres planos para formar grupos de células irregulares semejantes a racimos de uvas.

El staphylococcus es el único género de importancia médica en la familia *Micrococcaceae*. Entre las más de 20 especies de *Staphylococcus*, sólo tres tienen importancia clínica: *S.aureus*, *S.epidermidis*, y *S.saprophyticus*.

Cerca de un tercio de todos los aislamientos clínicos de *S.aureus* producen exotoxinas. Estas exotoxinas son miembros de un gran grupo de toxinas proteicas pirógenas que median un espectro de enfermedades con manifestaciones clínicas y compromisos orgánicos similares. Esta familia de toxinas incluye además de las enterotoxinas del estafilococo, la toxina 1 (TSST-1) y las exotoxinas estreptocócicas pirógenas A a C. Un rango característico de las enterotoxinas estafilocócicas es su capacidad de provocar vómitos y diarrea en el hombre después de una administración oral.

El estafilococo es un componente normal de la microflora humana nativa y es transportado de manera asintomático en diferentes partes del cuerpo. Su transmisión desde esos sitios causa la enfermedad que puede ser endémica.

El *Staphylococcus epidermidis* parece ser específico de huésped para los seres humanos. Todos los seres humanos transportan el microorganismo como parte de la flora normal de la piel; los sitios más frecuentes incluyen las axilas, cabeza, brazos, nariz y piernas. Por consiguiente el hombre sirve como una fuente exógena de contaminación para la infección de otros y como una fuente endógena. Casi todas las infecciones causadas por *S.epidermidis* son adquiridas en el hospital como resultado de la

contaminación de un sitio quirúrgico por los microorganismos provenientes de la piel del paciente o de su nasofaringe o del personal del hospital. Por lo general los aislamientos de *S.epidermidis* asociados con hospitales son resistentes a múltiples antibióticos, incluidas la meticiclina y la penicilina G.

Es el microorganismo único más común que infecta los catéteres intravenosos y en los últimos años es responsable de un incremento en el número de casos documentados de bacteremias verdaderas; además de causar infecciones en el tracto urinario en hombres de edad avanzada hospitalizados.

Shigella boydii. Las *Shigella* se presentan como colonias no fermentadoras de lactosa en los medios diferenciales que se emplean para el aislamiento de bacterias entéricas. Todas las especies son inmóviles, no producen H₂S y, con excepción de *S. flexneri*, serotipo 6, no producen gas a partir de glucosa. Estos factores las diferencian de la mayor parte de las *Salmonella*.

Las especies de *Shigella* constituyen las causas más importantes de la disentería bacilar, una enfermedad que se caracteriza por cólicos abdominales y la deposición frecuente y dolorosa de un escaso volumen de heces que contienen sangre y moco.

Como ocurre con casi todas las enfermedades el espectro de síntomas en la shigelosis varía desde la infección asintomática hasta la disentería bacilar grave con fiebre alta, escalofríos, convulsiones, cólicos abdominales, tenesmo y deposiciones sanguinolentas frecuentes. El paciente típico se presenta al comienzo con fiebre y diarrea acuosa que cambia al segundo día a deposiciones frecuentes pero de poco volumen de sangre y moco. Rara vez los microorganismos atraviesan la pared intestinal y se diseminan a otras partes del organismo.

Vibrio cholerae. Los vibriones coléricos son bacilos gramnegativos cortos (0.5µm por 1.5 a 3µm) que parecen tener forma de coma en el aislamiento inicial.

La motilidad se produce por medio de un solo flagelo polar grueso y envainado. El *Vibrio cholerae* es un microorganismo facultativo con una temperatura de crecimiento óptimo que varía de 18° C a 37° C. Su metabolismo es respiratorio y fermentativo. Los vibriones coléricos pueden crecer en una amplia variedad de medios simples cuando se les proporciona una fuente de hidratos de carbono, nitrógeno inorgánico, azufre, fósforo, minerales y soluciones reguladoras de pH adecuadas.

El género *vibrio* consiste en un grupo de diverso de microorganismos marinos que contienen 34 especies, 11 de las cuales causan enfermedades humanas.

El cólera es endémico en la región bengalí de la India y Bangladesh y desde allí se ha diseminado a otras partes del mundo en una serie de pandemias.

El cólera asiático clásico es una de las enfermedades humanas más devastadoras. El período de incubación puede ser de horas o días, con una media de 2 a 3 días. La diarrea

y los vómitos comienzan de forma brusca. La pérdida de líquidos en los casos severos se aproxima a 15 a 20 L /día. El líquido es seroso, inodoro y no contiene microorganismos entéricos. La pérdida de líquido puede llevar al shock hipovolémico y a la acidosis metabólica.

La diarrea causada por los microorganismos NO-01 en general es una enfermedad más leve, con la enorme pérdida de líquido observada en el cólera clásico. Estos microorganismos se aíslan de otros sitios del cuerpo y causan infecciones localizadas en las heridas y otitis media. Se ha descrito septicemia en pacientes con enfermedades subyacentes.

Sarcina lutea. *Sarcina lutea* es un microorganismo Gram. positivo que pertenece a la familia *Micrococcaceae*, se presenta en forma de esferas de 1.0 a 1.5 micras de diámetro, forma paquetes en todos los medios, produce indol de manera ligera, también produce sulfuro de hidrógeno, generalmente produce nitritos a partir de nitratos. Es un microorganismos aerobio, su hábitat es el aire, suelo y agua; también se encuentra en la superficie de la piel. Es un microorganismo muy sensible ya que es inhibido por concentraciones muy pequeñas de sustancias antimicrobianas.

Bacillus subtilis. Está presente en el aire, el polvo, el agua salada y las infusiones de materia vegetal. Se trata de un contaminante de laboratorio común, pero como el *B. cereus*, es capaz de producir una infección en el huésped comprometido. También se lo ha hallado en las bacteremias abrumadoras y en las infecciones oculares en los adictos a la heroína y se lo ha cultivado de la heroína de venta callejera. Las infecciones por esta bacteria suelen responder al tratamiento con los antibióticos β -lactámicos.

2.8 MÉTODOS GENERALES DE EXTRACCIÓN

La extracción es una operación de separación y purificación que tiene por objeto aislar una sustancia de la mezcla sólida o líquida en que se encuentra, mediante el uso de un disolvente (agua, éter etílico, éter de petróleo, benceno, cloroformo, acetato de etilo, etc.)

Por extracción se aíslan y purifican numerosos productos naturales, como vitaminas, alcaloides, grasas, hormonas, colorantes, así como las sustancias que intervinieron o se formaron en una síntesis orgánica (Domínguez, 1992)

Otra definición de extracción es la siguiente de acuerdo con Brewster (1978), La extracción es simplemente la separación de un componente de una mezcla o de una solución por medio de un disolvente. El proceso consiste en agitar una solución o una suspensión acuosa con un disolvente orgánico inmiscible y en dejar que los dos líquidos se separen. Los distintos solutos presentes se distribuyen en la capa orgánica o en la acuosa de acuerdo a sus solubilidades respectivas.

2.8.1 Extracción por arrastre de vapor

La destilación por arrastre de vapor es una operación, que permite aislar y purificar sustancias orgánicas. Puede emplearse con líquidos completamente inmiscibles con el agua, o miscibles con ella en cantidades muy pequeñas. Los vapores saturados de los líquidos inmiscibles siguen la ley de Dalton sobre las presiones parciales.

La destilación por arrastre de vapor, también es útil para separar sustancias volátiles, de otros compuestos indeseables, como resinas, sales inorgánicas, etc.

Cuando se destila una mezcla de líquidos inmiscibles, el punto de ebullición de esta mezcla permanece constante hasta que uno de los componentes ha desaparecido completamente. (Domínguez, 1992)

Algunas características de este método son las siguientes:

- Bajo capital necesario para adquirir los equipos y accesorios. Inclusive pueden ser móviles y usar diversas fuentes de energía. Proceso simple, versátil y flexible.
- Permite trabajar con volúmenes grandes de materia prima en cada corrida., incluso sin tratamiento previo, el tiempo de extracción no se altera, aunque si el rendimiento.
- Se produce degradación térmica en el aceite esencial obtenido, es decir, se inducen cambios químicos indeseables, como oxidación, hidrólisis y oligomerización.
- Altos costos operativos por carga de materia prima, debido a la necesidad de energía para producir el vapor de agua. (Cerpa, 2003)

2.8.2 Extracción por disolvente

La extracción puede ser, por el estado físico de los materiales: sólido-líquido y líquido-líquido.

Por sus características: discontinua (agitar una solución acuosa con éter etílico o isopropílico en un embudo de separación o agitar o refluir un sólido con un líquido y luego separarlos por filtración). Si se extraen sólidos se usan aparatos tipo Soxhlet, si se extraen líquidos con líquidos inmiscibles entre ellos, se usan extractores líquido-líquido, si el disolvente orgánico es más ligero que el agua, y si es más denso que el agua.

En la extracción sólido-líquido (extractor soxhlet), la sustancia que se extrae está contenida en un material sólido, junto con otros compuestos, los que deberán ser prácticamente insolubles en el disolvente utilizado.

En la extracción líquido-líquido, el compuesto se encuentra disuelto en un disolvente (A) y para extraerlo se emplea un disolvente (B) inmiscible en A. En la extracción discontinua, las fases (A) y (B) se agitan para incrementar el contacto entre ambas fases, con lo que el compuesto se distribuye entre ambas capas, de acuerdo con sus solubilidades en los dos líquidos. A una temperatura dada, la relación que guardan las concentraciones del soluto en cada disolvente, se denomina coeficiente de distribución o de partición K.

Los extractos obtenidos de soluciones acuosas, usualmente se desecan y luego se filtran antes de eliminar el disolvente. Para desecarlos se utilizan diversas sustancias higroscópicas, las cuales deben seleccionarse cuidadosamente para evitar posibles reacciones con el material extraído. Para obtener mejores resultados, conviene lavar la capa orgánica con una solución saturada de cloruro de sodio y después añadir el agente desecante (Domínguez, 1992)

Características:

- Es necesario un capital moderado para adquirir los equipos y los servicios auxiliares.
- Amerita usar equipos de vacío para obtener los aceites absolutos. Estos equipos poseen altos costos operativos en comparación con los de arrastre de vapor o EFS.
- El uso de disolventes orgánicos como alcoholes, hidrocarburos, éteres, etc., conlleva a establecer varias etapas adicionales de purificación si la esencia va a ser para consumo humano. Normas internacionales de calidad imponen límites muy exigentes en este aspecto. Esta restricción ha provocado buscar nuevos solventes y optimizar al máximo su recuperación, pero también ha elevado su costo y aplicación.
(Cepra, 2003)

Extracciones ácido-base. Una de las técnicas más importantes de extracción es la que se emplea para separar sustancias que son ácidas o básicas. La extracción ácido-base consiste más en una reacción química que en un simple reparto físico (Durst, 1985)

Los compuestos orgánicos ácidos pueden extraerse de sus soluciones en disolventes orgánicos agitándolos con una solución acuosa de hidróxido sódico al 5 ó al 10 por 100. Los ácidos orgánicos se convierten así en sus sales sódicas que son solubles en agua. El ácido clorhídrico diluido cumple una finalidad similar para extraer las bases de sus soluciones en disolventes orgánicos, pues convierte la sustancia básica (amoníaco o una amina orgánica, R_3N)^{*} en un clorhidrato soluble en agua ($R_3NH^+Cl^-$). Los clorhidratos de las aminas se transforman en aminas libres ($R_3NH^+Cl^-$) por adición de solución de hidróxido sódico.
(Brewster, 1978)

2.8.3 Extracción por centrifugación

Los aceites esenciales obtenidos por este proceso tienen características aromáticas superiores a los conseguidos por extracción por arrastre de vapor, gracias a no ser un proceso térmico.

- Los aceites obtenidos son más estables debido a los antioxidantes naturales presentes. Sin embargo, la fracción interna de la materia prima provoca un aumento de temperatura no controlable que conlleva a una degradación térmica y a un oscurecimiento del aceite.
- La anterior consecuencia provoca usar equipos de purificación adicionales para que el aceite cumpla con las normas internacionales de calidad. Estos equipos poseen altos costos operativos e incrementan el precio final del producto (Cerpa, 2003)

2.8.4 Extracción con fluidos supercríticos

A continuación se hace referencia a los fluidos supercríticos, debido a que en el presente trabajo se emplea hielo seco (CO_2) para obtener el extracto de las hojas de guayaba por medio de un procedimiento diferente al reportado en Bevan y Marshall (1994)

Estos últimos autores informaron el uso de los fluidos supercríticos en los procesos de extracción de productos naturales y como fase móvil de procesos cromatográficos.

Entre la variedad de fluidos supercríticos que existen; el bióxido de carbono (CO_2) es el más comúnmente utilizado, porque tiene temperatura y presión crítica comparativamente bajas: $31.1^\circ C$ y 73.8 bar (equivale a 72.83 atm)

El bióxido de carbono es el más efectivo para compuestos orgánicos particularmente moléculas orgánicas como ésteres, éteres y lactonas.

La extracción con fluidos supercríticos es una forma de extracción líquida donde la fase líquida usual ha sido reemplazada por un fluido supercrítico. Un fluido supercrítico es una sustancia que esta cerca del punto crítico.

Las propiedades químicas y físicas de un fluido supercrítico dependen de la temperatura y presión, ya que son un parámetro muy importante cuando se designa un fluido supercrítico para extracción y cromatografía.

La selección de un fluido en particular es importante. El disolvente mas familiar, el agua, es una pobre elección para extracción o cromatografía.

Entre los fluidos mas utilizados se encuentran los siguientes: amoniaco, óxido nitroso, etileno, etano, propileno, propano, hexano, agua y por supuesto bióxido de carbono.

El CO₂ tiene ventajas adicionales: no es flamable, químicamente inerte, inodoro, obtenible en un estado de alta pureza a alto costo, no presenta un problema de disposición como disolvente.

La extracción con fluidos supercríticos esta incrementando su uso como un método de preparación de muestras para el análisis de solutos en sólidos o de matrices líquidas. Tradicionalmente la extracción con fluidos supercríticos (SFE) fue por muchos años utilizada para el aislamiento a escala preparativa de compuestos en matrices de plantas por ejemplo: Café, frijol, frutos desecados y especias.

Utilizando dióxido de carbono como fluido supercrítico, las extracciones pueden desempeñarse bajo condiciones suaves reduciendo riesgos de degradación térmica y la pobre eficiencia de colecta de analitos volátiles que puede ocurrir algunas veces durante la extracción o destilación con solventes de aceites esenciales y compuestos de fragancias.

En el presente trabajo se emplea dióxido de carbono sólido de una manera más simple sin equipo sofisticado, sin calentamiento para obtener el extracto de las hojas de guayaba a temperatura baja y utilizando adicionalmente un disolvente.

De esta manera se logró emplear el hielo seco para extraer selectivamente mezclas de compuestos y posteriormente se evaluó su actividad antibacteriana.

2.9 CROMATOGRAFÍA

2.9.1 Definición

1. La cromatografía es una técnica de separación basada en la diferente velocidad con que se mueven los solutos a través de un medio estacionario mediante el flujo de un disolvente llamado eluyente (Watty, 1982)

2.9.2 Fundamento

La cromatografía se basa en las fuerzas competitivas, que dos fases, una fija o estacionaria, y otra continuamente renovada o móvil, establecen por las moléculas de un soluto.

La elución depende de la estructura molecular, resultando en que adquieren magnitudes distintas según se trate de un soluto u otro, de una fase estacionaria u otra, o de una fase móvil u otra (García y Del Castillo,1988)

2.9.3 Clasificación

Esta clasificación es en función de la naturaleza de la fase estacionaria, como se observa en la figura 4.

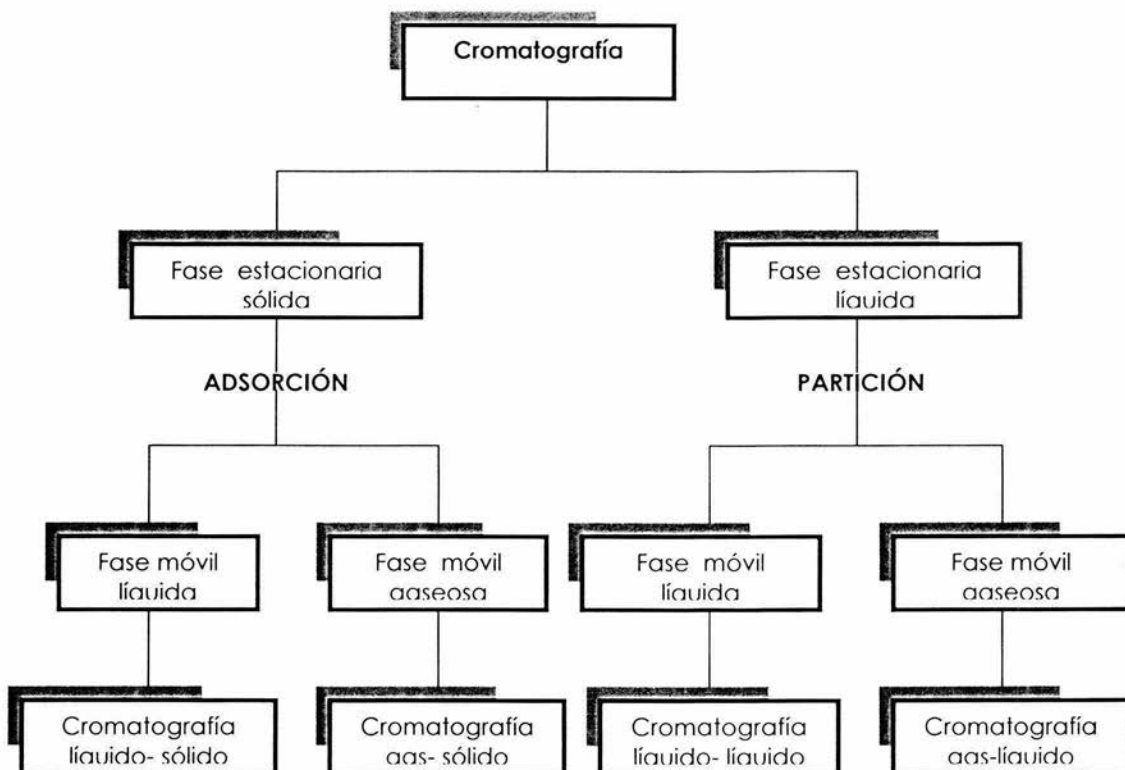


Figura 4.

La clasificación global de la cromatografía es como se muestra en la figura 5.

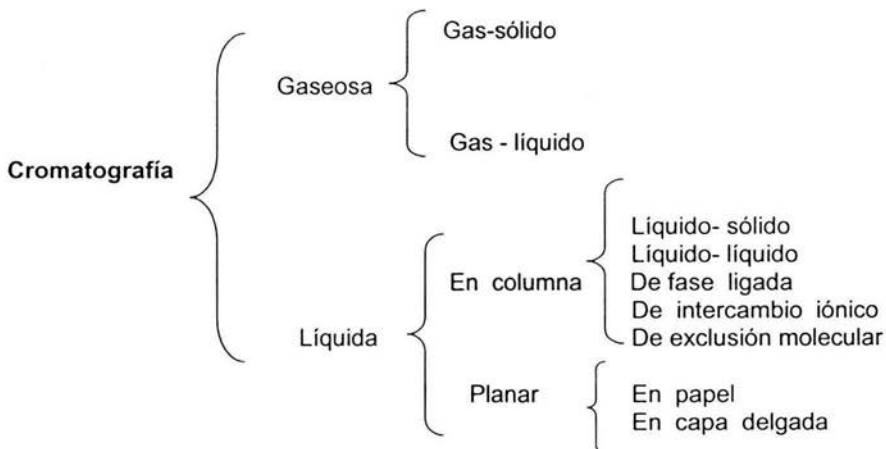


Figura 5.

2.9.4 Cromatografía de adsorción

La adsorción es un fenómeno de superficie que se manifiesta por un aumento de la concentración del soluto en la interfase que rodea el medio estacionario.

La separación esta basada en las diferencias de comportamiento, adsorción -desorción, de sustancias contenidas en la fase móvil sobre un sólido estacionario, y pueden ser sistemas líquido-sólido y gas-sólido.

En cualquier fenómeno de adsorción influyen tres variables: adsorbente, eluente y solutos.

La polaridad de las tres anteriores es importante, ya que influye en el comportamiento de una sustancia en disolución y en el poder adsorbente de la fase estacionaria. A mayor polaridad del soluto aumenta la adsorción, por lo cual se separan sustancias de media o baja polaridad. La regla general es elegir la polaridad del eluente análoga a la de la muestra, y en la mayoría de los casos adsorbentes activos para sustancias no polares y menos activos para las más polares (Watty, 1982)

Partición entre las fases líquida activa y la sólida estacionaria. El resultado de tales separaciones depende principalmente de la elección de las fases adecuadas, las cuales pueden dividirse en:

a) Fases normales

- fase estacionaria: polar (gel de sílice, alúmina, celulosa, etc.).
- fase activa: no-polar (hexano-éter-metanol).

b) Fases reversas

- fase estacionaria: no polar (geles de sílice modificados, nylon, poliestireno, etc.).
- fase activa: polar (metanol/ agua / acetonitrilo) (Fieser, 1976)

Dentro de la cromatografía de adsorción se encuentran:

- Cromatografía líquido-sólido. Algunas veces, al emplear alúmina como adsorbente ocurren cambios químicos; es decir, quimiosorción, durante el paso del soluto a través de la fase estacionaria. Se puede realizar en **capa fina o en columna**.
- Cromatografía gas-sólido. El material empleado como adsorbente debe presentar una estructura rígida, tamaño uniforme y ser químicamente inerte. Se realiza en columna (Watty, 1982).

2.9.4.1 Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina se usa para:

- Comprobar la pureza.
- En pruebas preliminares antes de la separación.
- En la comparación cualitativa con sustancias conocidas.
- Para llevar el control de las reacciones.

La identificación de las manchas puede realizarse mediante la revelación de las mismas por medio de:

- Luz ultravioleta
- La introducción de la placa en vapores de yodo.
- El rocío con una solución de agua-ácido sulfúrico (1:1) y después calentar intensamente (Fieser,1976)

El registro de la corrida cromatográfica se realiza marcando el R_f :

El valor del R_f (referencia frontal) depende de las condiciones en las cuales se corre el cromatograma(tipo de placa, eluyente, así como las condiciones de la placa, temperatura, vapor de saturación etc.), tiene una reproducibilidad de aproximadamente +/- 20%, por lo que es mejor correr el compuesto de referencia probable en la misma placa (figura 6)

$$R_f: \frac{\text{distancia recorrida por la sustancia}}{\text{distancia recorrida por el eluyente}}$$

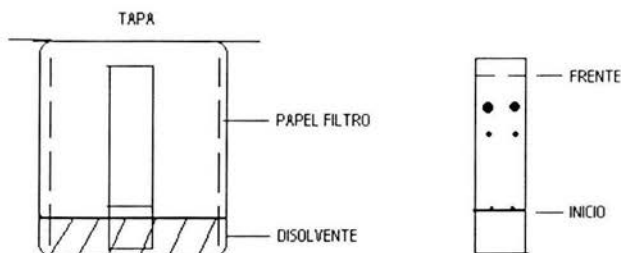


Figura 6. Cromatografía en capa fina.

2.9.4.2 Cromatografía en Capa Fina Preparativa

Su uso es en la separación preparativa de mezclas (es factible usarla hasta con aproximadamente 200 mg) en placas de 20 por 20 cm con un espesor de adsorbente de 2 mm.

2.9.4.3 Cromatografía en columna

Su uso es en la separación de cantidades variables de material desde unos cuantos miligramos y es posible separar 100 a 200 gramos.

La elección del eluyente depende de la polaridad de las sustancias que van a ser separadas, frecuentemente es necesario usar mezclas de disolventes. En general, se empieza con éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y mezclas de éstos. El diclorometano y el acetato de etilo también son buenos disolventes para muchas sustancias.

La fase estacionaria la constituyen adsorbentes de distintos tipos como gel de sílice, alúmina, carbón activado, tonsil, celulosa entre otros.

La relación entre la muestra y la fase estacionaria varía en relaciones que van de 1:10 a 1:25. De hecho la cromatografía en columna se realiza en un tubo de vidrio empacado con el adsorbente (generalmente sílica gel) empleando disolventes de polaridad creciente como fase móvil y colectando volúmenes pequeños de fase móvil que fluyen por la parte inferior del tubo de vidrio mencionado. Tales volúmenes pequeños o fracciones contienen compuestos de mayor pureza y a veces es probable que cristalicen sustancias en forma pura (figura 7) (Pavia *et al.*, 1978)

La cantidad mínima utilizada de una mezcla de disolventes debe ser tal, que el frente del disolvente alcance el final de la columna antes de que se aplique una mezcla de composición diferente.

Algunas precauciones que se deben de tomar considerar son las siguientes:

- no permitir que la columna se seque.
- La temperatura en el entorno de la columna debe mantenerse aproximadamente constante.
- Una corrida cromatográfica debe llevarse a cabo sin interrupción.
- Cuando se use alúmina, no utilizar acetona como eluyente, ya que se pueden encontrar productos de condensación entre los constituyentes principales del producto de élucion.
- Cuando se utilizan eluyentes con un punto de ebullición bajo (éter, pentano, diclorometano), especialmente cuando se cambian los disolventes, a menudo se forman burbujas en la columna (acanalamiento) y éstas, por lo general, evitan que se obtenga una separación satisfactoria. El uso de columnas en frío pueden prevenir este acanalamiento (Fieser, 1976)

Obtención de un extracto de las hojas de guayaba por un método criogénico y evaluación de su actividad antibacteriana

Para cromatografía en columna, a menudo es preferible utilizar una mezcla de eluyentes ligeramente menos polar que la que mostró ser la mejor para la CCF (Watty, 1982)

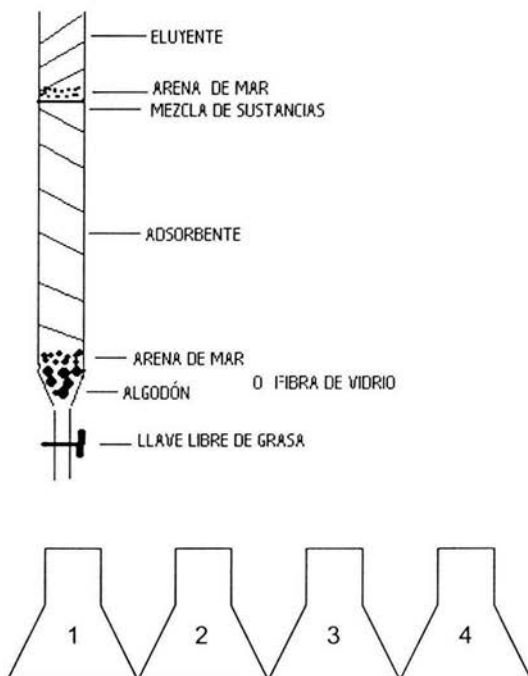


Figura 7. Cromatografía en columna.

A continuación se muestra la clasificación de la cromatografía por fase móvil (tabla 3)

Tabla 3. clasificación de la cromatografía por sistema de fase móvil

Fase móvil	Fase estacionaria	Técnica cromatográfica
vapor	Sólida	Cromatografía de gases (cromatografía gas-sólido)
	Líquida	Cromatografía de gases Cromatografía gas-líquido
Líquida	Sólida	Cromatografía de adsorción (partición líquido-sólido,CLS)
	Líquida	partición líquido-líquido,CLL

Información obtenida de Fieser. Experimentos orgánicos. 3^a ed. México: Ed. Limusa,1976.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3. Planteamiento del problema

De acuerdo a la Secretaría de Salud en su informe en el boletín semanal de epidemiología hasta enero del 2004 en las instituciones públicas y privadas el panorama epidemiológico se encuentra dominado por las enfermedades infecciosas transmisibles. Los primeros dos lugares lo ocupan las infecciones respiratorias agudas y las infecciones intestinales; en tercer lugar tenemos a las infecciones en vías urinarias; cuarto y quinto lugar lo ocupan la amebiasis intestinal y úlceras, gastritis y duodenitis.

Las enfermedades gastrointestinales ocupan un segundo lugar muy importante y es por ello que en el presente trabajo se aborda el tema de la diarrea ya que son miles los casos reportados anualmente, además de que en muchos casos es causa de muerte sobre todo en niños.

Anteriormente Lozoya *et al*(2002) han reportado métodos de extracción de metabolitos secundarios de las hojas de guayaba a temperatura ambiente los cuales han tenido actividad antibacteriana y actividad antiespasmolítica.

Considerando que los metabolitos secundarios son termolábiles, se plantea trabajar a baja temperatura, utilizando bióxido de carbono sólido como medio de trituración de las hojas de guayaba; con ello se pretende hacer una extracción selectiva de compuestos evaluando posteriormente su actividad antibacteriana.

OBJETIVOS

4. Objetivos

4.1 Objetivo General.

Extraer los metabolitos secundarios de *Psidium guajava* empleando baja temperatura y evaluar su actividad antibacteriana.

4.2 Objetivos Particulares.

Establecer las condiciones para llevar a cabo la extracción selectiva de metabolitos de las hojas de guayaba a baja temperatura.

Determinar que tipo de compuestos proporcionan la actividad antibacteriana.

Comprobar y comparar su actividad antibacteriana.

HIPÓTESIS

5. Hipótesis

Sometiendo el material vegetal (hojas de guayaba) a baja temperatura empleando CO₂ sólido, ser molido hasta pulverización y tratado inmediatamente con metanol, las células se romperán fácilmente permitiendo que el disolvente entre en ellas, logrando extraer selectivamente metabolitos secundarios y de esta manera evaluar su actividad antibacteriana.

MATERIAL Y EQUIPO

6. Material y Equipo

6.1 Extracciones y fraccionamiento

Material vegetal

Hojas de guayaba

Material de vidrio

- Matraz redondo de fondo plano 1000mL
- Probeta 1000mL
- Pipetas 5,10 mL
- Pipetas Pasteur
- Frascos viales
- Cámaras de élucion de diferente tamaño
- Columna para cromatografía
- Capilares
- Embudo de separación 1000mL
- Vasos de precipitado 500 y 1000mL
- Matraz Erlenmeyer 50,250 y 500mL
- Recipientes de tamaño diferente

Sustancias

- Quercetina (sigma)
- Sulfato cérico al 1%/ H₂SO₄ (revelador)
- Hielo seco

Disolventes (Purificados mediante destilación fraccionada, excepto el agua)

- Metanol
- Hexano
- Acetato de Etilo
- Agua destilada

Otros

- Mortero con pistilo
- Espátulas
- Termo
- Sílica gel flash
- Cromatofolio de gel de sílice G como indicador fluorescente marca ALUGRAM/ SIL G/UV₂₅₄

Equipo

- Lámpara de UV
- Espectrofotómetro IR Nicolet Magna IR TM 750 Y Perkin Elmer 283B
- Espectrofotómetro de RMN Varian Unity (300 MHz)
- Espectrofotómetro de RMN Jeol (300 MHz)
- Centrífuga
- Campana de extracción
- Balanza granataria
- Equipo para moler hielo seco
- Balanza analítica

6.2 Pruebas antibacterianas

Las cepas utilizadas para realizar las pruebas antibacterianas fueron las que se encontraban disponibles por parte de la FES Iztacala.

Material biológico

Staphylococcus aureus ATCC 12398
Staphylococcus aureus multirresistente
Sarcina lutea cepa de campo.
Staphylococcus epidermidis
Bacillus subtilis
Vibrio cholerae NO-01
Vibrio cholerae CDC V 12
Shigella boydii.

Sustancias

El medio de cultivo empleado para la preparación del inóculo bacteriano fue: caldo tripteína soya (Bioxon III)

El medio de cultivo sólido empleado para la prueba de difusión en agar fue un medio rico que permite el crecimiento de los microorganismos sin dificultad: Mueller- Hinton (Bioxon 110-1).

Material de vidrio

- Matraz Erlenmeyer 1000mL
- Cajas petri
- Probeta 100,500 y 1000mL
- Frascos viales

Obtención de un extracto de las hojas de guayaba por un método criogénico y evaluación de su actividad antibacteriana

- Tubos de ensaye
- Pipeta 1,5mL
- Vasos de precipitado 150mL
- Celdas para espectrofotómetro
- Pipetas Pasteur

Otros

- Gradilla
- Asa bacteriológica
- Espátula
- Mechero
- Algodón
- Papel destaza
- Maskintape
- Regla
- Gasa
- Guantes
- Tripié
- Tela de asbesto
- Hisopo estéril
- Discos de papel filtro Whatman No.5 de 5 mm de diámetro
- Pinzas estériles

Equipo

- Espectrofotómetro Spectronic 21 Milton Roy
- Incubadora (aparatos de laboratorio E-51 con termostato)
- Autoclave
- Balanza granataria

METODOLOGÍA

7. Metodología

7.1 Extracciones y fraccionamiento

7.1.1 A baja temperatura (CO₂)

Las hojas de guayaba fueron colectadas en Nepantla, Estado de México; en Marzo de 2003. Un espécimen fue depositado en el herbario "mexo" del jardín botánico que se encuentra dentro del Instituto de Química y fue identificado preliminarmente como *Psidium guajava* (actualmente se sigue identificando). Las hojas secas y molidas(100g) fueron colocadas en un mortero, se agregó el hielo seco en pequeñas porciones y se procedió a moler hasta que se obtuviera un sólido muy fino.(en total se trabajó con 3 Kg. de hielo seco)

Una vez obtenido el sólido se agregaron 600 mL de metanol, posteriormente se sometió a centrifugación (2200 rpm, durante 20' a 3°C). Se separó el sobrenadante del sólido y se colocó en un recipiente hasta sequedad bajo la campana de extracción.

Se obtuvo un sólido (3.6g) de color café.

Este extracto se sometió a pruebas de actividad antibacteriana.(**A**)

3.6% de rendimiento.

0.51g del sólido obtenido (extracto) se trataron con 50 mL de metanol y se colocaron en un embudo de separación, se extrajeron con H₂O/ acetato de etilo (700 mL/900mL) hasta la separación de fases. La fase acuosa se colocó en un recipiente bajo la campana para evaporarse hasta sequedad. Lo mismo se realizó con la fase orgánica (acetato de etilo)

La fase acuosa obtenida (0.8272g) fueron cristales de color café oscuro.(**C**)

La fase orgánica obtenida (0.77g) era un sólido de color café claro.(**D**)

Los sólidos (**C**) y(**D**) se sometieron a pruebas de actividad antibacteriana.

Una vez que se conocieron los resultados de las pruebas de actividad antibacteriana se realizó la siguiente separación:

0.77g del sólido (**D**) (se eligió este porque presentó mayor actividad antibacteriana respecto al sólido (**C**)) se colocaron en una columna cromatográfica y se eluyó con una mezcla de hexano / acetato de etilo (1:1)

Se obtuvieron 18 fracciones,(**E**) de las cuales se enviaron a pruebas antibacterianas las fracciones E1, E2y3, E4y5, E6, E7, E9 y E14.

Resultaron con actividad antibacteriana las fracciones E4,5 y E6, y posteriormente se enviaron a pruebas de identificación como espectroscopia de IR y RMN.

6.1.2 A temperatura ambiente

Las hojas utilizadas fueron tomadas del mismo lote.

100g de hojas fueron pesadas y colocadas en un matraz redondo de fondo plano, se agregaron 600mL de metanol y se dejaron por 24 horas a temperatura ambiente – proceso de maceración -. Posteriormente se vertió el líquido sobrenadante a un recipiente, y se llevó hasta sequedad bajo la campana de extracción.

Se obtuvo un sólido (7.6g) de color verde.(B)

Este extracto se sometió a pruebas de actividad antibacteriana.

7.6 % de rendimiento.

DIAGRAMA DE FLUJO DEL MÉTODO CON CO₂

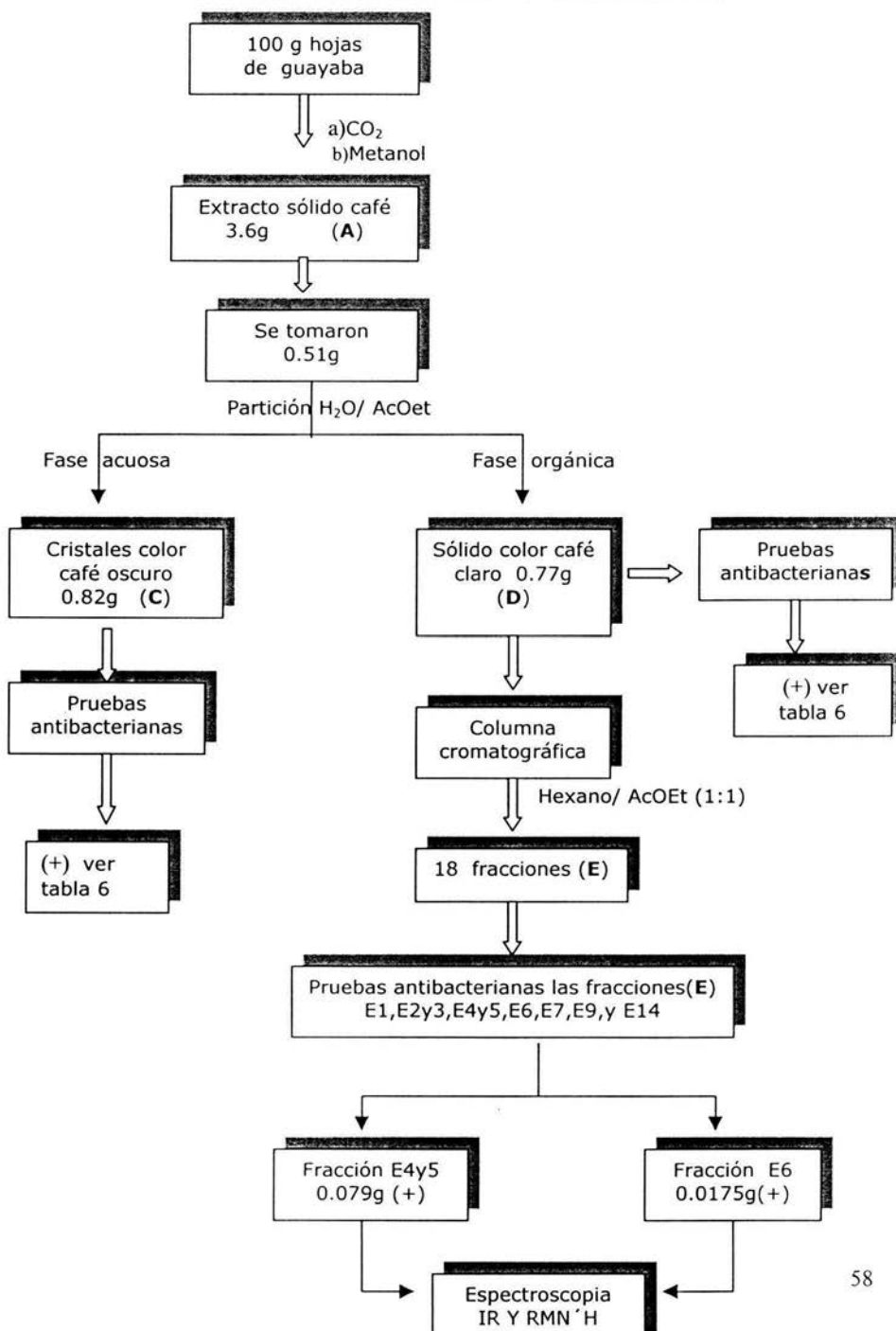
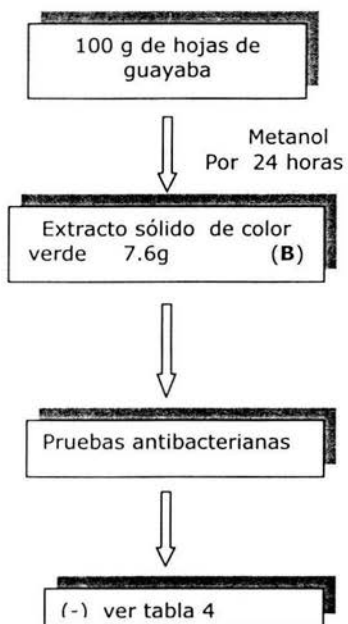


DIAGRAMA DE FLUJO DEL MÉTODO A TEMPERATURA AMBIENTE



7.2 Pruebas antibacterianas

Método empleado: método de difusión en agar o de Kirby-Bauer.

Este método se utilizó para valorar cualitativamente la actividad antibacteriana de los extractos y fracciones producto de la separación cromatográfica.

Medio. Se eligió como medio de cultivo el agar Mueller- Hinton (Bioxon 110-1), ya que promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos.

Inóculo. Con un hisopo estéril, se tocaron las superficies convexas de 4 a 5 colonias de los microorganismos a ensayar. Se sumergieron en 3 mL de caldo tripteína soya (Bioxon III). La suspensión microbiana se incubó a 37°C durante aproximadamente 2 a 3 horas, o hasta que la turbidez presentara una absorbancia de 0.3 a 660nm en el espectrofotómetro, lo cual equivale a una concentración de 10^8 microorganismos/mL.

Siembra de bacterias. Un hisopo de poliéster, estéril y seco se sumergió en la suspensión bacteriana que contenía 10^8 microorganismos/mL con este hisopo se sembró la superficie sólida de la placa de agar.

Preparación de sensidiscos. Se utilizaron discos de papel filtro Whatman No.5 de 5 mm de diámetro.

Preparación de las muestras. Los extractos **A** y **B** (10 mg c/u), los sólidos **C** y **D** (10mg c/u) y fracciones **E** (10 mg) se disolvieron en metanol y se impregnaron los discos de la solución correspondiente a cada compuesto, dejando evaporar el disolvente a temperatura ambiente durante 12 horas.

Cantidad colocada en los discos: 100 µg de los extractos, sólidos y fracciones.

Control negativo. El control negativo se preparó impregnando discos con metanol y se dejaron evaporar durante 12 horas (al igual que los experimentales).

Incubación. Una vez preparadas las placas para la prueba de susceptibilidad, se les colocó en una incubadora a 37°C por 24 horas.

La toma de datos consistió en medir los halos de inhibición (inhibición de crecimiento bacteriano) después de poner en contacto los discos impregnados con los compuestos a una concentración conocida sobre la superficie del agar solidificado y sembrado con los microorganismos a estudiar (estandarizados a una concentración de 10^8 microorganismos/mL)

Se evaluaron los dos extractos(A y B).

Posteriormente se evaluaron las dos fases acuosa(C) y orgánica (D).

Finalmente se evaluaron solo algunas de las fracciones obtenidas (E), las cuales fueron: E1,E2y3, E4y5, E6,E7,E9 y E14.

Las cajas petri se incubaron a 37°C durante 24 horas, después de este periodo se midió el halo de inhibición.

En cada caso los compuestos se evaluaron por triplicado y se reportan los valores promedio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8. Resultados y Discusión

A continuación se muestran los resultados preliminares obtenidos de los extractos que tuvieron actividad antibacteriana.

Tabla 4. Actividad antibacteriana de los extractos: empleando hielo seco (A) y a temperatura ambiente (B).

Bacteria	Extracto sólido café a baja temperatura (A)	Extracto sólido verde a temperatura ambiente (B)
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-
<i>S. aureus</i> multirresistente	+	-
<i>Sarcina lutea</i>	+	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+	-
<i>Vibrio cholerae</i> CDCV12	+	-
<i>V. cholerae</i> NO-01	+	-
<i>Shigella boydii</i>	+	-

(+) presentó actividad antibacteriana, (-) sin actividad antibacteriana.

Los resultados mostraron que el extracto **A** tuvo actividad antibacteriana contra cepas de bacterias gram (+) y gram (-), mientras que el extracto **B** no presentó actividad.

Comparando los dos extractos obtenidos se observó que existen diferencias significativas, como se muestra en la tabla 5

Tabla 5. comparación entre los dos extractos obtenidos: A y B

Características	Extracto sólido café a baja temperatura	Extracto sólido verde a temperatura ambiente
Temperatura de extracción	-40°C	23°C
Tiempo de extracción	3 horas	24 horas
Cantidad obtenida (g)	3.6	7.6
% de rendimiento	3.6%	7.6%
Cantidad de compuestos extraídos analizados por CCF	Menor cantidad	Mayor cantidad
Actividad antibacteriana	Activo	Inactivo

Los extractos se obtuvieron simultáneamente y probaron su actividad antibacteriana al mismo tiempo.

El peso del extracto obtenido a temperatura ambiente fue menor al obtenido a baja temperatura (tabla 5) Esto es debido a que al bajar la temperatura disminuye la solubilidad de compuestos; por lo que se lograron extraer aquellos poco solubles y polares.

El metanol puede extraer compuestos con solubilidad semejante; es decir compuestos que tengan en su estructura grupos funcionales como : -OH, (hidroxilo) -NH₂,(amino)-COOH,(carboxilo)-CONH (amido). Sin embargo, diferentes disolventes extraen diversos tipos de compuestos, pero siendo mezclas pueden extraerse polares en no-polares y no-polares en polares, aunque en pequeñas cantidades; por lo que el extracto A, puede contener compuestos no-polares como los hidrocarburos.

El extracto obtenido a temperatura ambiente (**B**) fue mayor en peso y por CCF mostró mayor complejidad (mayor # de compuestos)(figura 8)

Respecto al tiempo empleado en la extracción; el extracto (**A**) fue menor (3 horas) comparado con el extracto (**B**) que fue mayor (24 horas). Lo cual demuestra que empleando hielo seco se lograría obtener mas de dos extractos en un solo día.

Una característica muy importante del extracto obtenido con hielo seco fue que presento actividad antibacteriana; lo que demuestra que los metabolitos secundarios al ser extraídos a tan baja temperatura no sufren degradación térmica y son los que le proporcionan la actividad a las hojas de guayaba.

A continuación se muestra la placa cromatográfica de los dos extractos (**A y B**). En la placa se observó que ambos son una mezcla de compuestos (figura 8)

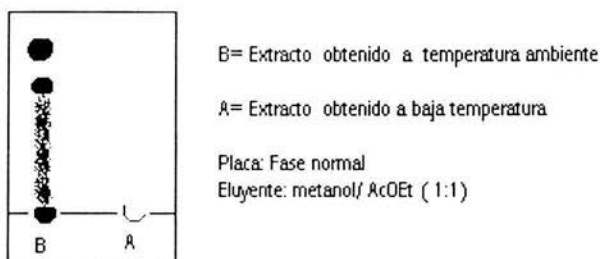


Figura 8. Perfil cromatográfico observado por los extractos **A y B** en CCF

Los siguientes resultados muestran la actividad antibacteriana que tuvieron las fases orgánica (D) y acuosa (C) del extracto obtenido empleando hielo seco.

Tabla 6. Actividad antibacteriana de C y D del extracto activo (A)

Bacteria	Fase orgánica (D)	Fase acuosa(C)
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	-
<i>S.aureus</i> multirresistente	12	-
<i>Sarcina lutea</i>	10	12
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	8	-
<i>Bacillus subtilis</i>	9	-
<i>V. cholerae</i> CDCV12	11	-
<i>V.cholerae</i> NO-01	10	-
<i>Shigella boydii</i>	12	7

Diámetro de los halos de inhibición en mm, control negativo: discos impregnados con el disolvente (MeOH) y tratados de igual manera que los experimentales.

Los resultados anteriores muestran que al separar el extracto activo (A) en fase orgánica (D) y en fase acuosa (C), la mayor actividad antibacteriana se encuentra en (D) y son compuestos medianamente polares porque se extraen con acetato de etilo como: éteres, cetonas, aldehídos y fenoles; y los compuestos polares se quedan en la fase acuosa además de sales orgánicas y algunos azúcares etc.

Dicho extracto mantiene su actividad antibacteriana, no hay degradación de compuestos, son estables a temperatura ambiente y no son fotosensibles (esta última característica se específica después de 3 meses aprox. de mantener las fases en frascos viales transparentes y posteriormente realizar la prueba antibacteriana).

A continuación se muestra el perfil cromatográfico de las dos fases obtenidas (C y D) (figura 9)

En la fase orgánica (D) se observan varias manchas separadas, pero en el punto de aplicación hay compuestos retenidos de mayor polaridad. Mientras que en la fase acuosa solo se observó la mancha del punto de aplicación y una mancha del mismo hacia arriba solo un poco, lo cual indica que hay mayor cantidad de compuestos en D y que son los activos.

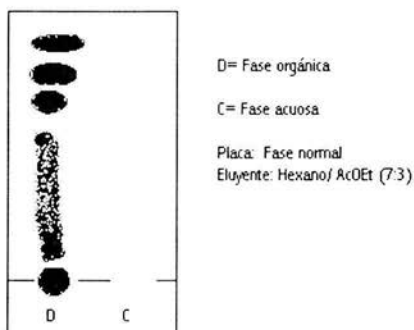


Figura 9. Perfil cromatográfico observado por las fases C y D en CCF.

De acuerdo a los resultados anteriores la fase (D) tuvo mayor actividad antibacteriana y fue interesante tratar de separar los componentes de dicha mezcla mediante CC, de la cual se obtuvieron las fracciones activas E4,5 y E6.

Tabla 7. Actividad antibacteriana de las fracciones E4,5 y E6.

Bacteria	E4,5	E6
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+
<i>S. aureus</i> multirresistente	+	+
<i>Sarcina lutea</i>	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+
<i>Vibrio cholerae</i> CDCV12	+	+
<i>V.cholerae</i> N0-01	+	+
<i>Shigella boydii</i>	+	+

(+) presentaron actividad antibacteriana.

La actividad sigue estando presente, aún cuando hubo fraccionamiento de la fase orgánica. Probablemente las fracciones que no resultaron con actividad antibacteriana se degradaron o solamente estas dos fracciones contienen los principios activos.

De acuerdo a la placa cromatográfica las fracciones son una mezcla de compuestos, las cuales se compararon con la quercetina, y los resultados muestran que no se trata de dicho compuesto, o por lo menos no se encuentra en forma libre, y probablemente esta presente en forma de glicósidos de la misma (figura 10)

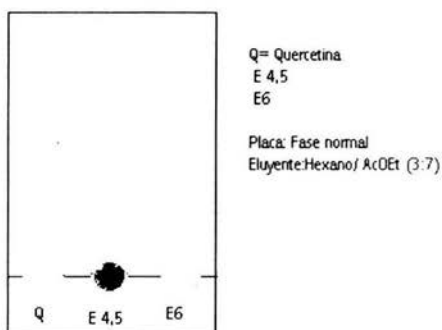


Figura 10. Perfil cromatográfico de las fracciones E4,5 y E6 comparados con la quercetina

A continuación se muestran las características físicas (tabla 8) y espectroscópicas (figura 11 y 12) de la fracción activa (E4,5)

Tabla 8. Características de la fracción E4,5.

Peso	0.079 g
Color	Amarillo claro
Consistencia	Poco viscoso, ceroso
Nº de compuestos	Por CCF se observaron al menos cuatro compuestos

El espectro de IR (figura 11) de la fracción E4,5 muestra las frecuencias de absorción que podrían corresponder a los siguientes grupos funcionales:

IR (Película) (ν) cm^{-1} : 3406, (-OH, -NH), 3088, (Aromático C-H), 2973, 2934, 2876, 2673, (Alifático C-H), 1800 a 1600 (grupo carbonilo (C=O) que pueden corresponder a ácidos, aldehídos, cetonas, amidas, ésteres, anhídridos, cloruros de ácido, 1374, (alcanos).

El espectro de RMN (figura 12) de la misma fracción muestran las siguientes frecuencias:

RMN de ^1H (CDCl_3) δ (ppm): 1.3 (m, 3H, CH_3), 3.3 (s, 2H, CH_2)

En el mismo sentido las características físicas (tabla 9) y espectroscópicas (figura 13 y 14) de la fracción activa **E6**

Tabla 9. Características de la fracción E6.

Peso	0.0175 g
Color	Amarillo claro
Consistencia	Polvo
Nº de compuestos	Por CCF se observaron al menos tres compuestos

El espectro de IR (figura 13) de la fracción E6 muestra las frecuencias de absorción que podrían corresponder a los siguientes grupos funcionales:

IR(Película)(v) cm^{-1} : 3383, (-OH), 2926, 2855, (-CH₃-CH₂, C-H, C-H- aldehído), 1800 a 1600 (grupo carbonilo (C=O) pueden corresponder a ácidos, aldehídos, cetonas, amidas, ésteres, anhídridos, cloruros de ácido.

En el espectro de RMN (figura 14) de la misma fracción muestran las siguientes frecuencias.

RMN ¹H (CDCl₃) δ (ppm): 0.7 a 1.3 (varios grupos -CH₃), 2.9 (d,2H, CH₂), 5.23(t,1H), 3.56 (m,1H)

Comparando le espectros de IR de la fracción E4,5 (figuras 11 y 12) y el la quercetina(figura 16) no se observan frecuencias similares, por lo que se constata que no hay quercetina presente en las fracciones.

Respecto a los espectros de RMN de ¹H de las fracciones E4,5 y F6(figura 12 y 14), comparados con el de la quercetina (figura 15) no se observan patrones de acoplamiento ABX y AB de la quercetina en la región de 6 a 8 ppm.

Por otro lado la señal triple en 5.23 ppm en el espectro de RMN de ¹H indica que en la fracción E6 se encuentra un compuesto que posee un hidrógeno vinílico, así mismo en 3.56 ppm se observa una señal múltiple que es asignable a un hidrógeno base de grupo hidroxilo.

Finalmente, en la región de 0.70 a 1.3 ppm se observa un conjunto de señales simples y muy intensas que indican la presencia de varios grupos metilo (7 CH₃).

Los datos anteriores indican que el compuesto de la fracción E6 corresponde a un derivado de naturaleza triterpénica o de un esteroles, aún cuando el β -sitosterol (figuras 17 y 18) ha sido aislado de las hojas de guayaba, existen otros esteroides que podrían dar características semejantes a los mostrados en este estudio.

Sin embargo, no se puede establecer con exactitud que triterpeno posiblemente sea, ya que las fracciones son una mezcla de compuestos y existe una gran variedad de estos compuestos que están presentes en las hojas de guayaba.

Por otra parte, a pesar de que la mayoría de los autores consultados (Lozoya, Eva U, Argueta y Cano.,etc) establecen que uno de los principios activos que le proporciona propiedades antimicrobianas, antiespasmolítica, antioxidante etc., a las hojas de *psidium guajava* es el flavonoide quercetina., en el presente trabajo no se logró detectar, o por lo menos no en su forma libre, ni combinada.

Por lo tanto se establece que en el presente trabajo, la actividad antibacteriana de las hojas de guayaba resultante, no se debe a dicho flavonoide, sino a una mezcla de compuestos triterpénicos o esteroides.

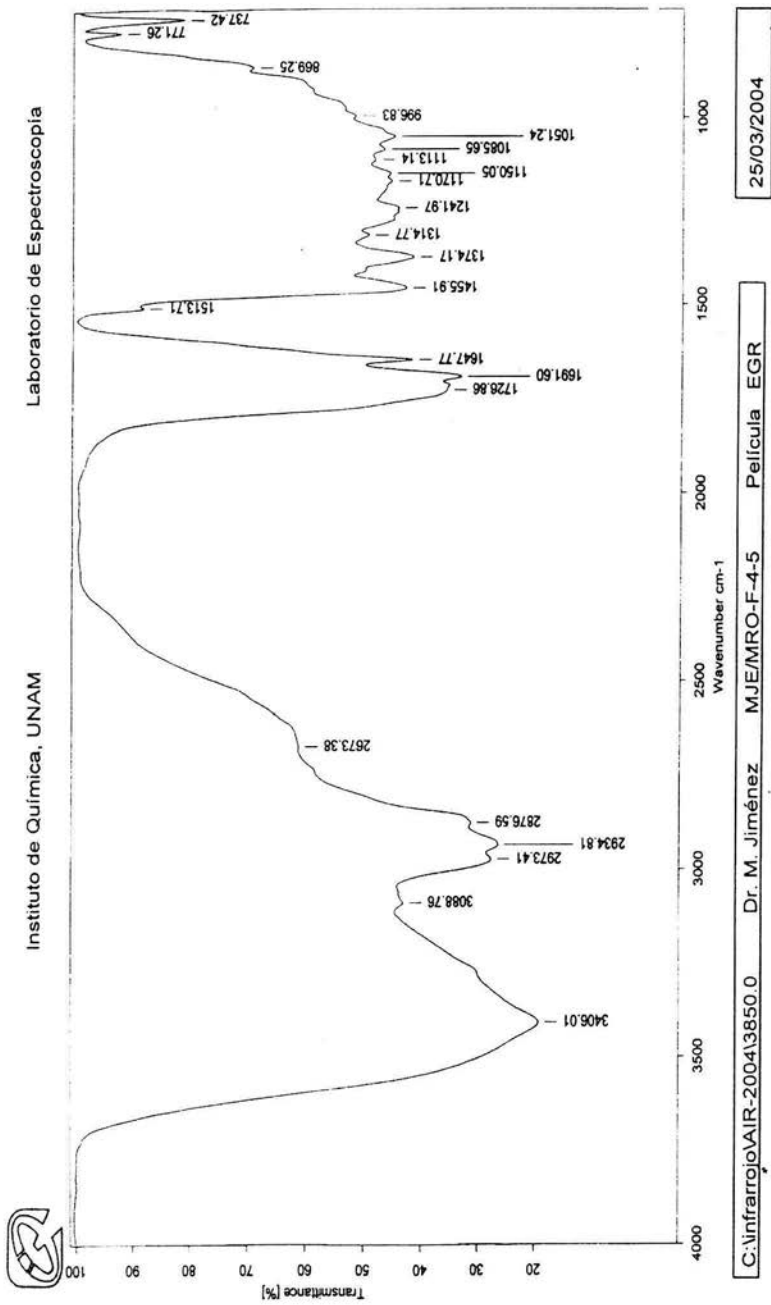


Figura 11. Espectro de infrarrojo de la fracción F4,5

UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA 492
Dr. Manuel Jimenez / Michel
Clave: MIE / MKO-F-5-4
Instrumento: CD-300 + dmsio-d6
Hidrogeno-1
Eclipse 300 Mhz Jeol (E)
30-III-2004
No. Reg. 1098

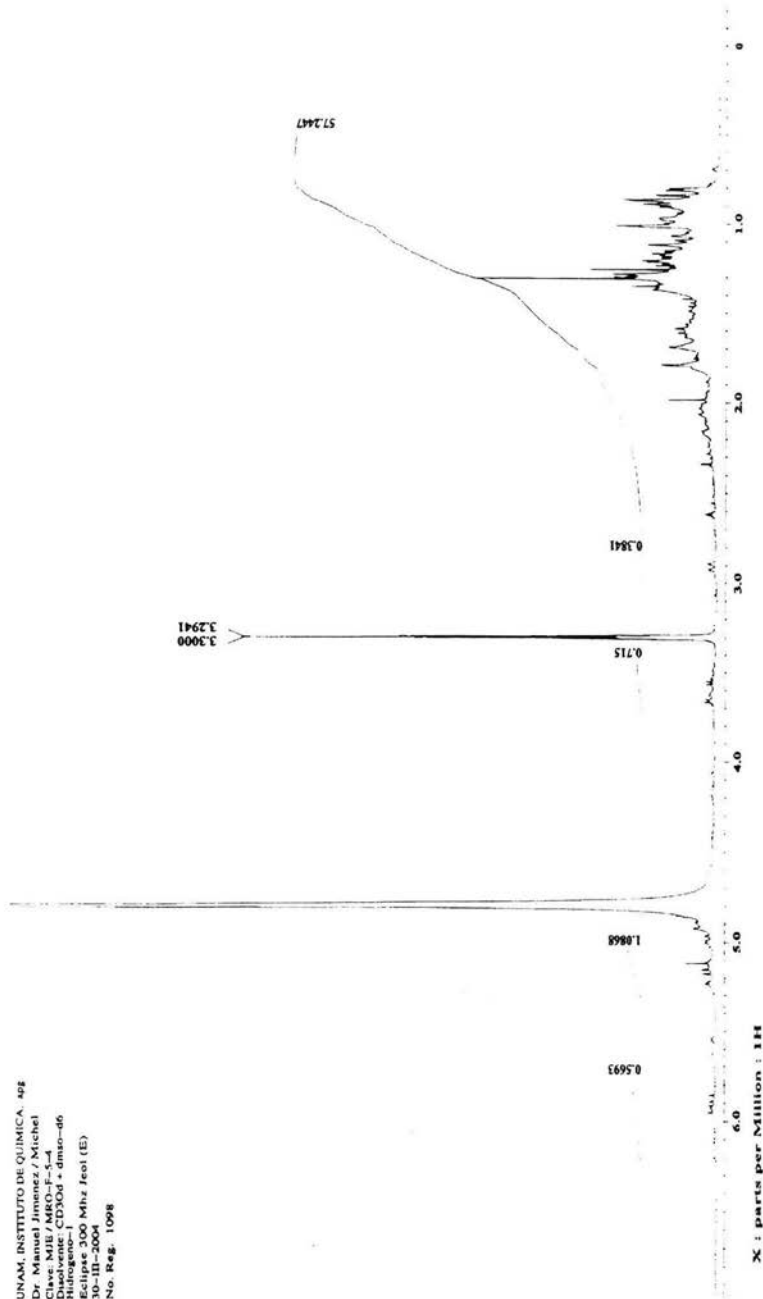


Figura 12. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz en $\text{CD}_3\text{OD}/\text{DMSO}-d_6$ de la fracción F4,5

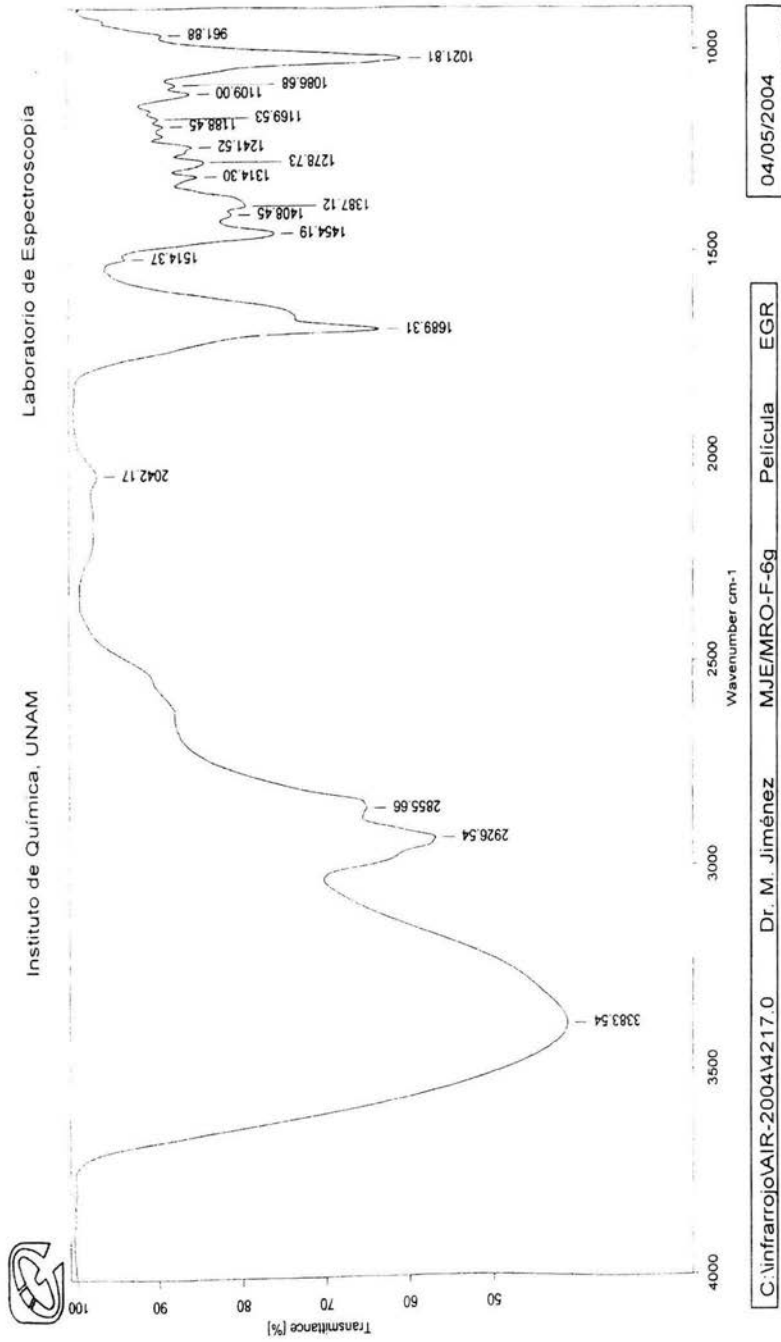


Figura 13. Espectro de infrarrojo de la fracción F6

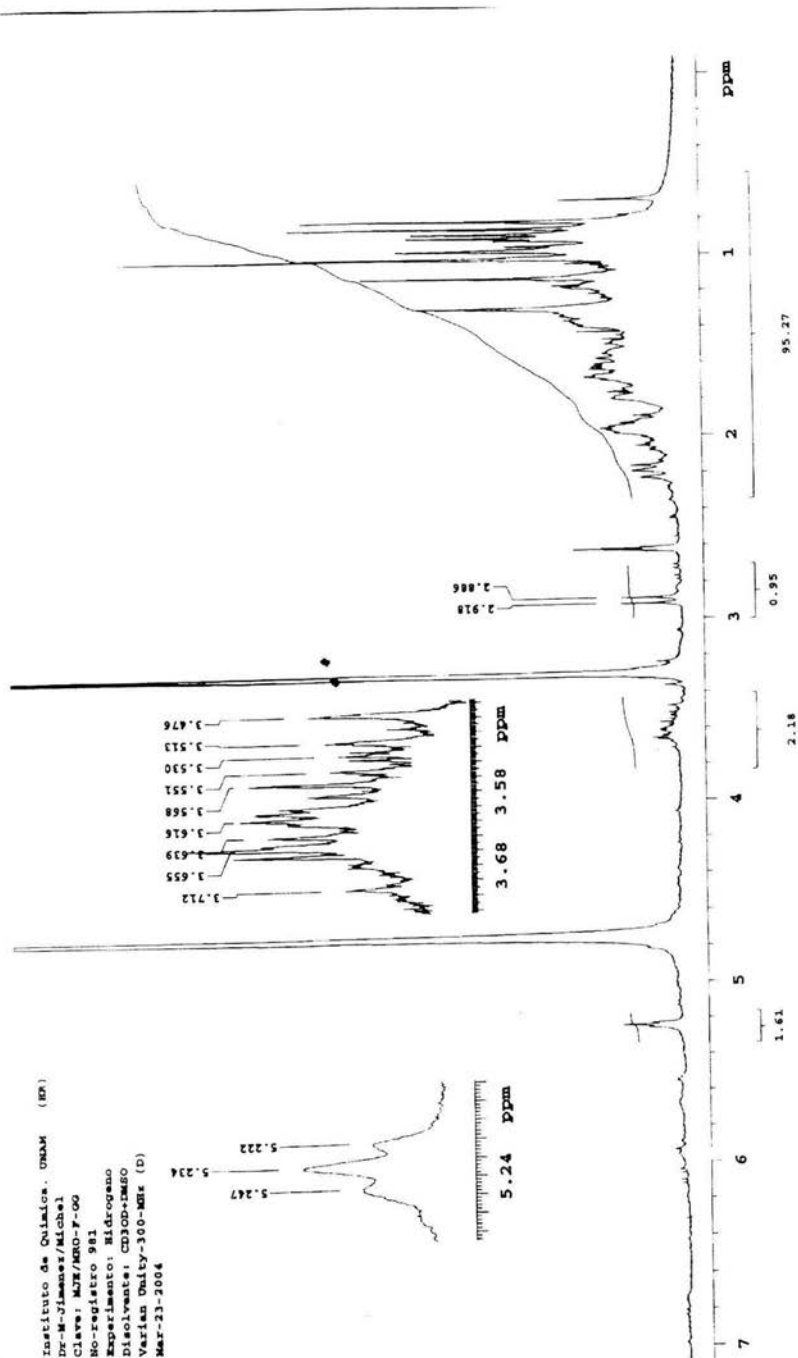


Figura 14. Espectro de RMN de ¹H a 300 MHz en CD₃OD/DMSO-d₆ de la fracción F6

Obtención de un extracto de las hojas de guayaba por un método criogénico y evaluación de su actividad antibacteriana

S340-2
 Sitosterol, N.F.
 M.W. 414.72 m.p. 139-142°
 $[\alpha]_D^{25} -37^\circ$ (c=2, CHCl₃) IR 1.1069G 2.1273A
 Primarily β -sitosterol

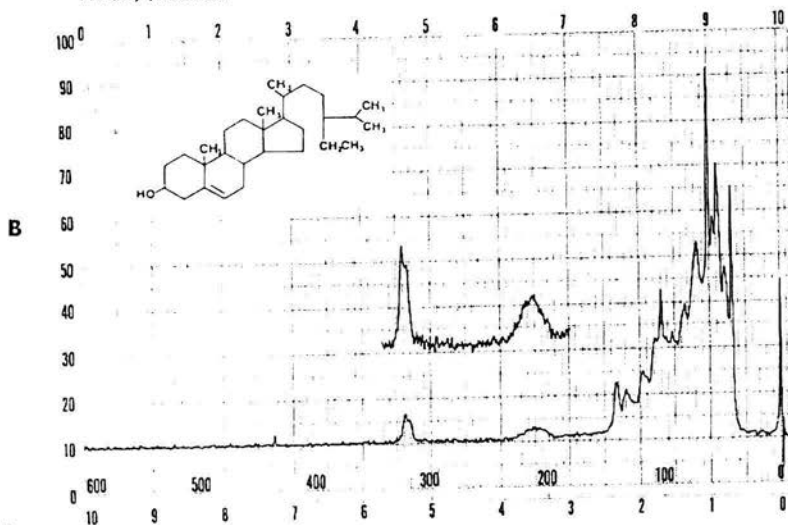


Figura 17. Espectro de RMN de ¹H de β -sitosterol, publicado en el catálogo Aldrich.

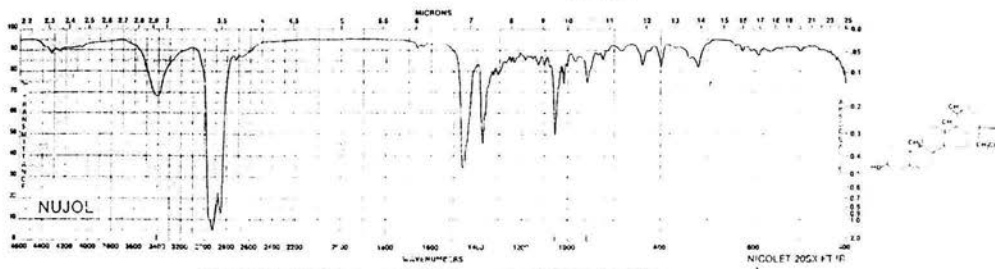
S340-2 CAS [83-46-5]
 Sitosterol, predominantly β -sitosterol

FW 414.72
 mp 139-142°C

IR III, 1494A
 NMR II, 2.920B
 Merck 10,8385

3410.8
 1057.6
 559.5

C



21465-5 CAS [10466-47-8]
 (+)-Stigmasterol, tech.

FW 416.74
 d 2.070

IR III, 1494B
 NMR II, 2.918D

3291.9 1334.1 1044.2
 3172.1 1253.4 957.2

D

Figura 18. Espectro de infrarrojo de β -sitosterol, publicado en el catálogo Aldrich.

CONCLUSIONES

9. Conclusiones

- ◆ El método de extracción a baja temperatura, de las hojas de guayaba es selectivo, porque logra extraer compuestos triterpénicos en su mayoría.
- ◆ El trabajar con hielo seco permite reducir el número de compuestos extraídos, facilitando la separación, purificación e identificación de los compuestos activos.
- ◆ El tiempo de extracción es corto.
- ◆ No se necesitan grandes cantidades de disolvente, ni equipos sofisticado.
- ◆ No hay degradación térmica de los compuestos.
- ◆ Se demostró que el extracto obtenido empleando hielo seco tuvo actividad antibacteriana, comparado con el extracto obtenido a temperatura ambiente.
- ◆ Las fracciones obtenidas son una mezcla de compuestos activos.
- ◆ Este método es una buena opción para aplicarlo a la extracción de compuestos sensibles a altas temperaturas en productos naturales.
- ◆ Por RMN ¹H se observa la fracción alifática de las mezclas de compuestos extraídos y que podrían ser de naturaleza triterpénica o de esteroides.
- ◆ Probablemente los compuestos extraídos sean una mezcla de ácidos carboxílicos triterpénicos o esteroides.
- ◆ No se logró detectar a la quercetina por cromatografía en capa fina.

RECOMENDACIONES

10. Recomendaciones

- ✦ Para obtener mayor cantidad en las fracciones finales, se recomienda trabajar inicialmente con una mayor cantidad de hojas de guayaba.

- ✦ Se recomienda realizar la separación de los componentes de las fracciones activas, para saber si en efecto la actividad antibacteriana corresponde a un solo compuesto o al conjunto.

- ✦ Así como también purificarlos y caracterizarlos.

- ✦ Probar la actividad biológica con otros microorganismos como hongos o levaduras y con parásitos.

- ✦ Realizar una corrida completa de la fracción 4,5 en RMN ^1H , para observar si hay compuestos aromáticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- www.who.int/en/
- www.rain-tree.com/guava.htm
- www.geocities.com
- Aguilar A. Plantas medicinales del herbario del IMSS. México D.F: Instituto Mexicano del Seguro Social, 1994: 146.
- Argueta A. Cano L.M. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana II. México D.F: Instituto Nacional Indigenista, 1994: 709-711.
- Arias V, Bernal P, Pérez T, Lalinde A, Ricaurte L, Vargas M. Características del proceso enfermedad-atención-muerte en niños con diarrea. Antioquia, Colombia. Bol Med Hosp. Infant Mex 2001;58:320-329.
- Begum S, Hassan S.I, Siddiqui B.S. Two new triterpenoids from the fresh leaves of *psidium guajava*. Letter Planta Med 2002;68:1149-1152.
- Begum S, Siddiqui B.S, Hassan S.I. Triterpenoids from *psidium guajava* leaves. Natural Product letters 2001; 16(3):173-177.
- Begum S, Hassan S.I, Siddiqui S.B, Saheen F, Ghayur M.N, Gilani A.H. Triterpenoids from the leaves of *psidium guajava*. Phytochem 2002;61:399-403.
- Bevan C.D. Marshall P.S. The use of supercritical fluids in the isolation of natural products. Nat. Product Reports 1994; 451-466.
- Brewster R.Q, Calvin A, Vanderwerf, McEwen W.E. Curso de química orgánica experimental. España: Editorial Alambra,1978.
- Boletín Semanal de Epidemiología. Secretaría de Salud 2004.,20(53):4-24
- Burrows. Tratado de microbiología. México: Editorial Interamericana,1979:2
- Cerpa C. (2003) ver www.geocities.com
- Charles W, Wilson, Philip E.S. Terpene hydrocarbons from *psidium guajava*. Phytochem 1978;17:1435-1436.
- Charles J.P. The aldrich library of NMR spectra. Edition II. Volume 2. United States of America:1983.

- Charles J.P. The aldrich library of FT-IR spectra. Edition I. Volume 2. United States of America:1985.
- Clarke E. Isolation and identification of drugs. Gran Bretaña: The Pharmaceutical Press,1978.
- Dávila G, Trujillo H, Vásquez C, Huerta M. Prevalencia de parasitosis intestinales en niños de zonas urbanas del estado de Colima, México. Bol Med Hosp. Infant Mex 2001;58:234-239
- Conley R. Espectroscopia Infrarroja. Madrid, España: Editorial Alambra,1979.
- Domínguez S. Xorge A. Química orgánica experimental. México.D.F: Editorial Limusa,1992.
- Duke J.A. Handbook of medicinal herbs. 2^a.ed. Estados Unidos de América: CRC Press LLC,2002:359.
- Durst H.D, Gokel G.W. Química orgánica experimental. España: Editorial Reverte,1985
- Eva U. Graefe, Joerg Witting y col. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. J Clin Pharmacol 2001;41:492-499
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 6^a.ed. SSA,1994.
- Fieser. Experimentos orgánicos. 3^a.ed. México: Editorial Limusa.1976.
- García de Marina A, Del Castillo B. Cromatografía líquida de alta resolución. México D.F: Editorial Limusa. 1988.
- Guerrant R.L. Principios y síndromes de infección entérica. En : Mandell G. Enfermedades infecciosas, principios y práctica. 3^a.ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana,1991:883-893.
- Harborne J.B, Baxter H. The handbook of natural flavonoids. Estados Unidos de América: Jhon Wiley and Sons, 1999:355,443,503,504,505,512.
- Hidetoshi A, Gen-ichi D. Isolation of antimicrobial compounds from *guava* (*psidium guajava* L.) and their structural elucidation. Biosci Biotechnol Biochem 2002;66(8):1727-1730.

Obtención de un extracto de las hojas de guayaba por un método criogénico y evaluación de su actividad antibacteriana

- Jawtez, Melnick , Alderberg. Microbiología médica. 16^a ed. México D.F:Editorial El Manual Moderno,1999.
- Katzung G.B. Farmacología: autoevaluación y repaso.2^a.ed México DF: El Manual Moderno,1999:673-675.
- Kenneth R, McQuaid. Aparato digestivo. En: Tierney L. Diagnóstico clínico y tratamiento.36^a.ed.México DF: El Manual Moderno, 2001:547-561.
- Laidler K.J, Meise J.H. Físicoquímica. México. D.F: Compañía Editorial Continental,1998.
- Larrosa Haro A, Ruiz Pérez M, Aguilar Benavides S. Utilidad del estudio de las heces para el diagnóstico y manejo de lactantes y preescolares con diarrea aguda. Salud Pública Méx. 2002;44:328-334.
- Lin J, Puckree T, Mvelase T.P. Anti-diarrohoeal evaluation of some medicinal plants used by zulú traditional healers.J Ethnopharmacol 2002;79(1):53-56.
- Lozoya X, Becerril G, Martínez M. Modelo de perfusión intraluminal del ileon de cobayo *in Vitro* en el estudio de las propiedades antidiarréicas de la guayaba (*psidium guajava*). Arch. Invest. Méd.1990;21(2):155-162.
- Lozoya X, Reyes Morales H, Chávez Soto M.A, Martínez García M.C, Soto González Y, Svetlana V. Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. J Ethnopharmacol 2002;83:19-24.
- Machikanti P, Natarajan S, Thara, Reddy A.R. Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids. Phytochem 1997;46(3):499-502.
- Márquez A. C, Lara O.F, Esquivel R. B, Mata E. R. Plantas medicinales de México II, composición, usos y actividad biológica. México DF: DG de Publicación y Fomento editorial,1999.
- Martínez M. J, Molina N. Boucourt. Evaluación de la actividad antimicrobiana del *psidium guajava* L. Rev Cubana de Plant Med 1997;2(1):12-14.
- Maurice M.I. Handbook of african medicinal plants. Estados Unidos de América: CRC Press LLC,2002:359.
- Meckes M, Calzada F, Tortoriello J, González J.L, Martínez M. Terpenoids isolated from *psidium guajava* hexane extract with depressant activity on central nervous system. Phytothe 1996;10(7):600-603.

Obtención de un extracto de las hojas de guayaba por un método criogénico y evaluación de su actividad antibacteriana

- Osman A.M, El Gargy Y, Sheta A.E. Triterpenoids of the leaves of *psidium guajava*. Phytochem 1974;13:2015-2016.
- Pavia D.L, Lampman G.M, Kriz G.S. Química orgánica experimental. España: Editorial Universitaria de Barcelona,1978.
- Pecksok R, Donal L. Métodos modernos de análisis químico. Editorial Limusa,1983.
- Pelczar M, Reid D.R, Chan C.S. Microbiología.2^a.ed. México.D.F: McGrawHill,1977.
- Pretsch E, Cleric T, Seilb, J, Simon W. Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos. Madrid, España: Editorial Alambra,1980.
- Rémington G.A. Farmacia.19^a.ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana;1999.
- Silverstein, Basster, Morrill. Spectrometric identification of organic compounds. Fifth edition. Estados Unidos: Woges Publications,1988.
- Stting M. Pharmaceutical manufacturing encyclopedia.2^a.ed. United States of America: Woges Publications,1988.
- Takana T. Ishida N, Ishimatsu M, Nonaka G, Nishioka I. Tannins and related compounds. CXVI. Six new complex tannins, guajavins,psidinins and psiguavin from the bark of *psidium guajava* L. Chem Phar Bull 1992;40(8):2092-2098.
- The Merck Index. 20^a.ed. Nueva York; Whitehouse station,1996.
- Terrés S. A.M, Casas T. L. Enfermedad diarreica e intolerancia a la lactosa en México. Rev Méd IMSS 2002;40(4):329-341.
- Seshadri T.R. Vasishta K. Polyphenols of the leaves of *psidium guava-quecetin*,guajaverin,leucocyanidin y amritoside. Phytochem 1965;4:989-992.
- Vademécum Farmacéutico, 7^a.ed. Colombia: Rezza Editores.1998.
- Watty. Química analítica. México.D.F: Editorial Alhambra mexicana,1982.
- Wolfgan K. Joklik D, Phil, Hilda P, Willett P.H. Zinsser. Microbiología.20^a.ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana,1994.