Actividad inhibitoria de extractos y aceites esenciales de especies condimentarias, alimenticias y medicinales contra *Campylobacter jejuni*

Samol V, Santizo C y Cáceres A.

Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Universidad de San Carlos de Guatemala

Resumen

Los agentes químicos son los métodos de conservación más usados, pero no cumplen con el concepto de natural o seguro demandado por los consumidores, ya que algunos presentan cierta toxicidad. Por eso la industria busca antimicrobianos naturales para la conservación de alimentos.

El propósito fue evaluar la actividad contra *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 y dos aislamientos clínicos (*C. jejuni* UVG 62-1773-6 y *C. coli* UVG 62-1769-9) de extractos diclorometánico (ED), metanólico (EM) y aceite esencial (AE) de *Cornutia grandifolia*, *Eryngium foetidum*, *Fernaldia pandurata*, *Lippia alba*, *L. chiapasensis*, *L. graveolens*, *Ocimum micranthum*, *Pimenta dioica*, *Piper auritum*, *P. jacquemontianum*, *Psidium guajava* y *Tagetes lucida*.

La actividad inhibitoria se demostró por el método de difusión en disco. El tamizaje a 200 µg/mL determinó las especies activas; ED de *L. graveolens* contra *C. coli* y *T. lucida* contra *C. jejuni* ATCC 33291 y UVG 62-1773-6 y EM de *L. alba*, *L. graveolens* y *P. jacquemontianum* contra *C. jejuni* ATCC 33291, *L. alba* contra *C. jejuni* UVG 62-1773-6 y *L. alba*, *L. graveolens* y *T. lucida* contra *C. coli*. La concentración inhibitoria mínima (CIM) del ED de *T. lucida* fue 100 µg/mL y de 200 µg/mL para los demás. En el tamizaje y CIM de AE, los más activos (CIM <1.25 µL) contra *C. jejuni* ATCC 33291 fueron, *L. graveolens*, *O. micranthum* y *P. dioica*; contra *C. jejuni* UVG 62-1773-6 fue *L. graveolens* y contra *C. coli* fue *L. graveolens*, *O. micranthum* y *P. dioica*. Se concluye que los extractos y AE de estas especies, pueden utilizarse como una alternativa natural en la conservación de alimentos y en la industria farmacéutica.

Palabras clave: Conservación de alimentos, *Tagetes lucida*, *Lippia graveolens*, *Pimenta dioica*, *Ocimum micranthum*

Essential oils and extracts inhibitory activities of seasoning, nutritional and medicinal species against *Campylobacter jejuni*.

Abstract

Chemical compounds are the most used methods for food conservation, but usually they do not comply with the concept of natural or safety requested by the consumers, because some of them have some degree of toxicity. For this reason industry is in the search for natural antimicrobials for food conservation

The purpose was to evaluate the activity against *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 and two clinical isolates (*C. jejuni* UVG 62-1773-6 and *C. coli* UVG 62-1769-9) of dichlorometane (DE) and methanol (ME) extracts, and essential oil (EO) of *Cornutia grandifolia*, *Eryngium foetidum*, *Fernaldia pandurata*, *Lippia alba*, *L. chiapasensis*, *L. graveolens*, *Ocimum micranthum*, *Pimenta dioica*, *Piper auritum*, *P. jacquemontianum*, *Psidium guajava* and *Tagetes lucida*.

Inhibitory activity was demonstrated by a disk diffusion method. Screening at 200 µg/mL showed the active species; DE of *L. graveolens* against *C. coli* and *T. lucida* against *C. jejuni* ATCC 33291 and UVG 62-1773-6 and ME of *L. alba*, *L. graveolens* and *P. jacquemontianum* against *C. jejuni* ATCC 33291, *L. alba* against *C. jejuni* UVG 62-1773-6 and *L. alba*, *L. graveolens* and *T. lucida* against *C. coli*. Minimal inhibitory concentration (MIC) of DE of *T. lucida* was 100 µg/mL and 200 µg/mL for the others. In the screening and MIC of EO, the most active (CIM <1.25 µL) against *C. jejuni* ATCC 33291 were, *L. graveolens*, *O. micranthum* and *P. dioica*; against *C. jejuni* UVG 62-1773-6 was *L. graveolens* and against *C. coli* were *L. graveolens*, *O. micranthum* and *P. dioica*. It is concluded the extracts and EO of these species could be used as natural alternative in food conservation and in pharmaceutical industry.

Key words: Food conservation, *Tagetes lucida*, *Lippia graveolens*, *Pimenta dioica*, *Ocimum micranthum*

Introducción

El incremento en la resistencia a los antibióticos de algunos patógenos asociados con enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) es una preocupación reciente. Por lo tanto se ha incrementado la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos antimicrobianos de origen natural, efectivos y no tóxicos (Burt, 2004; Draughon, 2006; Hammer, Carson & Riley, 1999).

Las ETAs se producen por el consumo de agua o alimentos contaminados con microorganismos enteropatógenos, entre los que *Campylobacter jejuni* y *C. coli*, ocupan un lugar muy importante, ya que son la causa principal de gastroenteritis. Varios estudios han identificado a la carne de aves de corral como la principal fuente de infección por esta bacteria. *Campylobacter* sp. es un bacilo Gram negativo de crecimiento lento, es un patógeno de humanos y comensal de aves, ganado y animales domésticos (Graniel, Sánchez, Heredia & García, 2005; Griffiths & Park, 1990; Koneman, Allen, Janda, Schereckenberger & Winn, 1999).

El presente estudio se realizó con el objetivo de evaluar la actividad inhibitoria de extractos y aceites esenciales de 12 especies condimentarias, alimenticias y medicinales, de uso popular en Guatemala, contra el crecimiento de *C. jejuni* y *C. coli*, utilizando la técnica de difusión en disco. De poseer efecto inhibitorio, se podrían proponer importantes aplicaciones para la preservación de alimentos y de esta forma evitar infecciones asociadas a este microorganismo.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Doce especies vegetales utilizadas por sus propiedades condimentarias y medicinales en Guatemala fueron recolectadas y determinadas (Tabla 1). El órgano de elección fue la hoja, excepto para *F. pandurata* en la cual se evaluó la flor y para *P. dioica* el fruto.

Obtención de extractos por percolación

Los extractos se obtuvieron con disolventes de diferente polaridad (diclorometano y metanol). El material vegetal se secó y tamizó, se colocaron 200 g en un percolador, se cubrió con diclorometano y se dejó reposar por 24 h, luego se concentró en rotaevaporador hasta obtener una consistencia sólida; el diclorometano recuperado fue reutilizado hasta completar la extracción.

Este procedimiento fue repetido por tres días hasta que el disolvente dejó de presentar color. De igual forma se siguió con la extracción con metanol. El extracto obtenido se colocó en cristalizadores de vidrio, previamente tarados, durante 7 a 15 días en desecador con sílica gel e indicador de humedad, hasta observar una consistencia sólida (Laboratorio de Investigación de Productos Naturales [LIPRONAT], 2005).

Obtención de aceites esenciales por hidrodestilación
Se utilizó de 25-30 g de materia vegetal seca con 500 mL de agua destilada en un sistema Neoclevenger, se destiló el aceite, el cual fue separado de la fase acuosa con pentano. Luego se dejó evaporar en una campana de extracción por 24 h y se determinó el rendimiento del aceite esencial obtenido. Este se almacenó en viales oscuros a 4°C.

Determinación de la actividad inhibitoria

Se realizó una curva de actividad dosis/efecto por el método de difusión en disco, utilizando discos impregnados con eritromicina MK® (antibiótico de elección contra *Campylobacter* sp.) en concentraciones de 0.60, 1.21 y 2.43 µg. Se demostró que existe relación dosis/efecto, por lo que se eligió un disco conteniendo 0.60 µg como referencia para el bioensayo.

Los microorganismos evaluados fueron *C. jejuni* ATCC 33291, *C. jejuni* UVG 62-1773-6 y *C. coli* UVG 62-1769-9. Estas cepas fueron proporcionadas por el Centro de Estudios en Salud (CES) de la Universidad del Valle de Guatemala.

El tamizaje consistió en determinar la actividad antibacteriana utilizando el método de difusión en disco en agar Mueller Hinton-sangre de carnero 7%. Este consistió en enfrentar las cepas bacterianas contra los extractos (200 µg/mL) y aceites esenciales (10 µL) en discos de papel filtro de 6 mm de diámetro. Las tres bacterias evaluadas fueron inoculadas en placas de agar sangre 7% a 36°C por 48 h en condiciones de microaerofilia (CampyGen™ Oxoid) utilizando un estándar de MacFarland 1.0. Para los extractos y aceites con actividad, se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) utilizando concentraciones de 100, 50, 25 y 12.5 µg/mL para los extractos, y dosis de 5, 2.5 y 1.25 µL para los aceites esenciales. El control positivo fue eritromicina (0.60 µg) y el control negativo fue metanol. Se realizó un total de 5 repeticiones (Laboratorio de Bioensayos, 2005).

Análisis de datos

Fue basado en una prueba de hipótesis binomial, donde $H_0: p=0.5$ (no tiene efecto inhibitorio) y $H_a: p>0.5$ (si tiene efecto inhibitorio). Si 5 repeticiones

son exitosas, Ho se rechaza para el nivel a establecido, y se dirá que los extractos y aceites esenciales evaluados por el método de difusión en disco presentan actividad inhibitoria *in vitro* significativa frente a *C. jejuni* con un valor $p=0.0312$.

Resultados

Obtención del material vegetal

Se colectaron 12 especies vegetales incluidas en siete familias, las cuales son utilizadas por sus propiedades condimentarias, alimenticias y medicinales. Estas fueron colectadas en áreas de cultivo controlado para poder tener reproducibilidad en los resultados (Tabla 1).

Obtención de extractos y aceites esenciales

Para los extractos diclorometánicos, la hoja de *P. auritum* proporcionó el mayor rendimiento (20.4%); mientras que para los extractos metanólicos *L. chiapasensis* proporcionó el mayor rendimiento (15.9%). En el caso de los aceites esenciales, se evaluaron las 12 especies, sin embargo se obtuvo aceite únicamente de nueve. Las especies *C. grandifolia*, *E. foetidum* y *F. pandurata* dieron un rendimiento tan bajo que fue imposible obtener suficiente cantidad de aceite por la técnica usada, por lo que no se utilizaron. La hoja de *L. graveolens* presentó el mayor rendimiento (3.0%) (Tabla 2).

Actividad anti *Campylobacter* sp.

La actividad antimicrobiana *in vitro* fue estimada midiendo el diámetro de los halos de inhibición de crecimiento y valores CIM. En la fase de tamizaje, se determinó que los extractos obtenidos con diclorometano fueron los menos activos. Las tres cepas mostraron igual comportamiento, ya que fueron sensibles a un extracto, los halos de inhibición fueron de menor tamaño. El extracto de *T. lucida* presentó actividad significativa ($p=0.0312$) contra *C. jejuni* ATCC 33291 y *C. jejuni* UVG 62-1773-6. En tanto que el extracto de *L. graveolens* fue capaz de inhibir a *C. coli* UVG 62-1769-9 (Tabla 3).

En el caso de los extractos metanólicos los halos de inhibición presentaron menor tamaño. El extracto de *L. alba* inhibió a las tres cepas evaluadas, *L. graveolens* fue activo contra *C. jejuni* ATCC 33291 y *C. coli* UVG 62-1769-9; *P. Jacquemontianum* inhibió a *C. jejuni* ATCC 33291, y *T. lucida* a *C. coli* UVG 62-1769-9 (Tabla 3).

En cuanto al tamizaje de aceites esenciales, *L. graveolens* presentó actividad contra las tres cepas del estudio. *C. jejuni* ATCC 33291 presentó resistencia a los aceites esenciales de *P.*

Jacquemontianum y *P. guajava*. *C. coli* UVG 62-1769-9 fue resistente al aceite esencial de *T. lucida* (Tabla 4).

Se determinó la CIM de extractos y aceites esenciales que presentaron actividad anti-*Campylobacter*. Los resultados indican que el extracto diclorometánico de *T. lucida* presentó una CIM de 100 $\mu\text{g/mL}$ sobre la cepa de *C. jejuni* UVG 62-1773-6, mientras que el resto de extractos (diclorometánicos y metanólicos) demostraron actividad en la misma concentración inicial evaluada en la fase de tamizaje (200 $\mu\text{g/mL}$) (Tabla 5). La CIM de aceites esenciales mostró que *L. graveolens*, *O. micranthum* y *P. dioica* fueron los de mayor capacidad inhibitoria al presentar un valor menor que el resto de los aceites esenciales evaluados, por lo que estos mostraron ser más útiles contra las cepas de *C. jejuni* ATCC 33291 y *C. coli* UVG 62-1769-9. El aceite de *L. graveolens* fue el más eficiente en sus propiedades inhibitorias, al ser activo contra las tres cepas bacterianas presentando un valor CIM $<1.25 \mu\text{L}$ (Tabla 6).

Discusión

Las especies vegetales estudiadas corresponden a siete familias (Tabla 1) las cuales son utilizadas como condimento en alimentos o en la medicina tradicional guatemalteca. Estas son de fácil obtención en Guatemala y su aroma es indicador de la posible presencia de aceite esencial, cuyo contenido es de interés, ya que éstos son los más estudiados como antibacterianos, además es más fácil de incorporar en la conservación de alimentos (Burt, 2004; Nedorostova, Kloucek, Kokoska, Stolcova & Pulkrabek, 2009).

Los extractos diclorometánicos que presentaron actividad inhibitoria significativa ($p=0.0312$) contra *Campylobacter* fueron *L. graveolens* y *T. lucida*. El diclorometano permite obtener compuestos con determinadas características químicas por su naturaleza apolar, dichos compuestos pertenecen al grupo de terpenoides, resinas y aceites, los cuales presentan actividad bactericida atacando la membrana celular a través de la bicapa lipídica, desencadenando una serie de acciones que causan la destrucción bacteriana (Cowan, 1999; Mendoza, Wilkens & Urzua 1997). Al realizar la CIM con concentraciones de 100, 50, 25 y 12.5 $\mu\text{g/mL}$, solamente *T. lucida* a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ fue activa. Por lo tanto, para el resto de extractos la CIM obtenida fue de 200 $\mu\text{g/mL}$.

Los extractos metanólicos de *L. alba*, *L. graveolens*, *P. Jacquemontianum* y *T. lucida* fueron los que

presentaron actividad inhibitoria significativa ($p=0.0312$) (Tabla 5). El metanol es un disolvente polar, que permite extraer la mayoría de sustancias naturales de interés tales como alcaloides, flavonoides, terpenos, taninos, saponinas, entre otros. En general, la acción bactericida de estas sustancias es formar canales iónicos tanto en la membrana como en la pared celular, aumentando la permeabilidad de la misma, permitiendo la entrada de compuestos químicos presentes en los extractos (Cowan, 1999; Haslam, 1996; Sato, Odetani, Fujiwara, Tsuchiya, Fujii, Iinuma, Tosa & Ohkawa, 1996). Al realizar la CIM con las concentraciones mencionadas, ninguno presentó actividad, por lo tanto la CIM obtenida fue de 200 $\mu\text{g/mL}$.

Los aceites esenciales presentaron mayor actividad inhibitoria, comparada con la de los extractos diclorometánico y metanólico. Además, puede observarse que los halos de inhibición producidos por los aceites esenciales fueron considerablemente mayores, seguramente porque esta es una fracción más concentrada que le confiere mayor potencia y toxicidad.

Los aceites esenciales se caracterizan por ser una mezcla compleja de varios compuestos pertenecientes a hidrocarburos (compuestos terpénicos), alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y fenoles. La naturaleza antimicrobiana de estos aparentemente está relacionada con su alto contenido de compuestos fenólicos. Asimismo, su actividad puede estar relacionada con la configuración estructural de sus constituyentes y su grupo funcional y posibles interacciones sinérgicas entre sus componentes, por lo que la actividad biológica no se puede atribuir a un compuesto en particular (Maguna, Romero, Garro & Okulik, 2006; Marino, Bersani & Comi, 2001).

Una característica fundamental de los aceites esenciales y sus componentes es su "hidrofobicidad", la cual le permite distribuirse en los lípidos de la membrana celular y mitocondrial, alterando su estructura y haciéndolas más permeables, lo que desencadena una serie de procesos entre los que se mencionan, degradación de la pared celular, interacción con su composición y destrucción de la membrana citoplásmica, daño a las proteínas de membrana, causando una fuga de iones y componentes celulares, coagulación del citoplasma, daño en los mecanismos enzimáticos para la producción de energía y el metabolismo, lo que lleva finalmente a la muerte celular (Bakkali, Averbek & Idaomar, 2008; Burt, 2004).

Los aceites esenciales de *L. graveolens*, *O. micranthum* y *P. dioica* mostraron una CIM $<1.25 \mu\text{L}$, resaltando que la actividad inhibitoria de *L. graveolens* sobre las tres cepas evaluadas fue significativa ($p=0.0312$). Diversas investigaciones realizadas sobre esta especie vegetal, han demostrado actividad inhibitoria sobre una variedad de microorganismos entre los que se mencionan a *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enterica*. Dicha actividad se atribuye principalmente a la acción antimicrobiana del carvacrol y timol, compuestos químicos muy similares estructuralmente, presentes en este aceite esencial, que tienen un grupo hidroxilo en diferente posición del anillo fenólico. La mezcla de los dos, en cantidades apropiadas, da un efecto aditivo sobre la inhibición total, aumentando la permeabilidad de la membrana celular, lo que afecta la integridad de la misma, perjudicando además la homeostasis y el equilibrio de iones inorgánicos (Lambert, Skandamis, Coote & Nychas, 2001).

Existen dos tipos de orégano, el orégano europeo nativo de la región mediterránea (*Origanum sp.*), y el orégano americano (*Lippia graveolens*, *L. origanoides*, entre otras). La especie utilizada en Guatemala es *L. graveolens*, hierba aromática que juega un papel primordial en el arte culinario, ya que se emplea como condimento en forma seca y fresca, para dar sabor a salsas y aromatizar varias comidas. Además, es utilizada en la medicina tradicional. En este estudio fue la especie que presentó el mayor rendimiento en aceite esencial y en actividad, propiedades que hacen de esta especie un potencial para propiciar su industrialización. Recientemente ha surgido un gran interés en la industria alimenticia para ser utilizada como un aditivo natural que reemplace los productos sintéticos.

De las tres cepas evaluadas, se encontró que *C. jejuni* UVG 62-1773-6 fue más resistente a los extractos y aceites esenciales, una explicación, es que muchas bacterias se adecuan a las condiciones ambientales a las que son expuestas. Un ejemplo de ello es que algunas cepas bacterianas son capaces de tolerar altas concentraciones de sustancias, estos mecanismos no se conocen con detalle, aunque una posibilidad, es que modifiquen la membrana externa de la envoltura celular, activando los sistemas para remover los compuestos tóxicos que las afectan. Otra explicación, es que esta cepa haya desarrollado resistencia en el hospedero de donde fue aislada, y posea factores de virulencia que no están presentes en las cepas restantes (Levy, 2002).

Un estudio paralelo a este, realizado en 2010,

utilizando extractos y aceites esenciales de las mismas especies vegetales contra *L. monocytogenes*, demostró actividad inhibitoria significativa ($p=0.0312$) del extracto diclorometánico de *E. foetidum* y *T. lucida*, a una concentración de 200 μg , siendo esta última similar a la presente investigación. Mientras que los extractos metanólicos no presentaron actividad, comparado con este estudio, donde *L. alba*, *L. graveolens*, *P. Jacquemontianum* y *T. lucida* si presentaron actividad inhibitoria significativa ($p=0.0312$) contra *Campylobacter*, a una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$. En cuanto a los aceites esenciales se demostró actividad inhibitoria significativa ($p=0.0312$) de *L. alba*, *L. graveolens* y *P. dioica*, a una dosis de 6 μL (Álvarez, García, Oliva & Rojas, 2010); en comparación con este, las nueve especies de las que se obtuvo aceite esencial, presentaron actividad a diferentes dosis (Tabla 6). A pesar de la naturaleza apolar del aceite esencial de *T. lucida* y la posible presencia de este en el extracto diclorometánico, no se encontró correlación en ambos. Únicamente entre el extracto de *L. graveolens* y su aceite esencial. Indicando que no necesariamente los compuestos extraídos entre uno u otro tienen la actividad inhibitoria, o porque durante el proceso de hidrodestilación ocurren reacciones que modifican la composición química del aceite esencial.

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

El aceite esencial de *L. graveolens* fue el más efectivo contra las tres cepas bacterianas evaluadas, al mostrar una CIM $<1.25 \mu\text{L}$, lo que permite proponer a esta especie en futuros programas de aprovechamiento para diferentes usos y aplicaciones en productos fitofarmacéuticos y alimenticios, y de esta forma optimizar la calidad de los mismos.

Agradecimiento

Los autores agradecen a la Licda. Isabel Gaitán del Laboratorio de Bioensayos, Departamento de Citohistología; Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), por su asesoría técnica y profesional. A la Licda. Beatriz López y Lesbia Arévalo del Centro de Estudios en Salud, Universidad del Valle de Guatemala (UVG), por proporcionar las cepas utilizadas en este estudio. A Luis Álvarez y Max Mérida, por su apoyo en la recolección e identificación del material vegetal evaluado.

Referencias

- Álvarez, R., García, A., Oliva, V. & Rojas, A. (2010). Determinación de actividad inhibitoria in vitro de extractos diclorometánicos y metanólicos y aceites esenciales de doce especies condimentarias y medicinales guatemaltecas contra *Listeria monocytogenes*. Seminario de Investigación para optar al título de Químicas Biólogas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, Guatemala.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564-582.
- Draughon, F.A. (2006). Bioconservadores botánicos en alimentos. *Mundo láctico y cármico*, Julio/Agosto, 10-18.
- Grael, M.J., Sánchez, E., Heredia, N. & García, S. (2005). Extractos de especias y condimentos contra el crecimiento de *Campylobacter coli* y *C. jejuni*. Congreso Internacional de Inocuidad Alimentaria. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.
- Griffiths, P.L. & Park, R.W. (1990). *Campylobacters* associated with human diarrhoeal disease. *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 281-301.

Hamer, K.A., Carson, C.F. & Riley, T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985-990.

Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: posible modes of action. *Journal of Natural Products*, 59, 205-215.

Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C. & Winn, W.C. (1999). *Diagnóstico Microbiológico* (5a ed). España: Editorial Panamericana.

Laboratorio de Bioensayos. Departamento de Citohistología (2005). PEO No. 9 Tamizaje de la actividad anti-*Campylobacter jejuni*. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (2005). Manual de Operaciones. PEO extracción fraccionada, PEO concentración usando rotaevaporador, PEO extracción de aceites esenciales por Neoclevenger. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Lambert, R.J., Skandamis, P.N., Coote, P.J. & Nychas, G.-J.E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453-462.

Levy, S.B. (2002). Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 65S-71S.

Mendoza, L., Wilkens, M. & Urzua, A. (1997). Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 58, 85-88.

Maguna, F., Romero, A., Garro, O. & Okulik, N. (2006). Actividad antimicrobiana de un grupo de terpenoides [Resumen]. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Publicación Especial*

Marino, M., Bersani, C. & Comi, G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiacea and Compositae. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 187-195.

Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M. & Pulkrabek, J. (2009). Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control*, 20, 157-160.

Sato, M., Fujiwara, S., Tsuchiya, H., Fujii, T., Iinuma, M., Tosa, H. & Ohkawa Y. (1996). Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 54, 171-176.

Anexos

Tabla 1. Información general de las especies evaluadas

Familia	Especie vegetal	Nombre común	No.	Lugar de colecta	Georeferencia	Altura**	Usos***
Apiaceae	<i>Eryngium foetidum</i>	Culantro	1110	Samayac, Such.	N 14°33'05.8" O 91°27'59.6"	465	C, M
Apocynaceae	<i>Fernaldia pandurata</i>	Loroco	1152	Gualán, Zacapa	N 15°06'55.73" O 89°21'40.20"	691	A, C
Asteraceae	<i>Tagetes lucida</i>	Pericón	1127	San Cristóbal Totonicapán	N 14°55'05.70" O 91°26'31.64"	2400	M
Lamiaceae	<i>Ocimum micranthum</i>	Albahaca	1064	Samayac, Such.	N 14°33'06.1" O 91°28'01.0"	465	C, M
Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i>	Guayaba	1169	Samayac, Such.	N 14°36'7.14" O 91°28'2.22"	468	A, M
	<i>Pimenta dioica</i>	Pimienta gorda	1171	Salamá, BV	N 14°33'7.9" O 91°28'2.6"	471	C, M
Piperaceae	<i>Piper auritum</i>	Santa María	1170	Samayac, Such.	N 14° 33'6.8" O 91°28'0.7"	470	C, M
	<i>Piper jacquemontianum</i>	Cordoncillo	1098	Samayac, Such.	N 14°33'05.4" O 91°27'57.2"	462	M
Verbenaceae	<i>Cornutia grandifolia</i>	Jorokté	04706*	San Juan Chamelco, AV	N 15°25'26.05" O 90°19'41.23"	1368	M
	<i>Lippia alba</i>	Salvia sija	1131	Facultad de Agronomía, USAC	N 14°34.811' O 90°33.220'	1465	M
	<i>Lippia chiapasensis</i>	Salviyá	43411*	Paraje Juchanep, Totonicapán	N 14°56.106' O 91°22.259'	2570	M
	<i>Lippia graveolens</i>	Orégano	1132	Facultad de Agronomía, USAC	N 14°34.811' O 90°33.220'	1465	C, M

* No. del Herbario de la Escuela de Biología (BIGU), Facultad CCQQ y Farmacia. El resto son del Herbario de Farmaya (CFEH)

** msnm, metros sobre el nivel del mar

*** Usos: A, Alimento; C, Condimento; M, Medicinal

Tabla 2. Rendimiento (%) de extractos diclorometánico (D), metanólico (M) y aceite esencial (AE)

Especie vegetal	Parte	D	M	AE
<i>C. grandifolia</i>	Hoja	2.0	2.3	*NSO
<i>E. foetidum</i>	Hoja	3.0	12.6	*NSO
<i>F. pandurata</i>	Flor	1.0	1.2	*NSO
<i>L. alba</i>	Hoja	9.9	6.4	0.82 ± 0.05
<i>L. chiapasensis</i>	Hoja	14.7	15.9	0.91 ± 0.17
<i>L. graveolens</i>	Hoja	10.3	11.3	3.08 ± 0.11
<i>O. micranthum</i>	Hoja	5.9	6.5	1.42 ± 0.11
<i>P. dioica</i>	Fruto	2.8	9.6	0.97 ± 0.42
<i>P. auritum</i>	Hoja	20.4	13.4	1.10 ± 0.23
<i>P. Jacquemontianum</i>	Hoja	7.4	6.6	0.44 ± 0.08
<i>P. guajava</i>	Hoja	4.7	13.5	0.20 ± 0.08
<i>T. lucida</i>	Hoja	3.8	14.3	0.26 ± 0.05

*NSO: No se obtuvo

Tabla 3. Actividad inhibitoria *in vitro* (200 µg/mL) por difusión en disco de extractos diclorometánicos y metanólicos de 12 especies vegetales contra cepas de *Campylobacter*

Especie vegetal	Parte	Diclorometano			Metanol		
		A ^a	B	C	A	B	C
<i>E. foetidum</i>	Hoja	<6.0 ^b	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0
<i>C. grandifolia</i>	Hoja	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0
<i>F. pandurata</i>	Flor	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0
<i>L. alba</i>	Hoja	<6.0	<6.0	<6.0	10.0 ^c	10.0 ^c	9.0 ^c
<i>L. chiapasensis</i>	Hoja	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0
<i>L. graveolens</i>	Hoja	<6.0	<6.0	8.0 ^c	8.0 ^c	<6.0	10.0 ^c
<i>O. micranthum</i>	Hoja	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0
<i>P. dioica</i>	Fruto	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0
<i>P. auritum</i>	Hoja	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0
<i>P. Jacquemontianum</i>	Hoja	<6.0	<6.0	<6.0	8.0 ^c	<6.0	<6.0
<i>P. guajava</i>	Hoja	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0
<i>T. lucida</i>	Hoja	7.0 ^c	8.0 ^c	<6.0	<6.0	<6.0	8.0 ^c
Eritromicina (0.60 µg)	-	23	24	24	24	24	24
Metanol (negativo)	-	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0

^aCepas = A: *C. jejuni* ATCC 33291; B: *C. jejuni* UVG 62-1773-6; C: *C. coli* UVG 62-1769-9^bDiámetro en mm milímetros, promedio de cinco repeticiones independientes^cActividad inhibitoria significativa (p=0.0312)

Tabla 4. Actividad inhibitoria *in vitro* de aceites esenciales de doce especies vegetales contra cepas de *Campylobacter*, utilizando la técnica de difusión en disco 10 µL

Especie vegetal	Parte utilizada	A ^{a,b}	B	C
<i>L. alba</i>	Hoja	22.0 ^c	<6.0	21.0 ^c
<i>L. chiapasensis</i>	Hoja	17.0 ^c	<6.0	13.0 ^c
<i>L. graveolens</i>	Hoja	15.0 ^c	10.0 ^c	25.0 ^c
<i>O. micranthum</i>	Hoja	18.0 ^c	<6.0	18.0 ^c
<i>P. dioica</i>	Fruto	27.0 ^c	<6.0	19.0 ^c
<i>P. auritum</i>	Hoja	15.0 ^c	<6.0	15.0 ^c
<i>P. Jacquemontianum</i>	Hoja	<6.0	<6.0	12.0 ^c
<i>P. guajava</i>	Hoja	<6.0	<6.0	9.0 ^c
<i>T. lucida</i>	Hoja y tallo	13.0 ^c	<6.0	<6.0
Eritromicina (0.60 µg)	-----	23.0	24.0	26.0
Metanol (negativo)	-----	<6.0	<6.0	<6.0

^aCepas = A: *C. jejuni* ATCC 33291; B: *C. jejuni* UVG 62-1773-6; C: *C. coli* UVG 62-1769-9

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

^cActividad inhibitoria significativa (p=0.0312)

Tabla 5. CIM de extractos diclorometánicos y metanólicos que presentaron actividad anti *Campylobacter* en la fase de tamizaje

Especie vegetal	Extracto	A ^a	B	C
<i>L. alba</i>	MeOH	200	200	200
<i>L. graveolens</i>	CH ₂ Cl ₂	>200	>200	200
	MeOH	200	>200	200
<i>P. Jacquemontianum</i>	MeOH	200	>200	>200
<i>T. lucida</i>	CH ₂ Cl ₂	200	100 ^b	>200
	MeOH	>200	>200	200
Eritromicina (0.60 µg)	-	24.0	23.0	25.0
Metanol (control negativo)	-	<6.0	<6.0	<6.0

^aCepas = A: *C. jejuni* ATCC[®] 33291; B: *C. jejuni* UVG 62-1773-6; C: *C. coli* UVG 62-1769-9

^bActividad inhibitoria significativa (p=0.0312)

Tabla 6. CIM de aceites esenciales que presentaron actividad anti *Campylobacter* en la fase de tamizaje

Especie vegetal	A ^a		B		C	
	μL	Ø ^b	μL	Ø	μL	Ø
<i>L. alba</i>	5.0 ^c	8.0	>10.0	<6.0	5.0 ^c	7.0
<i>L. chiapasensis</i>	5.0 ^c	7.0	>10.0	<6.0	10.0	13.0
<i>L. graveolens</i>	□1.25 ^c	8.0	<1.25 ^c	7.0	<1.25 ^c	9.0
<i>O. micranthum</i>	<1.25 ^c	7.0	>10.0	<6.0	<1.25 ^c	7.0
<i>P. dioica</i>	<1.25 ^c	7.0	>10.0	<6.0	<1.25 ^c	8.0
<i>P. auritum</i>	10.0	15.0	>10.0	<6.0	10.0	15.0
<i>P. Jacquemontianum</i>	>10.0	<6.0	>10.0	<6.0	10.0	12.0
<i>P. guajava</i>	>10.0	<6.0	>10.0	<6.0	10.0	9.0
<i>T. lucida</i>	10.0	13.0	>10.0	<6.0	>10.0	<6.0
Eritromicina (0.60 μg)	-----	23.0	-----	25.0	-----	26.0
Metanol (control negativo)	-----	<6.0	-----	<6.0	-----	<6.0

^aCepas = A: *C. jejuni* ATCC® 33291; B: *C. jejuni* UVG 62-1773-6; C: *C. coli* UVG 62-1769-9

^bDiámetro de halos de inhibición en mm

^cActividad inhibitoria significativa (p=0.0312)