

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS ACEITES  
ESENCIALES DE EUCALIPTO Y ORÉGANO SOBRE  
*Helicobacter pylori*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ò L O G O

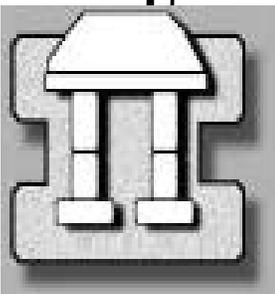
P R E S E N T A:

AMALIA JUSTINA PACHECO VASQUEZ

ASESOR:

BIÒLOGO: GABRIEL MARTÍNEZ CORTÈS

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MEXICO 2008





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

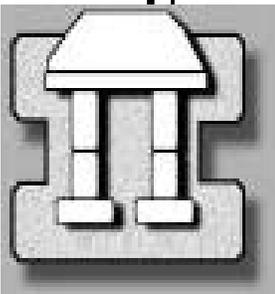
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS ACEITES  
ESENCIALES DE EUCALIPTO (*Eucalyptus globulus*) Y  
ORÈGANO (*Lippia graveolens*) SOBRE *Helicobacter*  
*pylori*.



LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MEXICO 2008

Aprendí que no se puede dar marcha atrás, que la esencia de la vida es ir hacia adelante. La vida, en realidad, es una calle de sentido único.

Agatha Christie

## *AGRADECIMIENTOS*

Gracias Dios, por que me has dado la dicha de estar viva.

Esta tesis esta dedicada a todas aquellas personas que son y serán parte fundamental para toda mi vida:

A mis padres Othoniel e Isabel que sin ellos no seria la mujer que hoy soy gracias por entregarme su amor incondicional, pero sobre todo por darme las fuerzas y las armas para poder dirigir mi vida los amo.

A mis hermanos Claudia, Yesmin, Otho y Eduardo gracias ya que en este recorrido ha sido muy importante su apoyo en todos los sentidos y gracias por sus comentarios ya que me sirven para ser un mejor ser humano.

A Peluso gracias por haber echo mi vida mas bella tu seguirás siendo parte fundamental de mi.

A mi hijo Aníbal que eres el gran motor que mueve mi vida gracias por darme tanta alegría te amo cachorro.

Gerardo gracias por los buenos y malos momentos que hemos compartido durante este tiempo ya que nos han servido para seguir adelante tu sabes que te amo.

A mis amigos de la carrera gracias por brindarme su amistad incondicional ya que para mi es muy valiosa gracias.

Al laboratorio de Fotoquímica y a los Profesores que elaboran en el por dejarme ser parte de este laboratorio y por creer en este proyecto.

A mis Asesores de Tesis:

Doctor. Pedro Ramírez García.

M en C. David Segura Cobos.

Biol. Marcial García Pineda.

Por ayudar a pulir este proyecto ya que fueron una parte importante gracias.

A mi Asesor Gabriel Martínez Cortés por proponerme ha realizar este proyecto, por tenerme paciencia y enseñarme a ver la vida desde otra perspectiva ya que más que un profesor lo considero un amigo de verdad gracias.

A el M en C. Andrés Martínez Cortés que ha sido parte fundamental en este proyecto ya que sin su gran ayuda esto no hubiese salido a flote mil gracias.

Gracias por tenerme paciencia, por su dedicación por su comprensión y sobre todo mil gracias por no ser egoísta con sus conocimientos ya que como profesor es excelente pero como ser humano es a un mejor.

## INDICE

Páginas

<b>INTRODUCCION</b> .....	1
1 Aceites esenciales.....	3
1.1 Funciones de los aceites esenciales.....	4
2 Descripción del orégano.....	5
2.1 Potencial Antimicrobiano.....	7
3 Descripción del eucalipto.....	8
3.1 Composición Química del eucalipto.....	10
3.2 Efectos Farmacológicos.....	10
4 Descripción de <i>Helicobacter pylori</i> .....	12
4.1 Microbiología.....	12
4.2 Fisiopatología.....	13
4.3 Epidemiología.....	15
4.4 Transmisión.....	17
5 Justificación.....	18
6 Hipótesis.....	18
<b>OBJETIVOS</b> .....	19
<b>MATERIAL y METODOS</b> .....	20
1. a Material vegetal.....	20
2. b Extracción de los aceites esenciales.....	20
3. c Microorganismo.....	22
4. ch Pruebas de laboratorio.....	23
5. d Parte Experimental.....	23

RESULTADOS.....	26
DISCUSION.....	33
CONCLUSIONES.....	36
REFERENCIAS.....	37
ANEXOS.....	42

## Resumen

En el presente trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Lippia graveolens* frente a la bacteria *Helicobacter pylori* descubierta en el estómago humano por Marshall y Warren en 1983.

Actualmente más del 50% de la población mundial se encuentra infectada por esta bacteria la cual está muy relacionada con la presencia de úlcera péptica, úlcera duodenal y cáncer gástrico.

Los resultados obtenidos indicaron que los aceites esenciales producidos por las dos plantas estudiadas tienen actividad antimicrobiana sobre *Helicobacter pylori*.

Se determinaron las concentraciones inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) de ambos tipos de aceites vegetales, los resultados indicaron que CIM y CBM fueron de 2 y 4 mg/ml para *L. graveolens* y 4 y 8 mg/ml para *E. globulus*.

## INTRODUCCION

La medicina tradicional ha sido durante siglos uno de los sistemas mas utilizados en la recuperación de la salud humana en el mundo. Las plantas medicinales han cumplido una función fundamental para curar algunas enfermedades en las personas. Este sistema sigue teniendo presencia en las poblaciones rurales ya que se ha utilizado durante mucho tiempo. Estas poblaciones han manejado y conservado plantas medicinales acumulando el conocimiento y transmitiéndolo de una generación a otra (Largo, y Ruiz de la Sola, 1996).

Muchas plantas medicinales aromáticas y especies se usaban desde hace 4,000 años a.C. en rituales religiosos. Los tratamientos curativos fueron descritos por el padre de la medicina, Hipócrates. En la misma época Carteabas un famoso herborista escribió un manual en el que detallaba 4,000 plantas con sus aplicaciones (Palacios, 2005).

Esta información ha sido importante para el descubrimiento de diferentes sustancias activas que hoy se utilizan. El 80% de la población mundial es dependiente de la medicina tradicional para tratar sus males (Largo y Ruiz de la Sola, 1996).

En México, desde la época prehispánica, se conocen plantas medicinales como el tamarindo, la hiedra y la salvia, entre otras muchas. Estos conocimientos se documentaron principalmente en el Códice Badiano, en el cual se presenta la enorme riqueza de usos medicinales de plantas de las aquella época (Garriz y Chamizo, 1997).

En el cuadro siguiente se presentan otros ejemplos de plantas medicinales y sus aplicaciones.

Cuadro 1.- PLANTAS MEDICINALES Y ALGUNAS APLICACIONES

PLANTAS	APLICACIONES
SEN ( <i>Cassia angustifolia</i> , hojas)	Laxopurgante energético.
TAMARINDO ( <i>Tamarindus indica</i> )	Regulador intestinal en estreñimientos leves y empachos.
TILO ( <i>Tilia platyphyllos</i> )	Nerviosismo, palpitations, insomnio, acidez estomacal.
PASSIFLORA ( <i>Incarnata</i> )	Nervios, miedo, angustia, desesperación, tristeza y abatimiento. Tensión premenstrual.
PEONIA ( <i>Paeonia officinalis</i> )	Várices, hemorroides.
PEZUÑA DE VACA ( <i>Bauhinia candicans</i> )	Diabetes, irregularidad del azúcar en la sangre.
SALVIA ( <i>Salvia officinalis</i> )	Sudores, espasmos digestivos. Inflamación de encías, boca y garganta.
SARANDI BLANCO ( <i>Phyllanthus sellowianus</i> )	Diabetes, retención de líquidos, antioxidante.
VALERIANA ( <i>Valeriana officinalis</i> )	Sedante, insomnio, dolores o presión de origen nervioso.
ZARZAPARRILLA ( <i>Smilax campestris</i> )	Reuma, retención de líquidos, sudorífico.
TOMILLO ( <i>Thymus vulgaris</i> )	Espasmos digestivos, cólicos menstruales, calmante bronquial y de la tos. Infecciones.

Fuente: Palacios, 2005.

Otra especie muy conocida en México con usos terapéuticos efectivos es el eucalipto el cual tiene aplicaciones diversas contra afecciones bronquiales y pulmonares. El uso tópico de esta planta como antiinflamatorio, antiséptico y cicatrizante (Martínez, 1989).

Existe también otra planta de uso común y de conocimiento popular como es el orégano, el cual se utiliza de muchas maneras, algunas de ellas son: antiasmático (control del asma), antiespasmódico (alivio de cólicos), antitusígeno (control de la tos y del asma), antihelmíntico (contra lombrices, en mezcla con hierbabuena y tomillo); antiinfeccioso (acción específicamente contra *Staphylococcus aureus*); emenagogo (regulador de la menstruación) y fungicida (acción contra *Candida albicans*). El aceite esencial del orégano contiene muchas sustancias activas que pueden ser responsables de sus actividades (Bruneton, 1991).

Los aceites esenciales son utilizados en la medicina tradicional para diversos propósitos. La investigación química de los aceites esenciales de algunas plantas medicinales ha revelado que estos están formados principalmente de monoterpenos (George, 1988).

## 1) Aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas complejas, normalmente líquidas, que presentan una característica: su volatilidad, por tanto son extraíbles en corriente de vapor de agua. En general son los responsables del olor de las plantas. Se definen, como: productos obtenidos a partir de una materia prima vegetal, bien por arrastre con vapor, bien por procedimientos mecánicos a partir del epicarpio de los *Citrus*, o bien por destilación seca. El aceite esencial se separa posteriormente de la fase acuosa por procedimientos físicos en los dos primeros modos de obtención

(por arrastre de vapor); puede sufrir tratamientos físicos que no originen cambios significativos en su composición (por ejemplo, redestilación, aireación. Químicamente están formados principalmente por terpenos, monoterpenos y sesquiterpenos (hidrocarburos, alcoholes, cetonas, etc. que pueden ser acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos.), en ocasiones llevan también derivados del fenil propano y, raramente cumarinas (Hussain *et al.*, 1986).

### 1.1) Funciones de los aceites esenciales.

La volatilidad y el marcado olor de los aceites esenciales, constituyen los elementos de la comunicación química: tienen un papel muy importante en la polinización.

A menudo, constituyen un medio de defensa frente a depredadores (microorganismos, hongos, insectos, herbívoros), y a veces parecen tener una acción fuerte sobre las germinaciones; estas acciones se facilitan por la localización periférica de los elementos secretores. La complejidad de la composición permite los mensajes complejos y selectivos (Bruneton, 1991).

Los aceites esenciales son líquidos a temperatura ambiente, tienen color y en general su densidad es inferior a la del agua. Tienen rotación óptica y un índice de refracción elevado. Los aceites esenciales son mezclas complejas y muy variados de constituyentes, que pertenecen de forma casi exclusiva a dos series caracterizadas: la serie terpénica y la serie, mucho menos frecuente, de los compuestos arénicos, derivados del fenilpropano (Bruneton, 1991).

## 2) Descripción del orégano

Reino: Plantae

División: *Antophyta*

Clase: *Dicotiledónea*

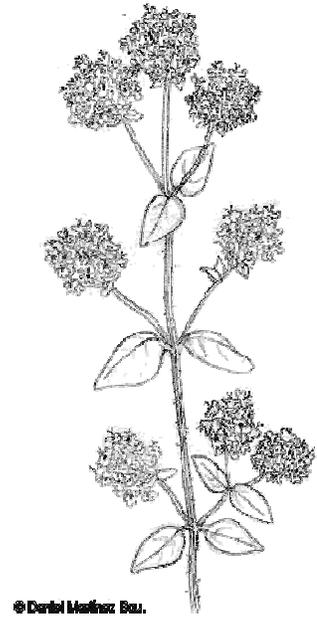
Orden: *Tubiflorales*

Familia: *Verbenaceae*

Género: *Lippia*

Especie: *graveolens*

Nombre científico: *Lippia graveolens*



El nombre de esta planta se compone de los vocablos griegos *oro*, monte y *ganos*, adorno, esplendor; es decir, esplendor en el monte, proliferan en el verano. Las plantas de las diferentes especies de orégano mexicano crecen en estado silvestre, en regiones áridas y semiáridas en por lo menos 24 estados de la república mexicana. Sus principales hábitats están en suelos generalmente pedregosos de cerros, laderas y cañadas entre los 400 y 2,000 metros de altitud, aunque se le halla en mayor abundancia entre los 1,400 y 1,800 metros de altitud. La mayor producción de orégano para fines comerciales es la del género *Lippia*, cuyas especies más abundantes en México son *berlandieri* y *graveolens*. Esta producción se concentra en los estados de Durango, Guanajuato, Jalisco, Querétaro, San Luís Potosí y Zacatecas. Estos oréganos comerciales son arbustos que alcanzan hasta 2.5 m de alto y desarrollan en promedio 1.20 m de follaje. La planta tiene tallos ramificados con gran cantidad de hojas, que constituyen la parte aprovechable. Esas hojas, de 1 a 3 cm, de largo y 0.5 a 1.5 cm. de ancho son opuestas, alternas y de forma ovalada con bordes dentados y tienen una textura rugosa y con ligeras vellosidades. Las flores son pequeñas, de color blanco y forman inflorescencias en racimos; los frutos son pequeñas cápsulas que

contienen las semillas de color café, no mayores de 0.25 mm. Se usa el orégano ampliamente en la preparación de alimentos frescos como: guisados (adobo, pipián), sopas, estofados de carnes, platillos típicos (pozole, menudo, chilpozonte, callos, barbacoa, etc.). Los principales usos medicinales de las dos especies de orégano *Lippia berlandieri* Schauer y *Lippia palmeri* Watson. Consiste en utilizar hojas frescas y secas. (Bruneton, 1991).

Sustancias Activas: Acido carioptosidico, naringenina, pinocembrina,  $\beta$ -felandreno, carvacrol, 1,8-cineol, r-cimeno, metil timol (Martínez M, 1989). (Ver Anexo).

Figura 1. Distribución de *Lippia graveolens* en la República Mexicana.



## 2.1) Potencial Antimicrobiano del orégano.

Se ha encontrado que los aceites esenciales de las especies del género *Origanum* presentan actividad contra bacterias gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y las gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis*. Tienen además capacidad antifúngica contra *Cándida albicans*, *C.tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus Níger*, *Geotrichum* y *Rhodotorula*; pero no contra *Pseudomona aeruginosa*. Se ha evaluado la actividad antimicrobiana de los componentes aislados, así como la del aceite esencial. Los fenoles carvacrol y timol poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos gram negativos, excepto para *P. aeruginosa*, siendo el timol más activo. Otros compuestos, como el g-terpineno y r-cimeno no mostraron actividad contra las bacterias estudiadas. Los valores de la concentración inhibitoria mínima (CIM) para los aceites esenciales se han establecido entre 0.28-1.27 mg/ml para bacterias, y de 0.65-1.27 mg/ml para hongos (Dewick, 1997, Kokkini, *et al.*, 1997, Lawrence, 1984, Martínez, 1991, Skuola, *et al.*, 1999 y Russo *et al.*, 1998).

### 3) Descripción del eucalipto

Reino: Plantae

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Myrtales*

Familia: *Myrtaceae*

Género: *Eucalyptus*

Especie. *globulus*

Nombre científico: *Eucalyptus globulus*



El nombre científico del eucalipto es *Eucalyptus globulus*, es un árbol que esta compuesto por 2,800 especies aproximadamente. Las hojas suelen nacer por parejas, dos en cada nudo y una enfrente de otra, y tienen al igual que los frutos, numerosos y diminutos depósitos de esencias muy aromáticas. Las flores son regulares, con 5 o 4 pétalos, y el fruto, carnoso o seco, está situado debajo de la flor, no dentro. El árbol de eucalipto tiene una altura de 10m, o más con tallo grueso y ramas fuertes. Hoja perenne y con formas diferentes según la edad del árbol, cuya corteza al envejecer se desprende en grandes tiras longitudinales y en placas. Flores grandes y solitarias o en grupos de 2 o 3, recubiertas de una capa cerosa y de consistencia leñosa. El fruto es algo mayor que la flor, leñoso, plano por un lado y puede abrirse por 4 ò 5 dientes. Las hojas, los tallos y las flores saben a esencia, y recuerdan al arrayán, que pertenece a la misma familia. Florece en otoño e invierno. Crece mejor con agua abundante, en terrenos húmedos y pantanosos, y en suelos silíceos, y soporta mal el frío invernal. Originario de una pequeña zona de Australia y Tasmania, el hombre lo ha distribuido en casi todas las regiones de climas templados: mediterránea, India, Filipinas y grandes zonas de Asia, África, América del Sur y California. Especie de crecimiento rápido, se cultiva para la producción de madera, leña, aceites esenciales y sobre todo pasta

de papel. Su cultivo extensivo provoca la depauperación de los suelos, a los que acidifica, y a la vez compite ecológicamente con numerosas especies de la flora autóctona, a la que altera al no dejar crecer otras plantas a su alrededor y haberse diseminado sobre todo en áreas del dominio potencial del monte verde. Como forma una vasta cadena de raíces que absorbe grandes cantidades de agua del suelo, se ha cultivado de manera intensa para desecar las zonas pantanosas. Partes utilizadas: Las hojas adultas y los frutos, y el carbón de su madera. Componentes del aceite esencial: cineol o eucaliptol, monoterpenos (alfa-pineno, p-cimeno, limoneno) azuleno, taninos, resina, flavona (eucaliptina) y triterpenos derivados del ácido ursólico (Ver Anexo) Propiedades: el aceite esencial, en uso externo o por inhalación, tiene una importante acción antiséptica de las vías respiratorias (Martínez, 1989).

El aceite puro de eucalipto se obtiene por destilación al vapor de las hojas y tallos tiernos del *Eucalyptus globulus*, el producto resultante es sometido a un complejo proceso de refinación y redestilación con el fin de eliminar algunas sustancias irritantes, siendo el resultado final un aceite esencial volátil y de consistencia ligera para uso medicinal cuyo principal componente es el eucaliptol (60% a 70%) a su vez conformado básicamente por lineol y una amplia gama de terpenos, flavonoides, principios amargos y resinas entre otros. Sus propiedades terapéuticas son ampliamente reconocidas desde la antigüedad, es energizante, rubefaciente, tiene gran poder de penetración y difusión a nivel de piel, mucosas y tejido celular. Contiene como principio activo un aceite esencial complejo constituido por monoterpenos como el beta-pineno, limoneno, etc, y sesquiterpenos, pero el componente mas abundante (al menos un 70 %), es el eucaliptol o cineol, un óxido terpénico. Las hojas de eucalipto contienen además ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, triterpenos y unos compuestos llamados euglobales que son terpenoides (Rubio, 1996).

### 3.1) Composición Química

El eucalipto está fundamentalmente constituido por el denominado aceite de eucalipto, el cual es un aceite volátil destilado a partir de sus hojas frescas, es un líquido incoloro o ligeramente amarillento que tiene propiedades aromáticas características. El componente principal de este aceite es el denominado eucaliptol (1,8-cineol). El eucaliptol o cineol es un líquido incoloro que tiene un olor característico, constituye del 70 al 80% del aceite de las hojas de la planta, es de sabor picante y refrescante, el cual puede ser obtenido por destilación de los aceites de esta planta para su posterior enfriamiento o bien tratando el aceite con ácido fosfórico y agua. Además de este cineol, el aceite de eucalipto está compuesto de pequeñas cantidades de aldehídos volátiles, terpenos, sesquiterpenos, aldehídos aromáticos, alcoholes y fenoles. Muchos de estos componentes menores tienen propiedades irritantes y son removidos por redestilación del aceite (Quer, 1992) (ver Anexo).

### 3.2) Efectos Farmacológicos

El aceite esencial de eucalipto es [antitusivo](#), con un efecto algo inferior a codeína, [mucolítico](#) y [expectorante](#), aumentando el volumen de producción del flujo del tracto respiratorio. Dado su gran poder de difusión, llega rápidamente a la circulación sanguínea ejerciendo desde allí una acción armonizadora sobre el sistema neuro-vegetativo, así como un efecto estimulante sobre el sistema neuro-endócrino, activando las funciones de eliminación y drenaje sobre los órganos tratados dado su gran poder solvente sobre las toxinas del medio intersticial celular.

Su eliminación se realiza a nivel de los riñones, la piel y principalmente a través de la mucosa bronco-pulmonar mejorando sus condiciones por su acción, balsámica y

antifermentativa aumentando su resistencia al ataque de gérmenes debido al ozono que desarrolla. Fluidifica las flemas facilitando la expectoración, descongestionando el aparato respiratorio. En frotaciones y/o vaporizaciones proporciona alivio efectivo en dolores musculares y articulares (Arzio y Curioni, 2003).

Las plantas medicinales tienen un gran arraigo en México, de las cuales sólo se utiliza el 10% de la riqueza florística del país y con una demanda comercial alta (Zamudio, 2005). Las plantas medicinales constituyen un recurso muy conocido y accesible en gran número de poblaciones (Betancourt, 2001).

Las enfermedades gastrointestinales representan uno de los problemas de salud pública más importantes, con repercusiones que inciden en el ámbito económico, social y político. México es una de las naciones que registran a nivel mundial las tasas de mortalidad más elevadas por estos padecimientos (Kumate, 1988). Las propiedades de las plantas no sólo son curativas ya que una de las grandes virtudes que poseen, es la capacidad de regular los procesos vitales y prevenir enfermedades (Herbolaria 2005).

Los aceites esenciales de plantas eucalipto y orégano representan una alternativa para aliviar algunos dolores (Arcina-Lozano *et al.*, 2004). Algunas investigaciones emplearon aceites esenciales.

Rubio en 1996, presentó un trabajo donde evaluó la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* frente a especies de bacterias que fueron: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Enterobacter glomerans*, *Shigella boydii* y *Vibrio cholerae* fue frecuentemente estas en las infecciones gastrointestinales en nuestro país. Concluyó que los principios activos de las hojas del aceite esencial de Eucalipto son responsables de la actividad antibacteriana a dosis pequeñas.

#### 4) Descripción de *Helicobacter pylori*

Reino: Monera

Filo: *Proteobacteria*

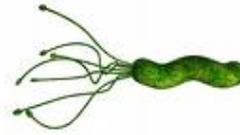
Clase: *Epsilon Proteobacteria*

Orden: *Campylobacterales*

Familia: *Helicobacteraceae*

Género: *helicobacter*

Especie: *Helicobacter pylori*



*Helicobacter pylori* es una bacteria patógena que esta involucrada en el tracto gastrointestinal. Coloniza el estómago del hombre permaneciendo en la mucosa gástrica por años. Se asocia también con algunos cánceres de estómago. Es muy probable que la infección por *Helicobacter pylori* se produzca desde la edad infantil (Brooks *et al.*, 1999).

##### 4.1) Microbiología

Es un bacilo en forma helicoidal, de ahí su nombre, gram negativo, mide aproximadamente 3.5 por 0.5 micrómetros de ancho, posee múltiples flagelos en uno de sus polos (de 5 a 6) lo que lo hace altamente móvil, microaerófilo (preferencia por medios escasos en oxígeno). Es un microorganismo de crecimiento lento.

Coloniza las capas profundas del moco de recubrimiento gástrico y duodenal y se adhiere a las células epiteliales superficiales de la mucosa del estómago y duodeno, sin invadir la pared (Mazarí *et al.*, 2001)

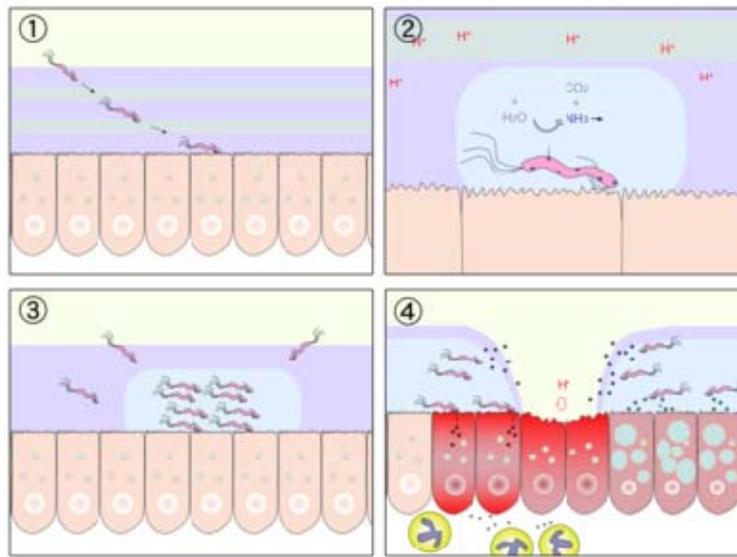
## 4.2) Fisiopatología

Los factores más importantes de *Helicobacter pylori* son la motilidad, la actividad ureásica y el contacto con las células de la mucosa gástrica. La infección por *Helicobacter pylori*, se asocia a hipergastrinemia que puede contribuir al incremento de la masa de células parietales y al aumento de la secreción gástrica de ácido. Estudios recientes sugieren que la reducción en la liberación de somatostatina asociada a *Helicobacter pylori*, podría justificar las alteraciones de la secreción gástrica en la úlcera duodenal (Dunn, 1993, y Moss *et al.*, 1993).

Al principio, *Helicobacter pylori*, coloniza el fundus, después el antro, causando posteriormente gastritis crónica antral, y más tarde úlcera duodenal. Pero existen datos que apoyan la hipótesis alternativa de que la gastritis y la úlcera duodenal suceden al principio y la colonización posterior por *Helicobacter pylori* (Peterson, 1991).

La bacteria segrega ureasa y forma amoníaco el cual, alcaliniza el medio; así se protege de la acción ácida del jugo gástrico (pH 2). El amoníaco además irrita la mucosa, ayudado por proteasas y fosfolipasas bacterianas que destruyen el moco protector. La mucosa y su lámina propia son invadidas por un denso infiltrado de células inflamatorias, especialmente neutrófilos. Este microorganismo es de difícil cultivo en los medios habituales, pero puede ser aislado en medios de cultivos apropiados. Se sitúa profundamente en la capa de la superficie epitelial y donde el pH 7 a 7.2 es fisiológico (Brooks *et al.*, 1999) (Ver A nexa).

Figura 2 Infección por *H. pylori*.



1. *H. pylori* penetra la capa mucosa del estómago y se adhiere a la superficie de la capa mucosa epitelial gástrica.
2. Produce amoníaco a partir de la urea, para neutralizar el ácido gástrico.
3. Migración y proliferación de *H. pylori* al foco de infección.
4. Se desarrolla la ulceración gástrica con destrucción de la mucosa, inflamación y muerte de las células mucosas

Su morfología curvada le permite realizar movimientos tipo tornillo para poder penetrar la capa mucosa, la motilidad de esta bacteria incrementa cuando la viscosidad aumenta, lo que le permite alejarse del medio ácido que predomina en la superficie (Harry *et al.*, 2001).

## 4.2) Epidemiología

En los países en desarrollo la mayoría de las personas (el 80% aproximadamente) se infectan con *H. pylori* a una edad promedio de 10 años (Cave, 1997).

En los países desarrollados la incidencia anual de infección se presenta entre el 0.5% y el 1% para menores de 10 años y la infección aumenta hasta en un 50% en adultos, con un promedio de edad de 60 años. Por el contrario, se estima que en los países en vías de desarrollo aproximadamente el 80% de las personas se infectan con *H. pylori* a una edad promedio de 10 años, con un total de 900,000 casos nuevos cada año, en donde cuatro de cada cinco casos son diagnosticados (Mohar *et al.*, 2002).

Por otro lado, en el grupo de afro-americanos, hispanos e indios nativos que viven en esos países, la infección por el microorganismo se observa desde edades tempranas y la transmisión intrafamiliar es alta (Muñoz, 2000).

En algunos países como en México se han observado regiones de mayor riesgo, como en algunos estados de la república mexicana que presentan una alta incidencia de cáncer gástrico asociado al microorganismo *Helicobacter pylori* (Mohar, 2002).

Figura 3. Prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori*.

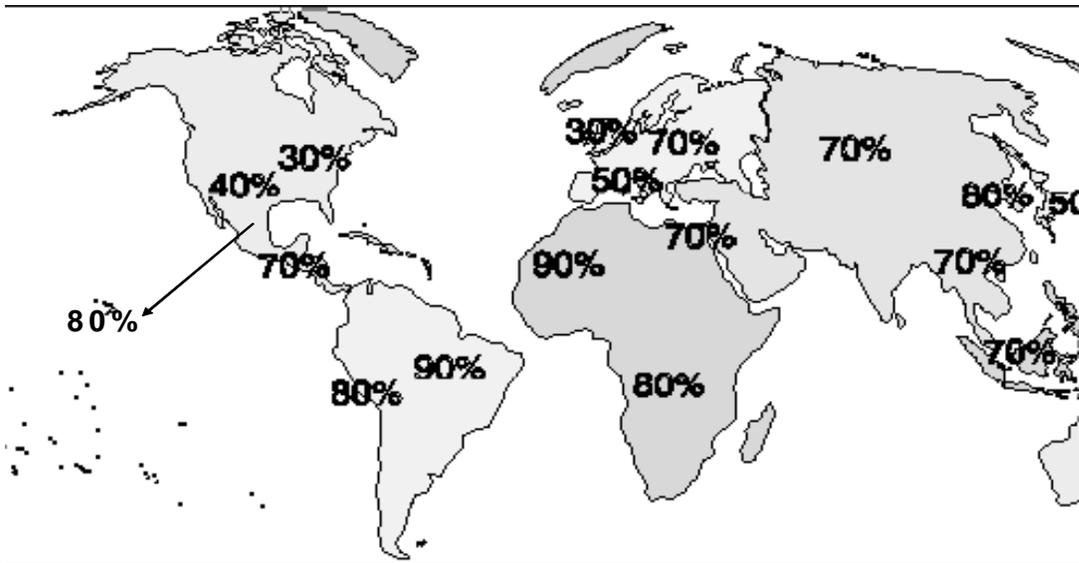
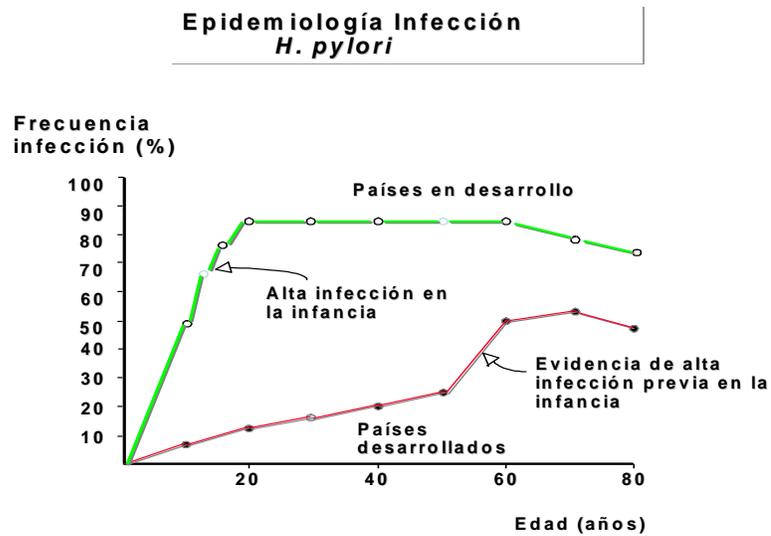


Figura 4. Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*



### 4.3) Transmisión

Aunque *Helicobacter pylori* está en el estómago de la mitad de la población mundial o un poco más, todavía no se conoce muy bien su transmisión. Se han propuesto distintas rutas que puede seguir la infección: Transmisión oro-oral. La base de tal propuesta ha sido debida al hallazgo de *Helicobacter pylori* en la placa dental, en saliva o bien la identificación de su genoma en saliva; Transmisión oro-gástrica. Esta posibilidad se apoya en la ocurrencia de algunos brotes asociados con manejo y desinfección inadecuada de gastroscopios. Tal posibilidad llevaría también a relacionarle con el vómito, lo que en cierta medida podría explicar las altas tasas de infección en niños, ya que estos vomitan más frecuentemente que los adultos. Transmisión fecal-oral. Esta vía explica más fácilmente la marcada diferencia en la prevalencia de *Helicobacter pylori* en países en desarrollo comparada con países desarrollados, cuyo patrón guarda un cierto paralelismo con las tasas de enfermedades diarreicas en esos mismos países. A pesar de que hay informes esporádicos sobre el aislamiento de la bacteria a partir de heces e incluso se ha descrito el método para tal aislamiento, esos hallazgos no son sistemáticos. La dificultad de aislar *Helicobacter* a partir de heces se relaciona con su alta susceptibilidad *in vitro* a los antimicrobianos empleados en medios de cultivo selectivos. La colonización de la mucosa lleva implícita la capacidad de adherencia que posee la bacteria, lo cual es esencial para la inducción de gastritis, esto ocurre mediante la interacción de adhesinas bacterianas y los receptores del hospedero que están representadas por algunas proteínas de la matriz extracelular. (IMSS, 2003).

## 5) Justificación

En México se han realizado pocos estudios acerca del efecto que provocan los aceites esenciales de Eucalipto y Orégano en contra de *Helicobacter pylori*. Causa gastritis y úlceras duodenales por tal, es un problema de salud pública y esto es más frecuente en lugares de bajo nivel socioeconómico. En el siguiente trabajo se evalúa el efecto antibacteriano de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Lippia graveolens* en contra de *H. pylori* tomando en cuenta que estas plantas son usadas para diversos tratamientos para el estómago. No existe algún informe documental en el que se indique la eficiencia de estos aceites esenciales en la inhibición de *H. pylori*.

## 6) Hipótesis

Si los aceites esenciales de las dos especies de plantas *Eucalyptus globulus* y *Lippia graveolens*, son agentes antibacterianos, entonces es posible que los mismos inhiban el crecimiento de la bacteria *Helicobacter pylori*.

## OBJETIVOS

Objetivo General.

- Inhibir in vitro el crecimiento de la bacteria *Helicobacter pylori* por medio de aceites vegetales extraídos de las plantas de eucalipto y orégano.

Objetivos Particulares:

- Implementar y estandarizar el cultivo de la bacteria *Helicobacter pylori* en condiciones apropiadas.
- Determinar la acción antibacteriana a diferentes concentraciones de aceites vegetales por medio de las técnicas de dilución en caldo y difusión en agar.

## Material y Métodos

### 1. a Material vegetal:

Se trabajo con *Eucalyptus globulus* y *Lippia graveolens*.

Las hojas de *Eucalyptus globulus* y *Lippia graveolens* se colectaron en la FES Iztacala, UNAM. Los ejemplares fueron depositados en el herbario IZTA de la FES Iztacala, UNAM con el número de registro: IZTA 42121 y IZTA 42122.



*Eucalyptus globulus*



*Lippia graveolens*.

### 2. b Extracción de los aceites esenciales

A partir de las hojas se obtuvieron los aceites esenciales mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor a partir de material lo más fresco posible, en este método se utiliza la característica que poseen las esencias de presentar bajas presiones de vapor y por tanto pueden ser arrastradas por sustancias que poseen presiones de vapor mas altas. El aparato que se utiliza se muestra en la siguiente figura.

Destilador por arrastre de vapor

- a) Matraz de balón
- b) Columna de vidrio
- c) Colector
- d) Refrigerante
- e) Disolvente
- f) Fuente de calentamiento



Empleando este aparato se pueden destilar por arrastre de vapor continuo de 100 a 500g de planta fresca, con un buen rendimiento. En los casos que el rendimiento sea bajo se puede colocar  $\pm 500$  ml de agua para obtener los aceites. Se colectan los aceites, se refrigera a  $0^{\circ}$  C por 24 hrs. para separar el agua de la mezcla. Este procedimiento se llevo a cabo en los dos tipos de plantas.

El rendimiento de ambos tipos de aceites obtenidos a partir de la extracción de los aceites esenciales fue de  $\pm 15\%$  con una densidad de 0.93g/ml en eucalipto y en orégano 0.85g/ml).

### 3. c Microorganismo

#### Cultivo

Para el desarrollo de este estudio se utilizó *Helicobacter pylori* (ATCC 43504) cepa bacteriana donada por Facultad de Medicina de Ciudad Universitaria. Se cultivó en

caldo y en agar brucella a los cuales se les adicionó tioglicolato. Se prepararon placas de agar sangre para su identificación.

Los cultivos de conservación y experimentales se realizaron en condiciones microaerófilas: O<sub>2</sub> al 5%, CO<sub>2</sub> al 10% y N<sub>2</sub> al 85% y se incubaron por 24 h a 37° C.



La atmósfera microaerófila que requirió *Helicobacter pylori* se logró de la siguiente manera: en una jarra de anaerobiosis, se generó la atmósfera adecuada con una vela encendida y una tableta de efervescente Alkalseltzer para liberar el CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, con una humedad de 90% y se incubó durante 7 días.

#### 4. ch Pruebas de laboratorio

Al cabo de 7 días de incubación en condiciones microaerofilicas y a una temperatura de 37° C se observaron las colonias cuya morfología era microaerófilo (con preferencia por medios escasos en oxígeno). Es un microorganismo de crecimiento lento y las características microscópicas revelaron la presencia de un bacilo en forma helicoidal 3.5 por 0.5 micrómetros de ancho y con flagelos.

Las pruebas bioquímicas de ureasa, oxidasa, catalasa y Tinción de Gram confirmaron la identidad de este agente patógeno (Koneman, 1996) (Ver anexo).

#### 5. d) Parte Experimental

El estudio consistió en determinar la susceptibilidad de *H pylori*, frente a los aceites esenciales de eucalipto y orégano. Se emplearon para las pruebas de susceptibilidad antibacteriana, como son: dilución en caldo, dilución y en agar. Cabe mencionar que trabajar con esta bacteria fue un tanto difícil mantenerla viable en condiciones de laboratorio.

Medio:

Se emplearon agar y caldo brucella para promover el desarrollo de crecimiento bacteriano. Se mantuvo un volumen uniforme del medio de 30 ml por caja y en los tubos de 3 ml. Para el desarrollo de este método se utilizaron micropipetas con puntas desechables con capacidad de 10, 25, 50 y 100 µl.

En el primer experimento se utilizaron las concentraciones de aceites esenciales que fueron de: 20, 50, 100 y 200 µl/ml con base en la literatura consultada. Las concentraciones empleadas para los bioensayos cuantitativos fueron 31.2, 62.5, 125, 250, 1 µl/ml y 2 µg/ml. 2, 4, 8, 16, 32 µl/ml. Al igual que 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 y 200 mg/ml. Para el control positivo se utilizaron 25 µg/ml de Cloranfenicol del Laboratorio Sophia S.A. DE CV y para el control negativo se utilizó aceite de oliva, 40 µl/ml.

La prueba de susceptibilidad por el método de dilución en caldo y agar consiste en poner en 10 tubos de ensayo con 1ml de caldo nutritivo y caldo brucella. A cada uno se le añade una cantidad diferente de aceites. De los tubos, unos son tomados como control positivo (Se pusieron 25 µg/ml de Cloranfenicol) y control negativo (Se utilizaron dosis de 40µl aceite de oliva).

Los tubos se inoculan con la bacteria (*Helicobacter pylori*) calibrada en un Espectrofotómetro para obtener  $1 \times 10^5$  Unidades formadoras de colonias (UFC)

La turbidez indica el desarrollo bacteriano (Koneman, 1996).

#### Evaluación cualitativa.

La actividad antibacteriana se evaluó mediante el método de difusión de agar de Kirby-Baüer (Van den Berghe y Vlietink, 1991). Las concentraciones fueron 31.2, 62.5, 125, 250, 1 µl/ml y 2 µg/ml. 2, 4, 8, 16, 32 µl/ml. Al igual que 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 y 200 mg/ml. Para el control positivo se utilizaron 25 µg/ml de cloranfenicol y para el control negativo se utilizó aceite de oliva, 40 µl/ml. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado.

## Evaluación cuantitativa

Para determinar la concentración Inhibitoria Mínima (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CBM) se utilizó el método de dilución en agar.

Las concentraciones empleadas para los bioensayos fueron 31.2, 62.5, 125, 250, 1  $\mu\text{l/ml}$  y 2  $\mu\text{g/ml}$ . 2, 4, 8, 16, 32  $\mu\text{l/ml}$ . Al igual que 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 y 200  $\text{mg/ml}$ . Para el control positivo se utilizaron 25  $\mu\text{g/ml}$  de cloranfenicol y para el control negativo se utilizó aceite de oliva, 40  $\mu\text{l/ml}$ . Todos los bioensayos se realizaron por triplicado

## Lectura de los resultados

La menor concentración de antimicrobiano que produce una inhibición completa del desarrollo visible, representa de la CIM. Una turbidez muy ligera o un pequeño botón de desarrollo o turbidez definida se considera evidencia de que los aceites esenciales ha sido capaz de inhibir por completo el desarrollo a esa concentración.

## RESULTADOS

Antes de llevar cabo los experimentos fue necesario cultivar la bacteria *in vitro*. Esta tarea implicó algunos esfuerzos técnicos, ya que fue necesario al inicio evaluar una gran cantidad de medios de cultivo diferentes no solo para mantener viable este cultivo, sino también para conservar la bacteria en óptimas condiciones hasta el final de los experimentos. El cultivo preliminar de la bacteria *Helicobacter pylori* consistió en lo siguiente:

La bacteria trabajada en el laboratorio de fotoquímica ubicado en la UBIPRO se sembró en diferentes medios de cultivo: en caldo infusión cerebro-corazón, caldo Mueller-Hinton, caldo nutritivo, caldo brucella, sangre y suero de caballo. Los agares fueron Mueller-Hinton, agar Brucella, agar nutritivo, agar base sangre, agar semisólido de tioglicolato. Todos los medios se prepararon con y sin adición de agentes estabilizadores de reacciones de óxido-reducción dentro de los medios con el fin de mantener un ambiente con baja tensión de oxígeno: tioglicolato, sacarosa, ácido ascórbico, glucosa y glicerol. Además todos los medios se prepararon con y sin adición de suero de caballo, que es un agente rico en factores de crecimiento celular. El total de combinaciones fue de alrededor de 90.

Los mejores medios de cultivo fueron el agar o el caldo brucella adicionado con suero de caballo, agar o caldo brucella adicionado con tioglicolato y caldo brucella adicionado con ácido ascórbico.

La cepa de catálogo: ATCC 43504 fue recuperada en tres ocasiones, ya que perdió su viabilidad durante el proceso de cultivo. El tiempo requerido en este proceso fue de aproximadamente 30 días.

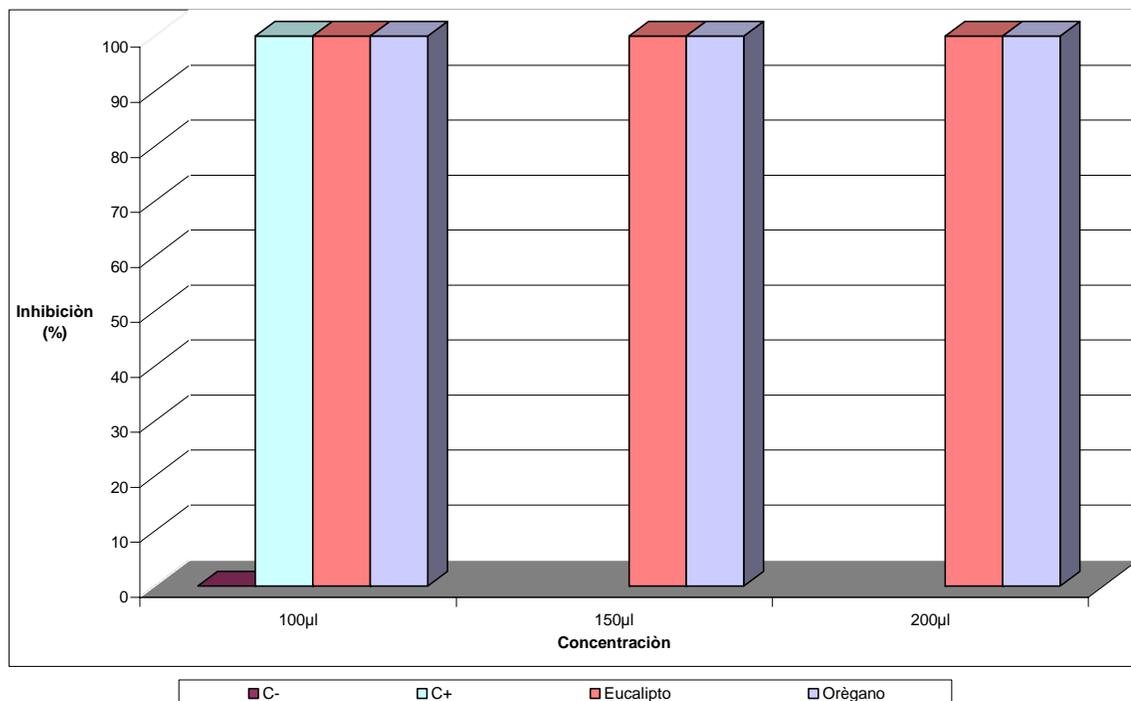
El control positivo en los primeros experimentos se realizó con omeprazol que es un agente para el tratamiento de gastritis y úlcera gástrica en humanos. Sin embargo, no demostró acción inhibitoria sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori* *in vitro*.

Debido probablemente a que el omeprazol, que es una base débil, no pasa a la forma activa ya que se requiere un medio muy ácido para activarlo tal como ocurriría en los canalículos intercelulares de las células parietales del estómago, entonces, el omeprazol no tuvo acción sobre la enzima ATPasa-H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>. Pero tampoco hubo la presencia de células parietales sensibles. Las únicas células presentes fueron las de *Helicobacter pylori*, pero el omeprazol no causa inhibición de su crecimiento. Con base en lo anterior se evaluaron las dosis inhibitorias de cloranfenicol como control positivo ((Northfield *et, al.* 1994 y Wadstrom, 1995)

Para los experimentos cuantitativos, el control positivo fue de 25 µg/ml. En los experimentos cualitativos se ajustó la dosis hasta 40 µg/ml, de que ya que los inóculos fueron de aproximadamente de 1x10<sup>8</sup> UFC/ml.

Los resultados cualitativos obtenidos se observan en la gráfica 1.

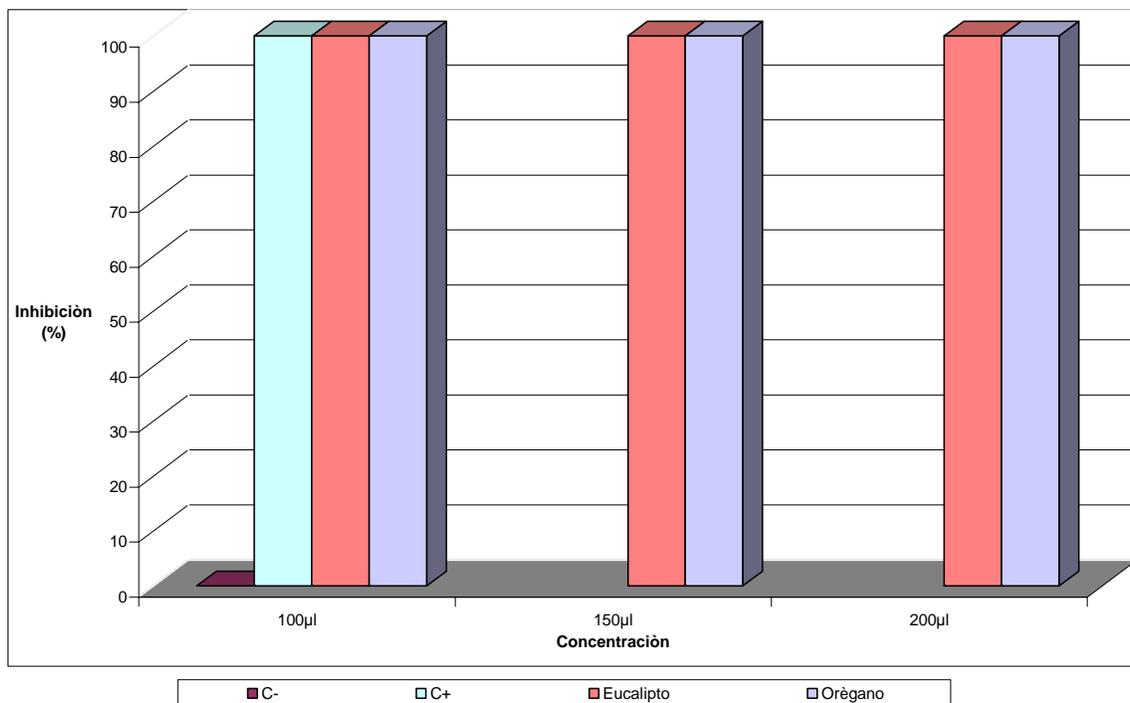
**Gráfica 1. Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Lippia graveolens* en caldo. Experimento cualitativo contra *Helicobacter pylori*.**



Promedio de 12 experimentos, en los cuales el 100 % fue la observación de turbidez del medio correspondiente a aproximadamente la turbidez # 1 de Mac Farland. E= Eucalipto; O= Orégano; C= control positivo (cloranfenicol 25 µg/ml) donde hubo inhibición al igual que las demás concentraciones C- = control negativo 40µg/ml aceite de oliva no inhibió por ello en la gráfica aparece como la nominación de 0).

En esta gráfica la información se presenta como porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano. Cada resultado expresa: inhibición o no inhibición del crecimiento. El 100 % indica que a partir de un inóculo de una turbidez del # 1 del sistema de turbidez de Mac Farland, el compuesto activo (los aceites) inhibió o mató a  $1 \times 10^8$  bacterias/ ml o más, de los tubos con turbidez. En los casos de duda, además de la presencia de turbidez, se evaluó la viabilidad de las bacterias para comprobar el resultado. Por ello no se presentan datos de error estándar o de la desviación estándar, porque no se asignaron datos numéricos. Los siguientes experimentos de la gráfica 2 también son cualitativos, pero realizados con agar.

**Gráfica 2. Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Lippia graveolens* en agar. Experimento cualitativo.**

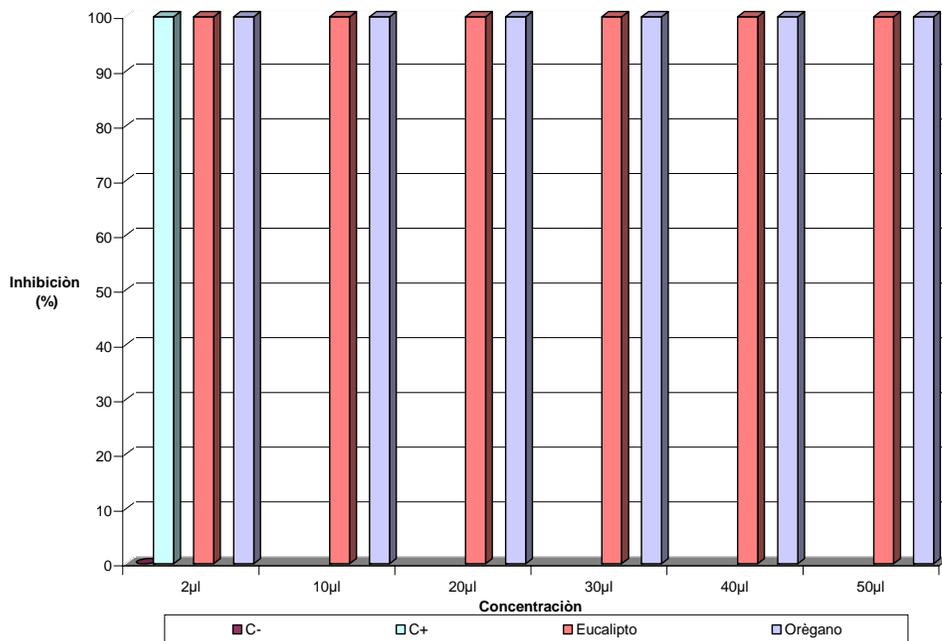


Además se evaluaron dosis intermedias entre 100 y 200 µl de un total de 12 experimentos por triplicado (36) que no se muestran en la gráfica. E= Eucalipto; O= Orégano; C= control positivo (cloranfenicol 25 µg/ml) donde hubo inhibición al igual que las demás concentraciones  
C- = control negativo 40µg/ml aceite de oliva. No inhibió por ello en la gráfica aparece como la nominación de 0).

La gráfica dos representa el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano. Se realizaron experimentos basándose con las concentraciones de 100 y 150 µl/ml del trabajo de Rubio realizado en 1996. Se realizaron experimentos intermedios con 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, y 200 µl/ml para indicar en donde se presentaba la inhibición más alta. Sin embargo, las concentraciones mostraron una inhibición del 100 % con un inoculó también de  $1 \times 10^8$  UFC/ml como en la gráfica 1.

En la gráfica 3 se muestra los experimentos cuantitativos ya con inoculó estandarizado de  $1 \times 10^5$ . Los Resultados cuantitativos se observan en la gráfica 3.

**Gráfica 3. Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Lippia graveolens* en caldo. Experimento cualitativo contra *Helicobacter pylori*.**

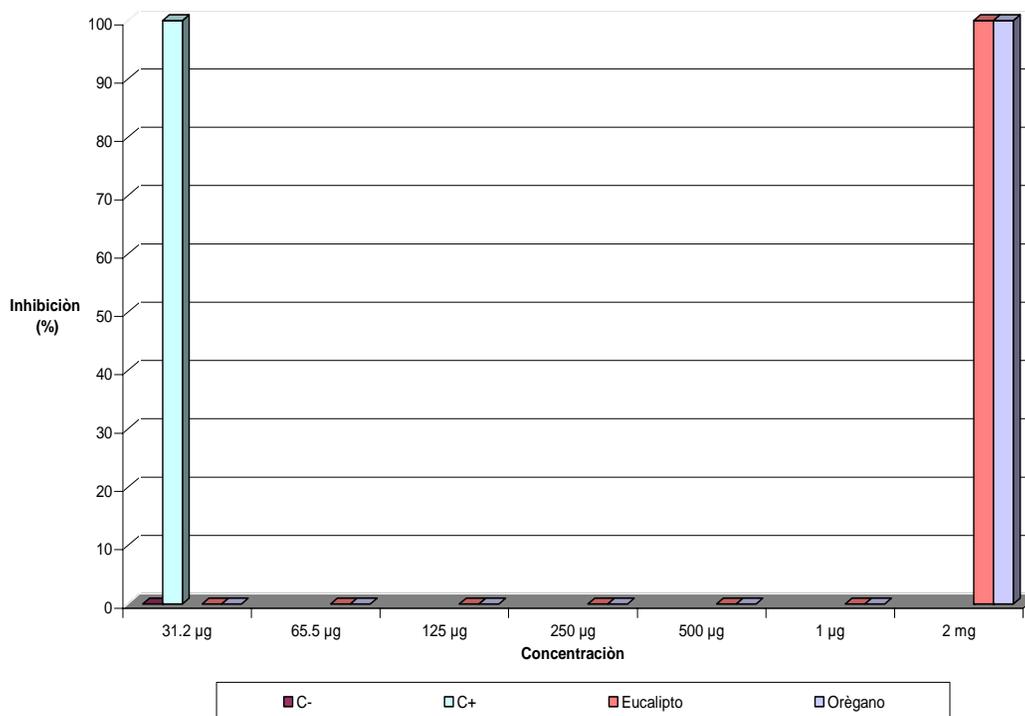


Promedio de 12 experimentos, los cuales se eligieron estas dosis para saber si había inhibición. E= Eucalipto; O= Orégano; C= control positivo (cloranfenicol 25 µg/ml) donde hubo inhibición al igual que las demás concentraciones C- = control negativo 40µg/ml aceite de oliva No inhibió por ello en la gráfica aparece como la nominación de 0.

En la gráfica 3 se experimento con las dosis menores de 50 a 2 µl/ml con el objetivo de buscar la dosis inhibitoria (punto de corte). Al igual que en las gráficas 1y 2 hubo una inhibición del 100%.

Se disminuyeron aún más las dosis de los aceites esenciales, hasta alcanzar valores menores a 2µl/ml, como se muestra en la gráfica 4.

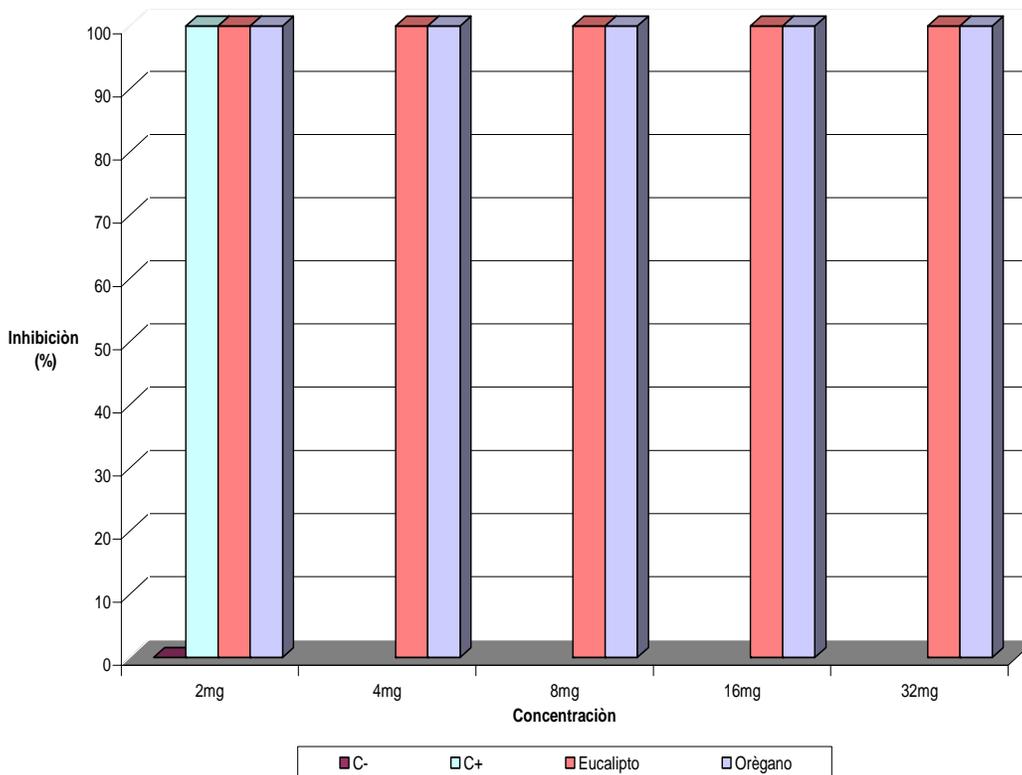
Gráfica 4. Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Lippia graveolens* en caldo. Experimento cuantitativo contra *Helicobacter pylori*.



Se evaluaron dosis pequeñas las cuales en ninguna hubo inhibición como se muestran en la gráfica. E= Eucalipto; O= Orégano; C= control positivo (cloranfenicol 25 µg/ml) donde hubo inhibición al igual que las demás concentraciones C- = control negativo 40µg/ml aceite de oliva No inhibió por ello en la gráfica aparece como la nominación de 0.

En la gráfica no se observó inhibición del crecimiento a las dosis empleadas a excepción del control positivo y la dosis de 2 mg donde se observó una inhibición del 100%. A partir de estos resultados se consideró pertinente determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración mínima bacteriana (CBM) de los aceites esenciales. Estos resultados se observan en la gráfica 5.

Gráfica 5. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bacteriana mínima (CBM) de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Lippia graveolens* contra *Helicobacter pylori*.



E= Eucalipto; O= Orégano; C= control positivo (cloranfenicol 25  $\mu\text{g/ml}$ ) donde hubo inhibición al igual que las demás concentraciones C- = control negativo 40 $\mu\text{g/ml}$  aceite de oliva No inhibió por ello en la gráfica aparece como la nominación de 0).

Las dosis empleadas en este experimento fueron dobles. Se estandarizó el tamaño del inóculo de  $1 \times 10^5$  UFC/m al igual que en la gráfica 3 y 4 con esto se pudo encontrar las dosis inhibitorias de los aceites esenciales trabajados. Se determinaron las concentraciones inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) de ambos tipos de aceites vegetales, los resultados indicaron que CIM y CBM fueron de 2 y 4 mg/ml para *L. graveolens* y 4 y 8 mg/ml para *E. globulus*.

## DISCUSION

No existen investigaciones científicas sobre el efecto antibacteriano de los aceites de eucalipto y orégano sobre *Helicobacter pylori*. Sabemos que se utilizan frecuentemente en zonas rurales contra infecciones gastrointestinales en nuestro país.

El estudio bacteriológico consistió en determinar la susceptibilidad de la bacteria *Helicobacter pylori* frente a los aceites esenciales empleando para tal efecto las pruebas de susceptibilidad antibacteriana mediante dilución en caldo y dilución en agar para determinar si la bacteria sería susceptible a los aceites esenciales. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CIM) y la concentración bacteriana mínima (CBM). Estos parámetros microbiológicos tienen la ventaja de poder estandarizarse de forma apropiada en los laboratorios de investigación.

*Helicobacter pylori*, se incubó a 37° C en condiciones microaerofílicas en un medio rico (agar sangre 5%). Se hizo su identificación mediante morfología colonial (colonias pequeñas, traslúcidas brillantes, con una elevación convexa y borde entero en agar sangre) y mediante las pruebas bioquímicas: oxidasa (+), catalasa (+) ureasa (+) y gram. No fue necesario realizar más pruebas para confirmar la identidad de este organismo.

Las pruebas de susceptibilidad antibacteriana se hicieron por el método de dilución en caldo a diferentes dosis, los resultados obtenidos por esta técnica permiten conocer el nivel de susceptibilidad de *Helicobacter pylori* frente a los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Lippia graveolens*. Ese nivel se determinó con los valores de CIM y CBM.

Cabe mencionar que en los primeros experimentos se utilizó omeprazol que es un agente para el tratamiento de gastritis y úlcera gástrica en humanos. Debido probablemente a que el omeprazol, que es una base débil, no pasa a la forma activa ya que requiere un medio muy ácido para activarlo tal como ocurriría en los canalículos intercelulares de las células parietales del estómago. Por lo anterior fue que se evaluaron las dosis inhibitorias de cloranfenicol como control positivo. Para los experimentos cuantitativos, el control positivo fue de 25 µg/ml. En los experimentos cualitativos se ajustó la dosis hasta 40 µg/ml, ya que los inóculos fueron de aproximadamente de  $1 \times 10^8$  UFC/ml.

Para realizar los experimentos cuantitativos se ajustó el inóculo a  $1 \times 10^5$  UFC/ml. Previamente se trabajó con el espectrofotómetro a 550 nanómetros para estandarizar la turbidez del #1 de Mac Farland y posteriormente hacer la dilución correspondiente.

Los resultados obtenidos por dilución en placa como dilución en tubo son muy similares (o iguales) lo cual quiere decir que se puede medir la sensibilidad de la bacteria empleando cualquiera de ellos.

La CIM y CBM de ambos aceites esenciales fueron de 2 y 4 mg/ml para *L graveolens* y 4 y 8 mg/ml para *E globulus*.

Las concentraciones iniciales en la evaluación de los aceites esenciales fueron similares a las reportadas por Rubio en 1996 en cuyo trabajo se evaluó la actividad antibacteriana del aceite esencial *E. globulus* frente a *Escherichia coli*, *Salmonella tiphy*, *Enterobacter agglomerans* y *Shigella boydii*, las cuales son responsables de frecuentes infecciones intestinales en nuestro país.

Miranda en 2006, evaluó extractos acuosos de cuachalalate (*Ampbypteryngium adstingens*) contra *Helicobacter pylori*, reportó una dosis inhibitoria de 285.76  $\mu$ /ml.

No obstante que utilizó extractos acuosos el nivel de dosis es muy alto comparado con nuestros resultados.

## CONCLUSIONES

- Los aceites esenciales de *Lippia graveolens* y de *Eucalyptus globulus* presentaron actividad inhibitoria contra *Helicobacter pylori*.
- El nivel de inhibición quedo determinado por la CIM del aceite esencial de *Lippia graveolens* que fue de 2 mg/ml.
- La CIM del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* fue de 4 mg/ml.
- La siembra de la bacteria *Helicobacter pylori* se pudo estandarizar para realizar este trabajo.

## REFERENCIAS

Arcina-Lozano C. C., Loarca-Piña G., Lecona-Urbe S. y González E. M. 2004. El orégano: propiedades composición y actividad biológica de sus componentes, Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 54: 1-20.

Arizio O. y Curioni A. 2003. Productos aromáticos y medicinales (Doc.A-6). Estudio 1.EG.33.7. Componente A: Préstamo BID 925/OC-AR. Pre. II. Coordinación del Estudio. Oficina de la CEPAL-ONU en Buenos Aires. Ministerio de la economía de la nación. p. 130. Betancourt Y. 2001. Plantas medicinales y aromáticas de México. Jardín Botánico de Tlaxcala. pp. 35-51.

Brooks G., Butel J. y Morse S. 1999. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Manual Moderno. México. pp. 65-79.

Bruneton J. 1991. Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. Editorial Acribia. México. pp. 223-594.

Cave D. R. 1997. Epidemiology and Transmission of *Helicobacter pylori* Infection. How is *Helicobacter pylori* Transmitted .Gastroenterology 113: S 9-S 14.

Dunn B. E. 1993. Pathogenic mechanisms of *Helicobacter pilory*. Gastroenterology Clinica North America. pp.22-57.

Dewick P.M. 1997. Medicinal natural products. A biosynthetic approach. John Wiley y sons. 5: pp. 152-213.

Elgayyar M., Draughon F., Golden D. A. y Mount J. R. 2001. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. J. Food Protect. 64 (7): 1019-1024.

Garriz R. A. y Chamizo J. A. 1997. Del tequesquite al ADN. Algunas facetas de la química en México. México, Distrito Federal. p. 5232.

George T. A. 1988. Manual de procesos químicos en la industria. Tomo II. Editorial. Mc Graw Hill. pp. 50-58.

Harry L., Mobley G. y Méndez S. 2001. *Helicobacter pylori*: Physiology and genetics ASM Press. USA. pp. 18-32.

Hussain R. A., Kim J., Hu T. W., Pezzuto J. M. y Soejarto D. D. 1986. Planta medica. pp. 403-405.

IMSS. 2003 Unidad de Medicina Gastrointestinal clínica, Región Norte. México, D.F. IMSS. 103 (supl). pp. 45-52.

Kokkini S., Karousou R., Dardioti A., Krigas N. y Lanaras T. 1997. Autumn essential oils of greek orégano. Phytochem. 44 (5): pp. 883-886.

Koneman W. E. 1996. Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires. pp. 32-65.

Kumate J. 1988. Morbilidad y mortalidad por diarreas en México. En: Editorial Torregrosa Ferráez L., Olarte J., Rodríguez Suárez R. S., Santos Preciado J. I., Velásquez Jones L. Enfermedades diarreicas en el niño. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, Federico Gómez, 9ª ED., México, D.F. pp. 11-19.

Largo R J. y Ruiz de Sola F. 1996 Medicina Natural. Hierbas Curativas. Libsa España. pp. 49-60.

Lawrence B. M. 1984. The botanical and chemical aspects of orégano. Perfum. Flavorist. 9 (5): pp. 41-51.

Mac Faddin J. 1998. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. México. Editorial Médica Panamericana. pp 39-154-133.

Martínez D. M. 1991. Innovación tecnológica para eficientar el rendimiento en cosecha de orégano *Lippia berlandieri* Shawer. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (México). Centro Regional de Investigación Forestal y Agropecuaria del Pacífico Centro. Estado de Jalisco. pp. 104-115.

Martínez M. 1989. Las plantas medicinales de México. Ediciones Botas México. pp. 84-97.

Mazari H. M., López V. Y. y Calva J. J. 2001. *Helicobacter pylori* water systems for human use in Mexico City. Water Science Technology 43: 93-98.

Mena R. M. A. 2004. Estudio de la actividad antimicótica del aceite esencial del *Eucalyptus globulus* sobre algunas cepas que producen dermatitis y su aplicación en un producto de uso tópico. Tesis Profesional Q. F. B. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. pp. 20-50.

Miranda M. M. 2006. Efecto antimicrobiano del extracto acuoso de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) en bacterias gram (+), gram (-) y *Helicobacter pylori*. Tesis Licenciatura Q. F. B. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. pp. 74-78.

Mohar A. C., Guarner J., Goepfert R., Sanchez L. H., Alpherin D. y Personnet J. 2002. Alta frecuencia de lesiones precursoras de cáncer gástrico asociadas a *Helicobacter pylori* y respuesta al tratamiento, en Chiapas México. Gaceta de medicina de México. p.138.

Moss S., Meyer W. B., Renner E. L., Merki H. S., Gamboni G. y Beglinger C. 1993. Influence of *Helicobacter pylori*, Sex and Age on Serum Gastrin and Pepsinogen Concentration in Subjects without Symptoms and Patients with Duodenal Ulcers. *Gut*; 34:752-756.

Muñoz F. 2000. Plantas medicinales y aromáticas. Edición Mundi Prensa. Madrid, España. p. 99.

Northfield T.C., Mendall M. y Goggin P.C. 1994. *H. pylori* Infection Pathophysiology, Epidemiology and Management. Kluwer Academic Press Dordrecht. pp. 187-191.

Palacios L. E. E. 2005. Economía y plantas medicinales. Facultad de ciencias económicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. CSI. Boletín 52. pp. 28-32.

Peterson W. L. 1991. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. *New England Journal of Medicine*; 324. pp.1045-1048

Quer R. F. 1992. Plantas Medicinales. Editorial Labor S.A. Barcelona, España. pp. 39-46

Rubio C. L. J. 1996. Estudio químico y microbiológico de la planta *Eucalyptus globulus*. Tesis profesional de licenciatura Q. F. B. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. pp. 25-45.

Russo M., Galletti G C., Bocchini P. y Carnacini A. 1998. Essential oil and chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare ssp. hirtum* (Link) letsvaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. 46. pp. 3741-3746.

Sipponen P., Kekki M., Haapakoski J., Ihamäki T. y Siurala M. 1985. Gastric cancer risk in chronic atrophic gastritis: Statistical calculations of cross-sectional data. *Int J Cancer* 35. pp.173-177.

Skuola M., Gotsiou P., Naxakis G. y Johnson C B. 1999. A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (*Labiatae*). *Phytochemistry*. 52. pp. 649-657.

Van der Berghe D. A. y Vlietink A.. J. 1991. Screening methods for bacterial agents from higher plants. In: Hostettmann, K. (Ed) *Methods in plant biochemistry*. Volumen. 6. Assay for bioactivity. pp 47-69.

Zamudio L. A. 2005. Estudio hemero-bibliográfico del cuachalalate (*Amphypterygium adstringens*) en forma de fitofármaco. Tesis Profesional. Q. F. B. Fes Cuautitlán. UNAM. pp. 10-15.

Wadstrom T. 1995. An update on *Helicobacter pylori*. *Current Opinion in Gastroenterology*, 11. pp. 69-75.

#### PAGINAS DE WEB CONSULTADAS

[www. Herbolaria.com](http://www.Herbolaria.com).

[www.pnas.org/cgi/reprint/102/30/10646?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&searchid=1&FIRSTINDEX=0&minscore=5000&resourcetype=HWCIT](http://www.pnas.org/cgi/reprint/102/30/10646?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&searchid=1&FIRSTINDEX=0&minscore=5000&resourcetype=HWCIT).

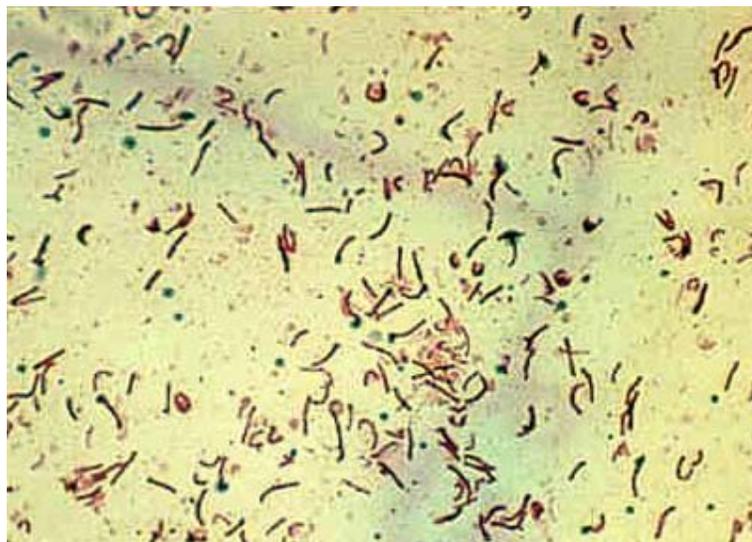
## ANEXOS

### I. Tinción de Gram

Desarrollado por el médico danés Hans Christian Joachim Gram, es un procedimiento utilizado universalmente para diferenciar grupos bacterianos con base en las propiedades al retener o no los colorantes de la prueba.

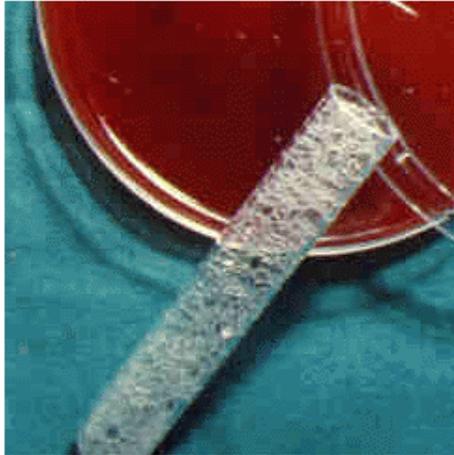
Con el asa (conteniendo la muestra) sobre la lámina portaobjetos se descarga las bacterias y estas se tiñen con violeta de genciana (derivado metilado anilínico) y después se tratan con la solución de Gram (1 parte de yodo, 2 partes de yoduro potásico y 300 partes de agua); por último se lavan con alcohol etílico, y unas bacterias retienen el fuerte color azul de la violeta de genciana y otras se decoloran por completo. A veces se añade una contra tinción con fucsina o eosina para teñir las bacterias decoloradas de color rojo y hacerlas más visibles.

Se denominan bacterias Gram positivas a aquellas que retienen la tinción azul y bacterias Gram negativas a las que quedan decoloradas (Mac Faddin, 1998).



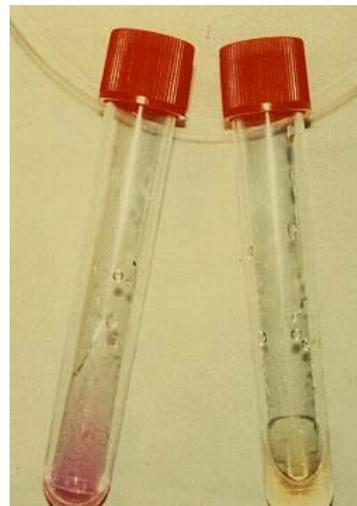
## II. Prueba de la Catalasa

La catalasa es una enzima capaz de descomponer el agua oxigenada y convertirla en agua libre de oxígeno. La prueba consistió en recoger el centro de una colonia pura que se colocó sobre un portaobjetos, se agregó con una pipeta Pasteur una gota de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 3%, y se observó la formación de burbujas (liberación de gas), lo que indicó un resultado positivo (Mac Faddin, 1998).

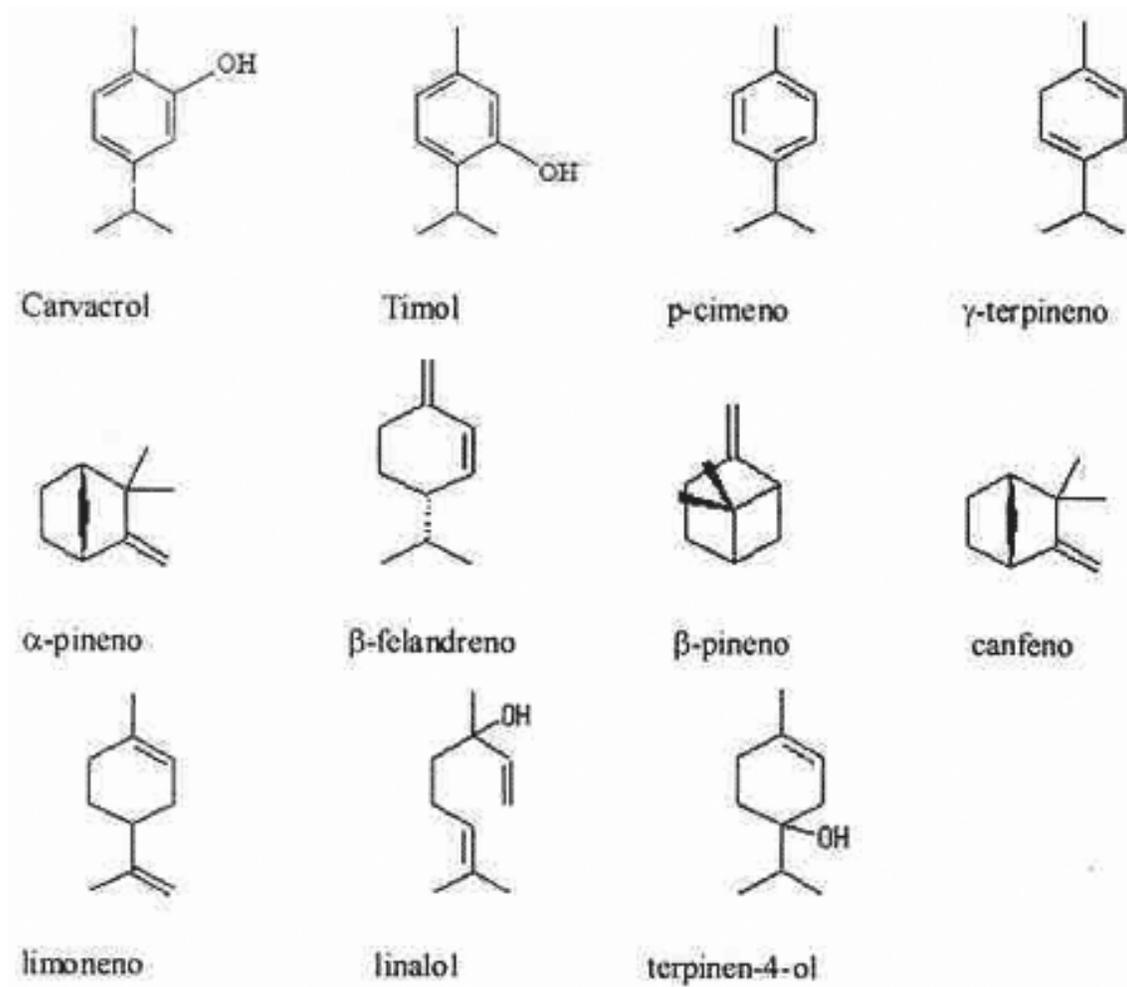


## III. Prueba de la Ureasa

La ureasa es una enzima capaz de hidrolizar la urea produciendo amonio, se recogió una colonia pura e introdujo en un vial limpio conteniendo urea al 6% con el indicador de ph (rojo de fenol), se observó el cambio de color de la suspensión de un color amarillo a un color rosado (esto indica prueba positiva) dentro de los primeros 10 minutos (Mac Faddin, 1998).

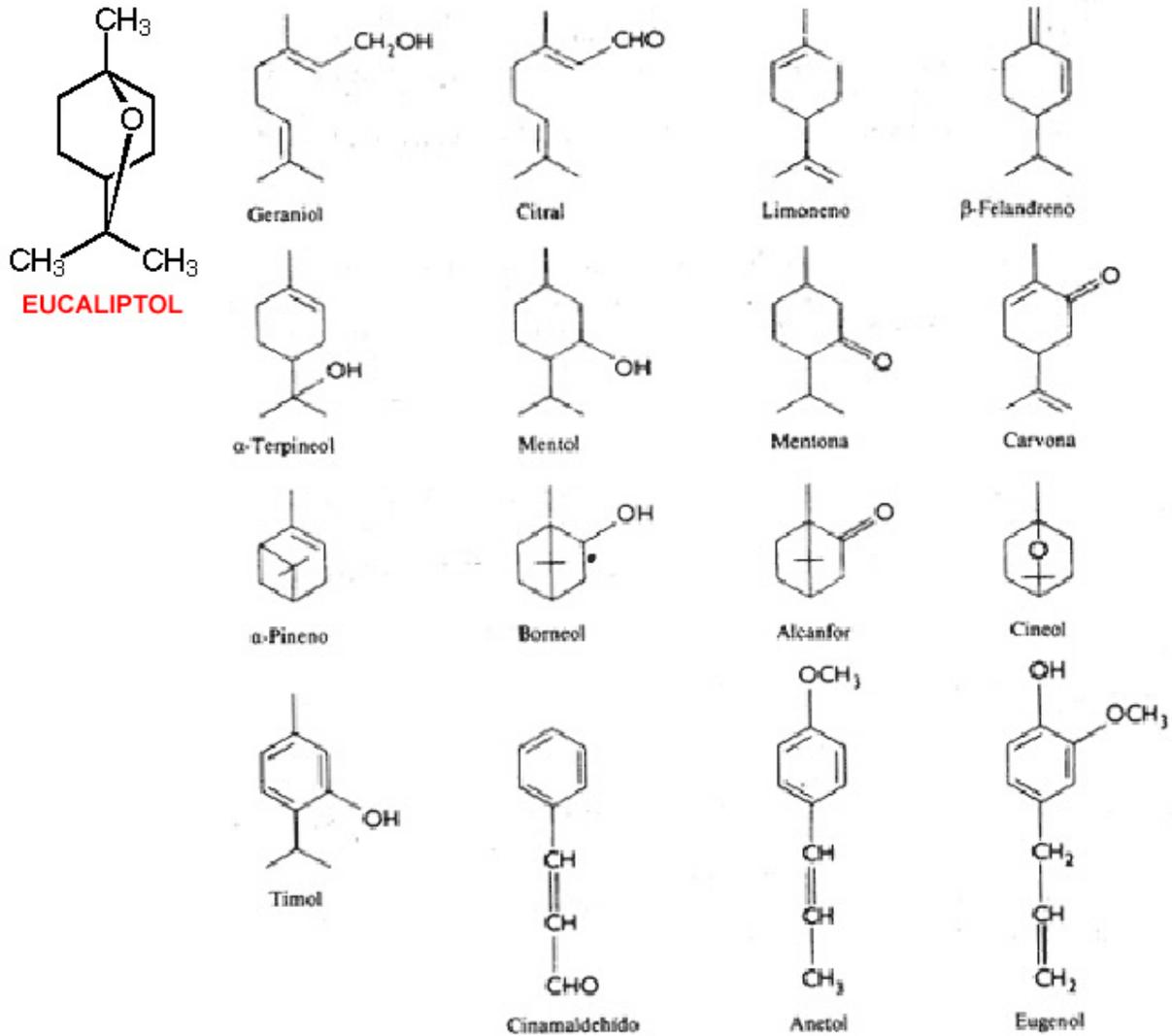


IV. Estructura química de los principales componentes de *Lippia graveolens* (orégano)



(Domínguez, 1973).

▼ Estructura química de los principales componentes en *Eucalyptus globulus* (eucalipto)



(Dominguez, 1973).