



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Maestría Nutrición Humana

EFFECTOS ANTIMICROBIANO Y ANTIESPASMÓDICO DEL ACEITE ESENCIAL Y SUS  
COMPONENTES MAYORITARIOS PRESENTES EN LAS HOJAS DE GUAYABA (*Psidium  
guajava* L.)

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestra en Nutrición Humana

Presenta:

Laura Elena Cano Romero

Dirigido por:

Dra. Juana Isela Rojas Molina

SINODALES

Dra. Juana Isela Rojas Molina  
Presidente

  
Firma

Dra. María Alejandra Rojas Molina  
Secretario

Alejandra Rojas M.  
Firma

Dr. César Ibarra Alvarado  
Vocal

  
Firma

Dra. Ma. Concepción Méndez Gómez Humarán  
Suplente

McMéndez  
Firma

Dra. Dulce María Rivera Pastrana  
Suplente

  
Firma

  
Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca  
Directora de la Facultad de Ciencias Naturales

  
Dr. Jaime Torres Pacheco  
Director de Investigación y Posgrado

## RESUMEN

La guayaba (*Psidium guajava* L.) se encuentra dentro de las diez plantas más empleadas en la Medicina Tradicional Mexicana para el tratamiento de los denominados desórdenes gastrointestinales asociados con la diarrea y la disentería. Los extractos y metabolitos detectados en las hojas y frutos de esta planta poseen una actividad farmacológica; sin embargo, los estudios relacionados con la actividad biológica de los aceites esenciales presentes en esta especie vegetal son muy limitados. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar el efecto del aceite esencial (AE) y sus componentes mayoritarios (cineol, (R) – limoneno, (S) – limoneno y  $\beta$ -cariofileno) presentes en las hojas de la especie vegetal *Psidium guajava* L. sobre las contracciones espontáneas de íleo aislado de cobayo y su actividad antimicrobiana en bacterias patógenas que afectan el tracto gastrointestinal. El efecto antimicrobiano del AE de *P. guajava* L. y de sus componentes mayoritarios se determinó por el método de microdilución con el indicador azul alamar en cepas de *Salmonella typhi* (ATCC 6539), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25932), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) y *Listeria monocytogenes* (ATCC 244). El efecto farmacológico se evaluó empleando el ensayo de íleo aislado de cobayo. No se detectó un efecto antimicrobiano del AE y de sus componentes mayoritarios en las cepas de *S. typhi* (ATCC 6539), *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25932) y *P. aeruginosa* (ATCC 9027). No obstante, el AE y el  $\beta$ -cariofileno inhibieron el desarrollo de *L. monocytogenes* (ATCC 244) a una concentración mínima inhibitoria de 50  $\mu\text{g/ml}$  y de 3.13  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Los resultados de las evaluaciones farmacológicas mostraron que el AE, el S-limoneno, el R-limoneno y el cineol inducen un efecto contráctil sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo de manera dosis-dependiente, en donde la concentración efectiva media ( $\text{CE}_{50}$ ) para cada uno de ellos fue de 87.76  $\mu\text{g/ml}$ , 455.2  $\mu\text{g/ml}$ , 38.3  $\mu\text{g/ml}$  y 76.3  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Por otra parte, el AE y el cineol disminuyeron el tono muscular y la amplitud en las contracciones espontáneas de íleon aislado de cobayo antes de observarse el efecto contráctil, en tanto que el S-limoneno redujo ambos parámetros después de que se presentó este efecto. El  $\beta$ -cariofileno indujo un efecto inhibitorio sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo dependiente de la concentración con una concentración inhibitoria media ( $\text{CI}_{50}$ ) de 1365  $\mu\text{g/ml}$  y un efecto máximo ( $\text{E}_{\text{max}}$ ) de 81.6 %. Las evaluaciones de la actividad antimicrobiana y farmacológica del aceite esencial y de sus componentes mayoritarios obtenidos a partir de las hojas de *P. guajava* que se muestran en este trabajo, contribuyen a validar el empleo etnomédico de esta especie vegetal para el tratamiento de los denominados desórdenes gastrointestinales.

**Palabras clave:** *Psidium guajava* L., aceite esencial, antiespasmódico, antimicrobiano, íleo

## ABSTRACT

Guava (*Psidium guajava* L) is within the ten plants used in Mexican Traditional Medicine for the treatment of gastrointestinal disorders associated with diarrhea and dysentery. Extracts and metabolites detected in leaves and fruits of *P. guajava* show pharmacological activity. Nevertheless, studies related to the biological activity of essential oils contained in this plant species are limited. The aim of this work was to evaluate the effect of essential oil (EO) and its major components (cineole, (R) - limonene, (S) - limonene and  $\beta$ -caryophyllene) elicited from leaves of *P. guajava* L against several bacteria associated with infectious diseases and on spontaneous contractions of isolated guinea pig ileum. The antibacterial effect of samples was tested against *Salmonella typhi* (ATCC 6539), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25932), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) and *Listeria monocytogenes* (ATCC 244) by microdilution alamar blue assay. The pharmacological effect was evaluated by isolated guinea pig ileum assay. Results of antibacterial assay showed that *S. typhi* (ATCC 6539), *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25932) and *P. aeruginosa* (ATCC 9027) were resistant to EO and its major components. On the contrary, EO and  $\beta$ -caryophyllene inhibited the growth of *L. monocytogenes* (ATCC 244) with a minimum inhibitory concentration of 50  $\mu\text{g} / \text{ml}$  and 3.13  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , respectively. The pharmacological results show that the EO, S-limonene, R-limonene and cineole stimulate spontaneous contractions of isolated guinea pig ileum in a dose-dependent manner. Median effective concentration ( $\text{EC}_{50}$ ) for EO, S-limonene, R-limonene and cineol was 87.76  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 455.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 38.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 76.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively. On the other hand, the EO and cineole decreased muscle tone and amplitude of spontaneous contractions in isolated guinea pig ileum before the contractile effect, whereas, S-limonene reduced both parameters after contractile effect. The  $\beta$ -caryophyllene induced an inhibitory effect on the spontaneous contractions of isolated guinea pig ileum in a dose-dependent way. Median inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) of  $\beta$ -caryophyllene was 1365  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and maximal effect ( $\text{E}_{\text{max}}$ ) was 81.6%. Biological activity of the essential oil and its major components from leaves of *P. guajava* shown in this work, contribute to validate the ethnomedical use of this plant for the treatment of gastrointestinal disorders.

**Key words:** *Psidium guajava* L., essential oil, antispasmodic, antimicrobial, ileum

## Dedicatoria

A mis padres†. Gracias por la vida y para que haya valido la pena el precio que la pagaron voy a construir algo lindo con ella.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a la Dra. Juana Isela Rojas Molina por el asesoramiento y toda la contribución hecha a este trabajo.

También agradezco a los doctores: Alejandra Rojas Molina, César Ibarra Alvarado, Concepción Méndez Gómez Humarán y Dulce María Rivera Pastrana por toda la ayuda brindada durante la realización de esta tesis.

A las doctoras Tere García Gasca y Aracely Anaya por su apoyo y amistad, muchas gracias por todo.

A las maestras Rosy y Alma y a los doctores Alejandro y Francisco del laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Química de la UAQ, por su gran aportación al presente.

A mis compañeros de la generación 2009-2011 de la Maestría en Nutrición Humana, en especial a Bego, Sandy, Lilo, Ofe, Juanita, Mau, Karem y Dian, gracias por tan bellos recuerdos.

A todos mis profesores de la Maestría, gracias.

A todas aquellas personas que laboran en la facultad de Ciencias Naturales de la UAQ, pues siempre me brindaron apoyo incondicional y una sonrisa.

A mi pareja Miguel Ángel Velázquez Herrera, gracias por hacer que yo quiera ser mejor cada día.

## ÍNDICE

	Página
Resumen	i
Abstract	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Índice de cuadros	viii
Índice de figuras	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Distribución geográfica de <i>Psidium guajava</i> L.	3
2.2 Empleo etnomédico de <i>Psidium guajava</i> L. en el mundo y en la Medicina Tradicional Mexicana	4
2.3 Estudios fitoquímicos realizados en las hojas de <i>Psidium guajava</i> L.	5
2.4 Actividad biológica de los compuestos identificados en las hojas de <i>Psidium guajava</i> L.	6
2.5 Aceites esenciales	7
2.5.1 Clasificación de los componentes del aceite esencial de la hoja de <i>Psidium guajava</i> L.	8
2.5.1.1 Terpenos	8
2.5.1.2 Componentes aromáticos	9
2.5.2 Efecto biológico de los aceites esenciales	9
2.5.3 Identificación y cuantificación de los componentes mayoritarios en el aceite esencial de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L.	10
2.6 Microorganismos involucrados en enfermedades gastrointestinales	11
a) <i>Escherichia coli</i>	13
b) <i>Salmonella typhi</i>	14
c) <i>Staphylococcus aureus</i>	15
d) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
e) <i>Listeria monocytogenes</i>	17
2.6.1 Mecanismo toxiinfeccioso de los agentes etiológicos de las enfermedades gastrointestinales	20
2.6.2 Mecanismos de acción de los antibióticos empleados para el tratamiento de las enfermedades toxiinfecciosas relacionadas con el tracto gastrointestinal	21

2.6.3 Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana de compuestos obtenidos a partir de fuentes naturales	21
2.6.3.1 Prueba de Difusión	21
2.6.3.2 Prueba de Dilución	22
2.6.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana por el método de azul alamar	22
2.7 Fundamentación teórica del modelo de íleon aislado de cobayo	24
2.7.1 Sistema Nervioso Entérico (SNE)	24
2.7.1.1 Definición y función del SNE	24
2.7.2 Principales canales iónicos que regulan la excitabilidad de las neuronas del SNE	25
2.7.2.1 Canales de sodio voltaje-dependientes	25
2.7.2.2 Canales de K <sup>+</sup> activados por calcio	26
2.7.2.3 Otros canales iónicos localizados en las neuronas del SNE: canales iónicos sensibles al ácido (acid-sensing ion channels; ASICs).	26
2.7.3 Neurotransmisores y neuromoduladores presentes en el SNE y sus respectivos receptores	26
2.7.3.1 Acetilcolina (Ach)	27
2.7.3.2 Trifosfato de Adenosina (ATP)	28
2.7.3.3 Serotonina (5-hidroxi-triptamina)	28
2.7.3.4 Histamina	29
2.7.3.5 Oxido Nítrico	29
2.7.3.6 Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA)	30
2.7.3.7 Ácido glutámico	30
2.7.3.8 Dopamina	30
2.7.3.9 Noradrenalina (NA)	30
2.7.3.10 Somatostatina	31
2.7.3.11 Polipéptido vasoactivo intestinal (VIP)	31
2.7.3.12 Neuropeptido Y	31
2.7.4 Receptores a otros mensajeros químicos recientemente localizados en el SNE	31
2.7.4.1 Receptores al factor liberador de corticotropina	31
2.7.4.2 Receptores a cannabinoides	32
2.7.4.3 Receptores a prostaglandinas	32
2.8 Contracción espontánea del músculo liso intestinal	32
2.9 Modelo de íleon aislado de cobayo	33
III. JUSTIFICACIÓN	34
IV. HIPÓTESIS	36

V.	OBJETIVOS	36
	5.1 Objetivo General	36
	5.2 Objetivos Específicos	36
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	37
	6.1 Descripción del material biológico	37
	6.1.1 Material vegetal	37
	6.1.2 Animales de experimentación	37
	6.1.3 Material biológico	37
	6.2 Análisis de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. y de sus componentes mayoritarios	38
	6.2.1 Preparación de la suspensión bacteriana de trabajo	38
	6.2.2 Preparación de las soluciones “stock” del aceite esencial de hoja de <i>Psidium guajava</i> L. y de sus componentes mayoritarios	38
	6.2.3 Preparación de la placa	38
	6.2.4 Interpretación de resultados	40
	6.2.4.1 Lectura visual	40
	6.2.4.2 Lectura fluorométrica	40
	6.3 Evaluación farmacológica del aceite esencial de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. y de sus componentes mayoritarios	41
	6.4 Análisis Estadístico	42
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
	7.1 Actividad antimicrobiana del aceite esencial de la hoja de <i>Psidium guajava</i> L. y de sus componentes mayoritarios	43
	7.2 Evaluación farmacológica del aceite esencial de la hoja de <i>Psidium guajava</i> L. y de sus componentes mayoritarios con El ensayo de íleo aislado de cobayo	51
	7.2.1 Evaluación farmacológica del aceite esencial de la hoja de <i>Psidium guajava</i> L.	51
	7.2.2 Evaluación farmacológica de los componentes mayoritarios del aceite esencial de la hoja de guayaba <i>Psidium guajava</i> L.	55
VIII.	CONCLUSIONES	66
IX.	REFERENCIAS	68
X.	ANEXOS	81

Anexo I: Estructuras químicas de componentes selectivos de aceites esenciales	81
Estructuras químicas de componentes selectivos de aceites esenciales (continuación)	82

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
2.1	Metabolitos secundarios identificados en las hojas de <i>Psidium guajava</i> L.	6
2.2	Componentes mayoritarios identificados en el aceite esencial de la hoja de <i>Psidium guajava</i> L.	11
2.3	Infecciones bacterianas que producen enfermedades diarreicas.	12
2.4	Principales neurotransmisores del SNE y sus receptores.	27
6.1	Condiciones de incubación de la placa para el ensayo de la actividad antimicrobiana por el método de azul alamar.	40
7.1	Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de guayaba y sus componentes mayoritarios sobre las cepas de prueba.	44
7.2	Valores de la concentración efectiva media (CE <sub>50</sub> ) y del efecto máximo (Emax) contráctil inducido por el R-limoneno, S-limoneno y cineol identificados en el aceite esencial de las hojas de <i>P. guajava</i> L.	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>2.1</b>	Fruto y hoja de <i>Psidium guajava</i> L.	<b>3</b>
<b>2.2</b>	Reducción de resazurina a resorufina por el método de azul alamar.	<b>23</b>
<b>2.3</b>	Sistema Nervioso Entérico: Neuronas aferentes, Interneuronas, Neuronas motoras (excitadoras e inhibitoras).	<b>25</b>
<b>7.1</b>	Actividad antimicrobiana en placa del aceite esencial de guayaba y sus componentes mayoritarios contra <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 244. (1) aceite esencial de <i>Psidium guajava</i> L, (2) S - limoneno, (3) R – limoneno, (4) $\beta$ – cariofileno, (5) cineol.	<b>45</b>
<b>7.2</b>	Actividad antimicrobiana en placa del aceite esencial de guayaba y sus componentes mayoritarios contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922. (1) aceite esencial de <i>Psidium guajava</i> L, (2) S - limoneno, (3) R – limoneno, (4) $\beta$ – cariofileno, (5) cineol.	<b>47</b>
<b>7.3</b>	Curva concentración-respuesta del efecto contráctil inducido por el aceite esencial de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L.	<b>52</b>
<b>7.4</b>	Registro representativo del efecto contráctil inducido por el aceite esencial de la hoja de <i>Psidium guajava</i> L. sobre las contracciones espontáneas de íleo aislado de cobayo a una concentración de 316 $\mu\text{g/ml}$ .	<b>53</b>
<b>7.5</b>	Curvas concentración-respuesta del efecto contráctil sobre el íleon aislado de cobayo del R-limoneno, S-limoneno y cineol identificados en el aceite esencial de la hoja de guayaba <i>Psidium guajava</i> L.	<b>56</b>
<b>7.6</b>	Registros representativos del efecto contráctil inducido por el cineol sobre las contracciones espontáneas de íleo de cobayo. A) 316 $\mu\text{g/ml}$ , B) 1,000 $\mu\text{g/ml}$ y C) 10, 000 $\mu\text{g/ml}$ .	<b>58</b>
<b>7.7</b>	Registros representativos del efecto contráctil inducido por el S-limoneno sobre las contracciones espontáneas	

	de íleo de cobayo. A) 3.16 µg/ml y B) 10,000 µg/ml.	<b>60</b>
<b>7.8</b>	Registros representativos del efecto contráctil inducido por el R-limoneno sobre las contracciones espontáneas de íleo de cobayo. A) 300 µg/ml y B) 1,000 µg/ml.	<b>61</b>
<b>7.9</b>	Efecto contráctil-inhibitorio inducido por R-limoneno sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo.	<b>62</b>
<b>7.10</b>	Curva concentración-respuesta del efecto inhibitorio sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo inducidas por el β-cariofileno identificado en el aceite esencial de la hoja de guayaba <i>Psidium guajava</i> L.	<b>63</b>
<b>7.11</b>	Registros representativos del efecto inhibitorio inducido por el β-cariofileno sobre las contracciones espontáneas de íleo de cobayo. A) 100 µg/ml, B) 1,000 µg/ml y C) 10,000 µg/ml.	<b>64</b>

## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades gastrointestinales son todos aquellos padecimientos que afectan al sistema digestivo y son ocasionadas por varios factores que pueden ser orgánicos y psicológicos. Los primeros son debido a bacterias, virus y parásitos que penetran al organismo a través de alimentos y agua contaminados principalmente con materia fecal (Garrido *et al.*, 1990).

Los síntomas que se presentan en las enfermedades gastrointestinales son: fiebre, dolor estomacal o abdominal (cólicos), náuseas, vómito, diarrea, constipación o estreñimiento (Wilson, 2005). El tratamiento incluye el uso de antibióticos y medicamentos anti diarreicos (espasmolíticos) (Alam y Ashraf, 2003).

Se ha calculado que cada año mueren 1,8 millones de personas como consecuencia de enfermedades diarreicas (OMS, 2007).

Según la ENSANUT 2012, la prevalencia de enfermedades diarreicas agudas en niños menores de 5 años en las dos semanas anteriores de aplicación de la encuesta fue de 11 %, siendo mayor el porcentaje en el área rural (12.3 %) que en área urbana (10.5 %).

En la actualidad se le otorga un reconocimiento a los fármacos procedentes de fuentes naturales y en especial a la fitoterapia. Lo anterior está justificado en muchos casos por razones económicas, de residualidad, o bien, para disminuir los efectos tóxicos crónicos muy frecuentes en sustancias químicas puras, con una tendencia en los países desarrollados al retorno del empleo de productos naturales en el tratamiento de diversas afecciones (Morin *et al.*, 1983). Por esta razón, se destaca el importante papel de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en cuanto a utilizar la fitoterapia dentro de los programas de salud de los distintos países, a través de la validación de los efectos etnobotánicos, adjudicados a las plantas empleadas en la Medicina Tradicional (Akerle, 1987).

De acuerdo con la definición de la OMS (2002) una planta medicinal es: “toda especie vegetal en la que el todo, o una parte de la misma, está dotada de actividad farmacológica”.

En la actualidad a muchas plantas se les ha atribuido propiedades terapéuticas no justificadas por sus principios activos constituyentes. Por lo que es evidente la falta de estudios pre-clínicos, clínicos y de seguridad que certifiquen su validez (Akerlele, 1987).

La especie vegetal *Psidium guajava* L. es considerada nativa de México y se encuentra dentro de las diez plantas medicinales más utilizadas en nuestro país (Ríos *et al.*, 1977; Martínez y Beltrán, 1999). Esta planta se desarrolla en todas las áreas tropicales y subtropicales del mundo, adaptándose a diferentes condiciones climáticas (Stone, 1970). La decocción de las hojas de *P. guajava* es utilizada en la Medicina Tradicional para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales por sus propiedades anti diarreicas, para el tratamiento de gastroenteritis, disentería, cólicos estomacales y como antimicrobiano para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas del intestino (Abreu *et al.*, 2006; Dakappa *et al.*, 2013).

Los estudios reportados con respecto a las propiedades medicinales de *P. guajava* señalan que los extractos acuoso, metanólico y etanólico de las hojas tienen propiedades antiespasmódicas e inhiben el crecimiento de bacterias asociadas con enfermedades gastrointestinales en humanos (Smith y Nigel., 1992).

Actualmente, los estudios para determinar el efecto biológico del aceite esencial y de sus componentes mayoritarios extraídos a partir de las hojas de *P. guajava* son limitados.

Con base en lo anterior, este proyecto de investigación tiene por objeto evaluar la actividad farmacológica y antimicrobiana del aceite esencial y de sus componentes aromáticos volátiles mayoritarios obtenidos a partir de la hoja de *P. guajava*, a fin de validar su empleo etnomédico para el tratamiento de los denominados desórdenes gastrointestinales. Los resultados derivados de este trabajo contribuyen a valorar y considerar uno de los recursos naturales de nuestro país, a través de la acreditación científica de su potencial nutraceútico para la prevención y el tratamiento de enfermedades asociadas con el tracto gastrointestinal.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Distribución geográfica de *Psidium guajava* L.

La guayaba (*Psidium guajava* L.) es un árbol considerado nativo de México (Ríos *et al.*, 1977). Este fruto se extiende a través de América del Sur, Europa, África y Asia, principalmente en las áreas tropicales y subtropicales del mundo adaptándose a diferentes condiciones climáticas; sin embargo, prefiere climas secos (Stone, 1970).

*Psidium guajava* L. es un árbol pequeño con una altura máxima de 10 m y de corteza delgada, suave e irregular. Las hojas son opuestas, con peciolo corto, ovales con venas prominentes de 5-15 cm de largo. Las flores son llamativas con pétalos blanquecinos de más de 2 cm de largo y con muchos estambres. Los frutos son carnosos, amarillos, globosos a ovoides miden cerca de 5 cm de diámetro con un mesocarpio rojo comestible que contiene muchas semillas pequeñas duras y blancas (Figura 2.1) (Stone, 1970).



**Figura 2.1:** Fruto y hoja de *Psidium guajava* L.

## **2.2 Empleo etnomédico de *Psidium guajava* L. en el mundo y en la Medicina Tradicional Mexicana**

Los estudios etnofarmacológicos recientes demuestran que la especie vegetal *Psidium guajava* L. es utilizada en muchas partes del mundo para el tratamiento de un gran número de enfermedades, por ejemplo, para controlar la diabetes, la hipertensión, las caries, usado como antiséptico, analgésico, anti-inflamatorio y para reducir la fiebre. Las regiones del mundo con una larga historia en cuanto al uso medicinal tradicional de la guayaba están los países de América Central incluyendo a México, así como países del Caribe, África y Asia. Otros usos reportados incluyen el tratamiento de gastroenteritis, disentería, dolores estomacales, antibacteriano para inhibir el crecimiento de patógenos intestinales, cólicos, etc. (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2008).

El empleo medicinal de la *Psidium guajava* L. ha sido reportado en el compendio de la medicina indígena de América con mayor frecuencia comparado con el de otras regiones. *Psidium guajava* L. constituye un elemento importante en la Medicina Tradicional Mexicana y su principal uso conocido es como anti diarreico (Lara y Márquez, 1996).

Las hojas de la guayaba se utilizan en infusiones para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales como el vómito, la diarrea, para inhibir el reflujo peristáltico, la gastroenteritis, para disminuir los cólicos (actividad anti espasmódica), la disentería, la distensión abdominal, flatulencia y daño gástrico (Abreu *et al.*, 2006).

Los extractos acuosos de la hoja de *Psidium guajava* L. han demostrado ser efectivos contra un número muy diverso de microorganismos como por ejemplo: *Aeromonas hydrophila*, *Shigella* spp., *Vibrio* spp. *Staphylococcus aureus*,  $\beta$ -*streptococcus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* (Abreu *et al.*, 2006). De la misma manera, se ha reportado que los extractos metanólicos de hoja de *Psidium guajava* L. muestran una actividad anti-rotavirus (Gonçalves *et al.*, 2008).

Estudios previos han demostrado los efectos inhibitorios de los extractos acuosos, etanólicos y aceite esencial de la raíz y las hojas de *Psidium guajava* L. sobre el crecimiento de bacterias resistentes a antibióticos de amplio espectro como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.*, *Shigella spp.* y *Escherichia coli*. Estas bacterias son los principales agentes etiológicos de infecciones intestinales en humanos (Chah *et al.*, 2006; Nisha *et al.*, 2011).

### **2.3 Estudios fitoquímicos realizados en las hojas de *Psidium guajava* L.**

Los compuestos identificados en las hojas y frutos de *Psidium guajava* incluyen: flavonoides, flavonoles, carotenoides, triterpenos, componentes del aceite esencial entre otros. Se ha reportado que los compuestos polifenólicos son los principales compuestos responsables del efecto terapéutico atribuido a esta especie vegetal (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2008), el extracto de hoja de *Psidium guajava* contiene flavonoides, principalmente derivados de la quercetina, los cuales son hidrolizados en el cuerpo para dar quercetina aglicada, compuesto responsable de la actividad espasmolítica de las hojas (Lozoya *et al.*, 1994).

Otros autores señalan que se han identificado más de 20 compuestos en las hojas de *Psidium guajava* L., entre los que se pueden mencionar el  $\beta$ -selineno, el  $\beta$ -cariofileno, el óxido de cariofileno, el escualeno, la selina-11-en-4 $\alpha$ -ol, la guaijavarina, la isoquercetina, la hiperina, la quercitrina y la quercetina-3-O-gentobiosido, morin-3-O- $\alpha$ -L-lixopiranósido, morin-3-O- $\alpha$ -L-arabopiranósido, ácido  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glucopiranósido, uvaol, ácido oleanólico y ácido ursólico (Belemtougri *et al.*, 2006).

En el Cuadro 2.1 se muestra la clasificación química de los metabolitos secundarios aislados a partir de hojas frescas de *Psidium guajava* L.

**Cuadro 2.1:** Metabolitos secundarios identificados en las hojas de *Psidium guajava* L.

Clasificación	Compuesto	Referencia
Compuestos del aceite esencial	$\alpha$ -pineno, $\beta$ -pineno, limoneno, mentol, terpenil acetato, isopropil alcohol, longiciclono, cariofileno, $\beta$ -bisaboleno, cineol, óxido de cariofileno, $\beta$ -copaneno, farneseno, humuleno, selineno, cardineno, curcumeno	Zakaria y Mohd, 1994; Li <i>et al.</i> , 1999.
Ácidos orgánicos	Ácidos nerolidiol, ursólico, cratególico, y guayavólico  Ácidos guavanoico, guavacumárico, 2 $\alpha$ -hidroxiursólico, jacumárico, isonericumárico y asiático	Iwu, 1993  Begum <i>et al.</i> , 2002
Esteroles	Ilelatifol D y $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosido	Begum <i>et al.</i> , 2002
Flavonoides	Avicularina y su 3-I-4-piranosido  mircetina, quercetina, luteolina y kaempferol	Oliver-Bever, 1986  Vargas <i>et al.</i> , 2006

#### 2.4 Actividad biológica de los compuestos identificados en las hojas de *Psidium guajava* L.

Desde los cuarentas se han realizado investigaciones sobre la actividad biológica de hojas, corteza y fruto de la guayaba y se ha encontrado que presentan actividad antimicrobiana y anti diarreica. Así mismo, se ha reportado que estas mismas partes de *P. guajava* se pueden utilizar en el tratamiento de acné, tos, disminuyen la placa dental, tienen efecto anti malaria, hepatoprotector, antioxidante, antigenotóxico, antimutagénico, antialérgico, antitumoral. También, reducen la presión arterial, los niveles de glucosa sanguíneos, el dolor, son agentes anti inflamatorios y analgésicos (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2008).

## 2.5 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son compuestos naturales complejos, volátiles caracterizados por un fuerte olor y son sintetizados por plantas aromáticas como metabolitos secundarios. Estos compuestos se obtienen generalmente por hidrodestilación o destilación de vapor, este proceso fue llevado a cabo por primera vez en la Edad Media por los árabes. Los aceites esenciales son conocidos por sus propiedades antisépticas y medicinales, como, bactericidas, virucidas, fungicidas y como fragancia. También son usados para la preservación de alimentos y como remedio antimicrobiano, analgésico, sedante, antiinflamatorio, espasmolítico y anestésico local (Angioni *et al.*, 2006).

En la naturaleza, los aceites esenciales juegan un importante papel en la protección de las plantas como insecticidas antibacterianos, antivirales y antifúngicos y también contra la herbivoría reduciendo el apetito de sus depredadores. Por el contrario, los aceites esenciales también pueden atraer algunos insectos para favorecer la dispersión del polen y semillas, o bien, son repelentes de insectos indeseables (Silva *et al.*, 2003).

Los aceites esenciales son extraídos de varias plantas aromáticas, éstas generalmente se encuentran en países de temperatura cálida como el Mediterráneo y países tropicales, donde representan una parte importante de la farmacopea tradicional. Estos compuestos son líquidos, volátiles, cristalinos y raramente coloreados, de naturaleza hidrofóbica y solubles en solventes orgánicos con una densidad menor a la del agua. Pueden ser sintetizados por todos los órganos de plantas por ejemplo: raíz, flores, hojas, tallos, ramas, semillas, frutos y corteza. Los aceites esenciales son almacenados en células secretoras, cavidades, canales, células epidérmicas o tricomas glandulares (Masotti *et al.*, 2003).

## **2.5.1 Clasificación de los componentes del aceite esencial de la hoja de *Psidium guajava* L.**

Los aceites esenciales son mezclas naturales complejas las cuales pueden contener cerca de 20 a 60 componentes en diferentes concentraciones. Estas mezclas se caracterizan por presentar dos o tres componentes mayoritarios en altas concentraciones equitativas (desde un 20 hasta un 70 %), comparadas con otros componentes presentes en cantidades traza. Los componentes mayoritarios determinan las propiedades biológicas de los aceites esenciales e incluyen dos grupos de distinto origen biosintético. El principal grupo químico lo constituyen los terpenos y terpenoides, en tanto que el resto de los constituyentes son compuestos aromáticos y alifáticos todos ellos se caracterizan por presentar un peso molecular bajo. En el anexo I se muestran las estructuras químicas de compuestos selectivos de los aceites esenciales (Croteau *et al.*, 2000; Betts, 2001; Bowles, 2003; Pichersky *et al.*, 2006).

### **2.5.1.1. Terpenos**

Los terpenos están conformados por la combinación de varias unidades de isopreno, el cual a su vez, está constituido por 5 átomos de carbono. La biosíntesis de los terpenos tiene como precursor al isopentenildifosfato (IPP). La adición repetitiva de IPP tiene como resultado la formación del prenildifosfato, el cual a su vez, es precursor de varios tipos de terpenos. La modificación del prenildifosfato alílico por sintetasas de terpenos específicas forman el esqueleto del terpeno y finalmente, la modificación enzimática secundaria (por reacción redox) del esqueleto, le confiere las propiedades funcionales a los diferentes terpenos. Los terpenos principales son los monoterpenos (C10) y sesquiterpenos (C15), pero también existen los hemiterpenos (C5), diterpenos (C20), triterpenos (C30) y tetraterpenos (C40). Un terpeno que contiene oxígeno se llama terpenoide (Bakkali *et al.*, 2008).

Los monoterpenos (C10) se forman por la asociación de dos unidades de isopreno. Estos compuestos constituyen el 90 % de los aceites esenciales y por lo tanto son sus moléculas representativas.

Los sesquiterpenos (C15) están formados por la unión de tres unidades de isopreno. La extensión de la cadena incrementa el número de ciclaciones, lo cual permite una gran variedad de estructuras (Bakkali *et al.*, 2008).

### **2.5.1.2. Componentes aromáticos**

Son derivados de fenilpropano, los compuestos aromáticos están presentes en menor cantidad que los terpenos. Las rutas biosintéticas conciernen terpenos y derivados fenilpropánicos, generalmente están separados en plantas pero pueden coexistir en algunas, que tengan mayor concentración tomando la función (ej, aceite de canela (*Cinamomum verum*) que tiene cinnamaldehído como componente mayor y eugenol como componente menor).

Los compuestos aromáticos comprenden:

- Aldehídos: cinnamaldehído
- Alcoholes: alcohol cinnámico
- Fenoles: cavicol, eugenol
- Derivados metoxi: anetol, elemicin, estragol, metileugenoles
- Componentes dioxi metilenos: apiol, miristicina, safrol (Bakkali *et al.*, 2008).

### **2.5.2 Efecto biológico de los aceites esenciales**

Los aceites esenciales causan citotoxicidad por daño a la membrana de las bacterias, fototoxicidad, mutagenicidad nuclear, mutagenicidad citoplásmica, carcinogenicidad, propiedades antimutagénicas (Bakkali *et al.*, 2008).

Por el gran número de componentes que tienen los aceites esenciales, parecen no tener lugar de acción citotóxica en la célula (Carson *et al.*, 2002). Como típicos lipófilos, ellos pasan a través de la pared celular y la membrana citoplásmica, interrumpen la estructura de sus diferentes capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos y las permeabilizan. En las bacterias, la permeabilización de las membranas está asociada con la pérdida de iones, la reducción del potencial de membrana, el colapso de la bomba de protones y la depleción en las reservas de trifosfato de adenosina (ATP) (Knobloch *et al.*, 1989, Sikkema *et al.*, 1994, Helander *et al.*, 1998, Ultee *et al.*, 2000, Ultee *et al.*, 2002, Di Pasqua *et al.*, 2006 y Turina *et al.*, 2006).

### **2.5.3 Identificación y cuantificación de los componentes mayoritarios en el aceite esencial de las hojas de *Psidium guajava* L.**

En el 2009, en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, se obtuvo el aceite esencial de la hoja de *Psidium guajava* L. a través del método de hidrodestilación. Así mismo, se llevó a cabo la identificación de sus componentes mayoritarios.

La identificación de los componentes presentes en el aceite esencial se realizó en primera instancia mediante un análisis por cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM).

El análisis del aceite esencial de la hoja de *Psidium guajava* L. indicó la presencia de 30 compuestos, 4 de estos representan el 30.78 % del total de componentes presentes en la esencia y son: el R-limoneno (14.87 %), el S-limoneno (7.14 %), el  $\beta$ -cariofileno (4.74 %) y eucaliptol o cineol (4.03 %). En el Cuadro 2.2 se muestran los componentes mayoritarios identificados en el aceite esencial de la especie vegetal objeto de estudio.

**Cuadro 2.2:** Componentes mayoritarios identificados en el aceite esencial de la hoja de *Psidium guajava* L.

<b>Nombre de compuesto</b>	<b>Área (%)</b>	<b>T.R. (s)</b>
R – limoneno	11.7169	114.916
S – limoneno	5.6270	131.916
$\beta$ – cariofileno	3.7345	204.616
1,8 – cineol (eucaliptol)	3.1753	116.416
$\alpha$ -pineno	2.7418	101.916
5,7-dimetil-(R)-1,6-octadieno	2.7463	124.116
Acetofenona	2.7463	124.416
Geranil vinil éter	2.0456	192.416
Copaeno	2.0456	192.716
3,7-dimetil-1,3,7-octatrieno	1.1212	117.316

## **2.6 Microorganismos involucrados en enfermedades gastrointestinales**

Los principales microorganismos que causan enfermedades transmitidas por alimentos asociadas con cuadros diarreicos se muestran en el Cuadro 2.3. Todos estos microorganismos son bacilos Gram (+) o Gram (-) cuyo vehículo principal son los alimentos y agua contaminados con materia fecal, su forma de reproducción es por fisión binaria.

**Cuadro 2.3:** Infecciones bacterianas que producen enfermedades diarreicas.

<b>Bacteria</b>	<b>Tipo</b>	<b>Ubicación anatómica</b>	<b>Afecciones</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Coco gram positivo	Humanos (nariz y piel)	Diarrea, vómito, náuseas, abscesos cutáneos y en otros órganos
<i>Clostridium perfringens</i>	Bacilo gram positivo	Suelo, animales, humanos (colon)	Enteritis necrótica, diarrea, tétanos, gangrena gaseosa, botulismo
<i>Listeria monocytogenes</i>	Bacilo gram positivo	Suelo, animales, plantas	Meningitis, bacteriemia en mujeres embarazadas, diarrea
<i>Escherichia coli</i>	Bacilo gram negativo	Humanos (colon, vagina y uretra exterior)	Meningitis, peritonitis, infección de vías urinarias, septicemia, neumonía, diarrea
<i>Salmonella typhi</i>	Bacilo gram negativo	Animales domésticos, aves de corral	Enterocolitis, fiebre tifoidea, diarrea, dolor abdominal, vómito y náuseas
<i>Shigella dysenteriae</i>	Bacilo gram negativo	Humanos	Disentería, enterocolitis, diarrea, fiebre, náusea, vómitos, convulsiones
<i>Vibrio cholerae</i>	Bacilo gram negativo	Humanos	Cólera, diarrea y vómito
<i>Campylobacter jejuni</i>	Bacilo gram negativo	Animales domésticos	Enterocolitis, diarrea, vómito, dolor abdominal, dolor de cabeza y malestar general
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Bacilo gram negativo	Animales domésticos	Fiebre, dolor abdominal y diarrea en niños

Fuente: (Adaptado de Levinson, 2004).

A continuación se describen las características de los agentes etiológicos asociados con cuadros diarreicos.

**a) *Escherichia coli***

Es la especie predominante en el intestino grueso, la cual, puede generar un proceso patológico, estos microorganismos constituyen la causa más frecuente de septicemia, en alrededor de un 60 %, dando como causa más frecuente infecciones urinarias, que generalmente se limitan a infectar a la vejiga, infecciones gastrointestinales (gastroenteritis) y desde hace más de 50 años se sabe que ciertos tipos de *E. coli* pueden producir diarrea aguda en el hombre, y especialmente en los niños de corta edad (Cravioto *et al.*, 1996).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que el 70 % de las muertes de niños menores de 5 años en los países en vías de desarrollo, es originado por 5 enfermedades comunes, prevenibles o de fácil manejo y entre ellas está la diarrea, hallándose que la *E. coli* enteropatógena fue la bacteria más aislada en la diarrea infantil en niños menores de 2 años.

La vía de infección principal de *E. coli* es la ingestión de alimentos contaminados con materia fecal.

La mayoría de las cepas de *E. coli* son sensibles a las sulfamidas, a la ampicilina, a las cefalosporinas, a las tetraciclinas y a la carbanicilina. Pero se han observado casos de resistencia frente a alguno de estos agentes.

*E. coli* fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore Von Escherich, bacteriólogo alemán, quien la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor. Taxonómicamente es de la familia Enterobacteriaceae, y esta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo. Además, produce vitaminas B y K. Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram, es anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa (Cravioto *et al.*, 1996).

## **b) *Salmonella tify***

En el hombre se presentan tres formas clínicamente diferentes de la salmonelosis: fiebre entérica, septicemia y gastroenteritis aguda. Al prototipo de la fiebre entérica se le denomina fiebre tifoidea, la cual es causada por *Salmonella tify* (Schneider *et al.*, 2003).

La enfermedad empieza generalmente de manera insidiosa, tras un periodo de incubación de 7 a 14 días, con malestar, anorexia y cefalea, seguidas de fiebre. Los microorganismos ingeridos se multiplican en el tubo gastrointestinal y algunos penetran en los vasos linfáticos intestinales, desde los cuales se diseminan por todo el cuerpo a través de la corriente sanguínea y son excretados por la orina. La bilis es un buen medio de cultivo para *S. tify*, por lo que se produce un crecimiento exuberante en las vías biliares que proporcionan un flujo continuo de microorganismos hacia el intestino delgado. La fiebre aumenta a menudo de una manera brusca y va acompañada de bradicardia relativa.

El índice de casos multirresistentes a medicamentos abarca aproximadamente un 50 % de la población mundial (World Health Organization, 2001). Por lo cual se considera un patógeno altamente infeccioso.

Se transmite por contacto directo o contaminación cruzada durante la manipulación, en el procesamiento de alimentos en el hogar.

En la actualidad, para el tratamiento se dispone de varios antimicrobianos útiles para las infecciones por *Salmonella*, dentro de los cuales están cloramfenicol, ampicilina, amoxicilina, sulfametoxazol, trimetoprima, cefalosporinas de tercera generación, como cefotaxima, cefoperazona y las fluoroquinolonas, como la ciprofloxacina y la ofloxacina.

*S. tify* es una bacteria que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, formado por bacilos gram-negativos de rápido crecimiento, anaerobios facultativos, con flagelos peritricos y que no desarrollan cápsula ni esporas. Son bacterias móviles que producen sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S). Fermentan glucosa por poseer una enzima especializada, pero no lactosa, y no producen ureasa (Schneider *et al.*, 2003).

### **c) *Staphylococcus aureus***

Son microorganismos ubicuos difíciles de eliminar que colonizan ambientes muy dispares formando parte de la microbiota habitual de la piel, garganta y las fosas nasales de sus hospederos vertebrados. Posee numerosos factores de virulencia, en su mayoría componentes de la pared celular y una variedad de exoproteínas que facilitan la colonización de nuevos hábitats. Estas propiedades, hacen que los estafilococos sean la causa de numerosas infecciones en mamíferos, que van desde afecciones superficiales de la piel a patologías severas como neumonía, meningitis, intoxicaciones alimentarias, shock séptico, desórdenes autoinmunes y es de gran preocupación el hecho de que *S. aureus* sea un importante agente de infecciones nosocomiales fulminantes (Rey, 2007).

Controlar las infecciones por *S. aureus* no es tarea fácil debido a su patogénesis multifactorial y a la constante aparición de cepas resistentes a los antibióticos, en particular a meticilina y vancomicina, que son los fármacos de elección. Las infecciones por *S. aureus* son un grave problema clínico debido a la multi-resistencia que presenta esta especie, aproximadamente el 90 % de las cepas aisladas de ambiente hospitalario son resistentes a la penicilina G y solo del 20 al 30 % de las cepas aisladas de pacientes ambulatorios son sensibles a la penicilina G, entre el 10 y el 40 % de las cepas son resistentes a las penicilinas semi-sintéticas como la meticilina, naftacilina, oxacilina y dicloxacilina. Entre el 5% y el 20 % son resistentes a clindamicina, eritromicina y lincomicina.

Actualmente, la OMS declaró las infecciones causadas por *S. aureus*, como una enfermedad infecciosa emergente, por lo cual, es necesaria la búsqueda de nuevos agentes más potentes y no tóxicos agentes contra *S. aureus*.

*S. aureus*, taxonómicamente pertenece a la familia Staphylococcaceae, es un coco Gram positivo, tiene forma esférica que miden de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, se encuentra en forma de racimos, aerobio o anaerobio facultativo que produce fermentación láctica, es catalasa y coagulasa positivo (Rey, 2007).

#### **d) *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* tiene importancia para el hombre tanto porque representa problemas a la salud humana, como puede ser útil en el tratamiento de la contaminación ambiental. Se encuentra en bajas cantidades en nuestros alimentos y en algunos artículos de limpieza. De hecho se obtienen aislamientos de esta bacteria a partir de entre el 2% y 8 % de las heces de personas sanas, lo que nos muestra que nuestro contacto con esta bacteria es cotidiano y solo representa una amenaza para nuestra salud en condiciones especiales, como en centros hospitalarios especialmente, cuando se trata de pacientes de cáncer o con quemaduras.

Las enfermedades que puede causar son: Endocarditis, infecciones respiratorias, bacteriemia, meningitis y abscesos cerebrales, infección en el tracto urinario, otitis, infecciones oculares, infecciones de huesos y articulaciones, infecciones y trastornos de la piel y tejidos blandos, infecciones de la herida, pioderma y dermatitis. Una vez que se establece la infección, *P. aeruginosa* produce una serie de compuestos tóxicos que causan no solo daño tisular extenso, sino adicionalmente interfieren con el funcionamiento del sistema inmune (Rey, 2007).

Por lo general, nunca se debe tratar con un solo fármaco, ya que la bacteria desarrolla resistencia con rapidez, se deben usar penicilinas como ticarcilina, mezlociclina, piperacilina en combinación con aminoglicósidos como gentamicina,

tobramicina o amikacina. Otros fármacos usados son Aztreonam e Imipenem, las quinolonas como ciprofloxacina, cefalosporinas como ceftazidima y cefoperazona.

*P. aeruginosa* es una bacteria taxonómicamente de la familia de las Pseudomonadaceae, Gram (-) aerobia obligada excepto en presencia de nitrato, posee forma de bastón, se presenta en forma aislada, en pares o cadenas, no esporulado, móvil con flagelos monótricos polares, produce pigmentos fluorescentes difusibles como la pioverdina y el pigmento soluble como piocianina. Es nutricionalmente versátil, no requiere de factores de crecimiento orgánicos, crece en forma óptima a 37 °C y 42 °C, pero no a 4 °C, oxida a la glucosa y xilosa, pero no a la maltosa, es positivo para indofenol oxidasa y no produce H<sub>2</sub>S (Rey, 2007).

#### **e) *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* son bacilos Gram positivos cortos, regulares, no esporulados, ni ramificados, que suelen observarse en disposición individual o formando cadenas cortas. En cultivos viejos pueden aparecer formando filamentos de 6 a 20 mm de longitud. Presentan de 1 a 5 flagelos peritricos que les confieren movilidad a 28 °C. Su temperatura óptima de crecimiento es entre 30 a 37 °C, pero puede crecer a 4 °C en pocos días, es anaerobia facultativa, catalasa positiva y oxidasa negativa. Hidrolizan la esculina en pocas horas, pero no la urea ni la gelatina; no producen indol, ni H<sub>2</sub>S, producen ácido de la D-glucosa y de otros azúcares (Martínez *et al.*, 2003).

En la década de los 80's y 90's, la presencia de *Listeria* se reconoció como un problema de salud pública en los Estados Unidos, Canadá y algunos países de Europa (Curtis *et al.*, 2002).

La *L. monocytogenes* representa una nueva generación de patógenos resistentes transmitidos por alimentos. Esto se debe a que en comparación con otros

gérmenes, es relativamente más tolerante a la acidez, sal, calor, agentes oxidantes, alcohol y aditivos empleados en alimentos (Martínez, 2002).

Los principales problemas relacionados con la resistencia de *L. monocytogenes*, son fundamentalmente los relacionados a su capacidad de adaptarse y sobrevivir a condiciones ambientales desfavorables, a diferencia de otros microorganismos donde su principal problema es el desarrollo de resistencia a los diferentes antibióticos a los que son expuestos. Así, *L. monocytogenes* ha desarrollado la capacidad de crecer con un mínimo de nutrientes, en un amplio rango de temperatura, pudiendo crecer a temperaturas entre - 4.4 °C y 45 °C, aunque su temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C a 37 °C, presenta capacidad para desarrollarse en ambientes con pH de 4.4 a 9.6, pero su pH óptimo es entre 7 y 7.5; *L. monocytogenes* es halotolerante, siendo capaz de tolerar concentraciones altas de NaCl, aunque crece preferencialmente en un 2 % de sal, es capaz de crecer a concentraciones de 10 a 25.5 % de NaCl (Martínez, 2002).

Las especies de *Listeria* están muy extendidas en el medio ambiente, se han aislado del suelo, de la materia vegetal en putrefacción, del agua residual, de la comida animal, del pollo fresco y congelado, de alimentos frescos y procesados, de queso, de leche no procesada, de desechos de los mataderos, así como del tracto digestivo de humanos y animales asintomáticos.

*L. monocytogenes* se ha aislado de variadas especies de mamíferos, aves, peces, crustáceos e insectos. No obstante, su principal hábitat es el suelo y la materia vegetal en descomposición, en la cual sobrevive y crece como saprófito.

Debido a su amplia distribución, este microorganismo tiene muchas oportunidades de contaminar alimentos en distintos pasos de la producción alimentaria, siendo esta, la vía más frecuente por la que el ser humano adquiere la infección (Crespo *et al.*, 1999).

La listeriosis es una enfermedad causada por consumir alimentos contaminados con *Listeria monocytogenes*. El microorganismo causa una infección invasiva cuando el alimento contaminado es consumido por infantes, mujeres embarazadas, ancianos e individuos inmunocomprometidos (Hof *et al.*, 1997). La listeriosis puede presentarse esporádicamente o en epidemias, en ambas situaciones los alimentos contaminados son los principales vehículos de transmisión, ya que produce una toxina citolítica y hemolítica, llamada “listeriolisina O”, que actúa como un importante factor de virulencia.

Los síntomas de la listeriosis en personas sanas inmunocompetentes son: dolor de cabeza, letargia, fatiga y mialgia. Si la infección se propaga (listeriosis invasiva) puede tener un largo período de incubación, aproximadamente tres meses y varios síntomas, los cuales incluyen bacteriemia, meningitis, enfermedad neonatal, osteomielitis, encefalitis, endocarditis, peritonitis, infección pleural y neumonía. En el caso de listeriosis no invasiva, los síntomas están más asociados con el sistema digestivo y son: diarrea, dolor abdominal, náuseas, vómitos y calambres. (Walter, 2000; Wilson, 2000).

Los pacientes que desarrollarán listeriosis en la mayoría de los casos deberán presentar condiciones predisponentes para contraer la infección después de la ingestión de alimentos contaminados con esta bacteria. Los factores de riesgo incluyen enfermedades como cáncer, diabetes, terapia inmunosupresora y algún estado fisiológico de inmunosupresión como la edad avanzada y el embarazo (Bille, 1990).

Generalmente, este microorganismo es sensible a una amplia gama de antibióticos como penicilina, ampicilina, gentamicina, eritromicina, tetraciclina, rifampicina y vancomicina, así una vez identificada la naturaleza de la infección por *L. monocytogenes*, el tratamiento de elección para la infección involucra la utilización de penicilina y ampicilina, ya sea por separado o combinadas con gentamicina (Charpentier and Courvalin, 1999). La combinación de trimetoprima y sulfametoxazol

se ha utilizado con éxito en pacientes alérgicos a penicilinas, considerándose en la actualidad la terapia alternativa en estas circunstancias. En general dos semanas de tratamiento parecen ser suficientes en bacteriemias mientras que en meningitis se deberían utilizar ciclos más largos (Southwick y Purich, 1996; Hof *et al*, 1997).

Según la OMS en 1999, la incidencia anual por 100 mil habitantes puede variar de 0.3 al 0.8 % y alcanzar un 5 % durante algunos brotes epidémicos.

### **2.6.1 Mecanismo toxiinfeccioso de los agentes etiológicos de las enfermedades gastrointestinales**

*Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus* producen enterotoxinas que al ser ingeridas actúan localmente en las células linfoides que se encuentran en el intestino delgado. La enterotoxina termolábil producida por *E. coli* causa diarrea acuosa sin sangre por estimulación de la actividad de la enzima adenilato ciclasa en las células del intestino delgado. El aumento en la concentración de adenosina monofosfato (AMP) cíclico que se produce causa una excreción del ión cloruro, una inhibición de la absorción del sodio, y una pérdida importante de fluidos y electrolitos en el lumen del intestino. La toxina termolábil está compuesta por dos subunidades, la subunidad B, que se une a un receptor gangliosídico en la membrana celular, y la subunidad A, que penetra en la célula y media la transferencia de la ADP-ribosa del NAD a una proteína estimuladora (proteína G<sub>s</sub>) acoplada. Esto permite activar la proteína G<sub>s</sub>, y de esta forma, se está estimulando continuamente a la adenilato ciclasa para que produzca AMP cíclico. Además de la toxina termolábil, hay una toxina termoestable que afecta más a la guanosina monofosfato cíclica (GMP) que el AMP cíclico. Estimula la guanilato ciclasa, aumentando así la concentración de GMP cíclico, que inhibe la reabsorción de los iones de sodio y causa diarrea (Levinson, 2004).

## **2.6.2 Mecanismos de acción de los antibióticos empleados para el tratamiento de las enfermedades toxiinfecciosas relacionadas con el tracto gastrointestinal**

Las penicilinas actúan inhibiendo las transpeptidasas, las enzimas que catalizan la formación del enlace cruzado final en la síntesis del peptidoglicano, es decir, inhiben la síntesis de la pared celular, en *Staphylococcus aureus* la transpeptidación se realiza entre el grupo amino al final del enlace cruzado de la pentaglicina y el grupo carboxilo terminal de la D – alanina en la cadena lateral del tetrapéptido. A causa de la estereoquímica de la penicilina, similar a la de un dipéptido, D – alanil – D – alanina, la penicilina puede unirse al sitio activo de la transpeptidasa e inhibir su actividad. Las células tratadas con penicilina mueren por la destrucción, resultado de la entrada de agua en su interior por alta presión osmótica. Las sulfonamidas inhiben la síntesis de ácidos nucleicos bloqueando la síntesis del ácido tetrahidrofólico, necesario como donador del grupo metilo en la síntesis de los precursores del DNA, la adenina, la guanina y la timina (Levinson, 2004).

## **2.6.3 Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana de compuestos obtenidos a partir de fuentes naturales**

### **2.6.3.1 Prueba de difusión de disco**

Es una prueba utilizada ampliamente, que muestra resultados cualitativos (basados cuantitativamente) como la clasificación de un organismo si es susceptible, intermedia, moderadamente susceptible o resistente. La ventaja que tiene es su flexibilidad sobre el número y tipo de agentes antimicrobianos que pueden ser probados y la facilidad de hacer pruebas individuales en cualquier momento. Este método puede usarse para el crecimiento rápido de microorganismos como especies de *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Haemophilus*, y *Neisseria*. Las deficiencias de esta prueba son su interpretación no cuantitativa, su inaplicabilidad a

muchos organismos anaerobios y de lento crecimiento, y su falta de seguridad para predecir la susceptibilidad con algunos agentes antimicrobianos, tales como las polimixinas que difunden pobremente. El método de difusión de disco es efectivo para hacer pruebas de rutina, pero debe ser suplementado con una prueba de dilución cuando es inaplicable o cuando se necesitan resultados cuantitativos (Balows, 1970).

### **2.6.3.2 Prueba de dilución**

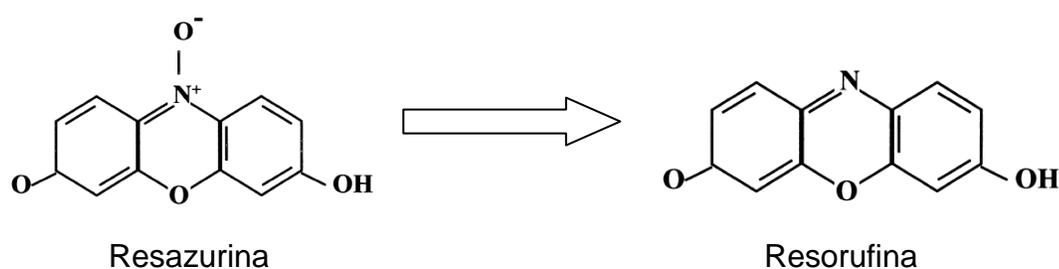
Este método ofrece resultados cuantitativos que no son afectados por el índice de crecimiento de organismos, y evita algunas de las complejidades causadas por las propiedades de difusión de ciertos agentes antimicrobianos. Las pruebas de dilución no tienen la flexibilidad de las pruebas de difusión, generalmente no pueden ser usadas para pruebas directas de material clínico por la dificultad de detectar contaminación, y si se reporta el resultado cuantitativamente, se requiere que el investigador sea capaz de interpretar el resultado. Este método provee resultados cuantitativos de la susceptibilidad de organismos anaerobios y para la determinación de actividad bactericida o evidencia de sinergia o antagonismo entre agentes antimicrobianos. Como con todas las pruebas de susceptibilidad, el laboratorio debe controlar el tamaño del inóculo y la lectura final con patrones de referencia que den resultados dentro del rango de cada serie de diluciones del agente antimicrobiano (Balows, 1970).

### **2.6.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana por el método de azul alamar**

El indicador azul alamar ha sido un método ideal para medir la proliferación celular y la citotoxicidad *in vitro* desde el año 1993. Ésta es una técnica simple, rápida, eficiente, sensible, segura y económica. No interfiere con el compuesto de prueba. Además el mismo método es aplicable a técnicas de alto rendimiento y las células pueden ser usadas para experimentos posteriores donde se añade 10 % de

la solución azul alamar al medio celular y se mide por colorimetría o fluorimetría. Sin embargo, se alcanza una mayor sensibilidad usando la propiedad fluorescente. La lectura final provee una estimación excelente de la proliferación celular, así como también la potencia de los compuestos tóxicos (Fields and Lancaster, 1993).

El azul alamar oxidado no fluorescente se reduce a tinte rosa fluorescente en el medio por la actividad celular del microorganismo de prueba (parecido al consumo de oxígeno a través del metabolismo). La resazurina es el compuesto original del azul alamar, el cual se reduce a resorufina (Figura 2.2) (Gloeckner *et al.*, 2001).



**Figura 2.2:** Reducción de resazurina a resorufina en el método de azul alamar

La presencia de células vivas permite la reducción del tinte. Las células pueden reducir al compuesto en el medio o enzimáticamente en el citoplasma y núcleo. El mecanismo de acción es el potencial de reducción de la bacteria en su metabolismo aeróbico (O'Brien *et al.*, 2000). El crecimiento microbiano mantiene un ambiente reducido mientras la inhibición de este crecimiento mantiene un ambiente oxidado (Pettit *et al.*, 2009).

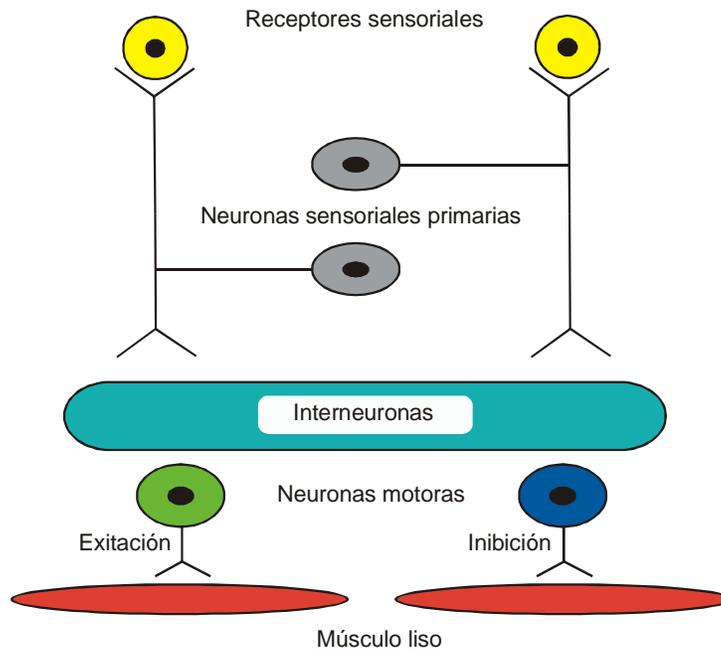
## **2.7 Fundamentación teórica del modelo de íleon aislado de cobayo**

### **2.7.1. Sistema Nervioso Entérico (SNE)**

#### **2.7.1.1 Definición y función del SNE**

El sistema nervioso entérico (SNE) se considera la tercera división del sistema nervioso autónomo (SNA) y es independiente del sistema nervioso central (SNC). Este sistema controla y coordina la motilidad, el flujo sanguíneo y la secreción del sistema digestivo. Contiene aproximadamente  $10^8$  neuronas, distribuidas en dos plexos que se extienden a lo largo del tubo digestivo: el plexo mientérico, localizado entre la capa de músculo liso longitudinal y la capa de músculo liso circular, y el plexo submucoso, asociado con el epitelio mucoso (Figura 2.3). La función refleja del intestino, que es independiente del SNC, es una respuesta de la acción coordinada de neuronas sensoriales, inter-neuronas y neuronas motoras excitatorias e inhibitorias. De manera adicional, el SNE se encuentra conectado con el SNC, mediante dos vías: una aferente y una eferente (Grundy y Schemann, 2006).

La vía aferente controla las sensaciones que se originan en el intestino, tales como el dolor, la sensación de saciedad y las náuseas. Por otra parte, la vía eferente está constituida por las innervaciones del simpático y del parasimpático, los cuales ayudan a controlar y coordinar las diferentes funciones del tracto gastrointestinal. Los mecanismos nerviosos que coordinan las funciones del sistema digestivo están mediados por un complejo sistema de neurotransmisores, neuromoduladores y la interacción de éstos con sus respectivos receptores (Grundy y Schemann, 2006).



**Figura 2.3:** Sistema Nervioso Entérico: Neuronas aferentes, Interneuronas, Neuronas motoras (excitadoras e inhibitorias)

## 2.7.2. Principales canales iónicos que regulan la excitabilidad de las neuronas del SNE

### 2.7.2.1 Canales de sodio voltaje-dependientes

Los canales iónicos más importantes involucrados en la generación de los potenciales de acción en las neuronas del SNE son los canales de  $\text{Na}^+$  voltaje-dependientes, los cuales se dividen, dependiendo de sus diferencias en la sensibilidad a la tetrodotoxina. En los plexos mientérico y submucoso del SNE del cobayo, se han identificado canales de sodio tipo  $\text{Na}_v1.2$ ,  $\text{Na}_v1.3$  y  $\text{Na}_v1.6$ . Los canales  $\text{Na}_v1.2$  se encontraron en los somas de la mayoría de las neuronas del SNE. En tanto que los canales  $\text{Na}_v1.3$  se localizaron en las dendritas, somas y axones de las neuronas del plexo mientérico y los canales  $\text{Na}_v1.6$  se encontraron en los axones de neuronas del plexo mientérico de la región del colon (Bartoo *et al.*, 2005).

El hecho de que los canales de Na<sup>+</sup> se expresen, de manera diferenciada, en diferentes tipos celulares de neuronas y sitios del SNE, sugiere que existen varios patrones de generación de potenciales de acción.

### **2.7.2.2 Canales de K<sup>+</sup> activados por calcio**

Una característica importante de las neuronas del SNE, es que presentan una hiperpolarización de larga duración, que se presenta después de la generación de un potencial de acción y que determina la excitabilidad de los circuitos nerviosos del SNE. Esta hiperpolarización está mediada por la apertura de un canal de K<sup>+</sup> dependiente de Ca<sup>+</sup> (IK) (Furness *et al*, 2004).

### **2.7.2.3 Otros canales iónicos localizados en las neuronas del SNE: canales iónicos sensibles al ácido (acid-sensing ion channels; ASICs).**

Los ASICs se encuentran distribuidos en las neuronas del SNC y del sistema nervioso periférico (SNP) y se ha encontrado evidencia que sugiere que este tipo de canales están involucrados en la mecanocepción (sensación de movimiento) y la nocicepción (sensación de dolor). Se ha demostrado que los canales ASIC3 participan, de manera importante, en las funciones de mecanocepción, mediada por las neuronas aferentes del SNE (Page *et al.*, 2004).

### **2.7.3. Neurotransmisores y neuromoduladores presentes en el SNE y sus respectivos receptores**

En el Cuadro 2.4 se presentan los principales neurotransmisores y neuromoduladores que se encuentran en el SNE, así como sus respectivos receptores.

**Cuadro 2.4:** Principales neurotransmisores del SNE y sus receptores

NEUROTRANSMISOR	RECEPTOR	REFERENCIA
Acetilcolina	Nicotínico N <sub>M</sub> Muscarínico M <sub>2</sub> y M <sub>3</sub>	Obaid <i>et al.</i> , 2005; Zholos <i>et al.</i> , 2004
Trifosfato de Adenosina (ATP)	Purinérgicos (P2X <sub>1</sub> -P2X <sub>7</sub> )	Obaid <i>et al.</i> , 2005 Xiang and Burnstock, 2005
Serotonina (5HT)	5HT <sub>3</sub> , 5HT <sub>4</sub> y 5HT <sub>7</sub>	Tonini <i>et al.</i> , 2005
Histamina	H <sub>1</sub> , H <sub>2</sub> y H <sub>3</sub>	Hill <i>et al.</i> , 1997
Oxido Nítrico	Guanilato ciclasa (sGC)	Kreiss <i>et al.</i> , 2004
Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA)	GABA <sub>B</sub>	Costa <i>et al.</i> , 2000
Ácido Glutámico	NMDA	Singewald and Sharp, 2000; Hill, 1997;
Dopamina	D <sub>1</sub> y D <sub>2</sub>	Costa <i>et al.</i> , 2000; Brookes, 2001; Ahn, 2003
Noradrenalina	$\alpha_1$ , $\alpha_2$ , y $\beta_2$	Furness, 2000; Galligan <i>et al.</i> , 2000
Somatostatina	SST <sub>1</sub> y SST <sub>2</sub>	Brookes, 2001; Ubilluz, 1993
Polipéptido vasoactivo intestinal (VIP)	VIP <sub>1</sub> y VIP <sub>2</sub>	Brookes, 2001 Leung <i>et al.</i> , 2003
Neuropéptido Y	Y <sub>1</sub>	Costa <i>et al.</i> , 2000; Furness, 2000

En los siguientes incisos se presenta información relevante con relación a algunos de los principales neurotransmisores y neuromoduladores que se encuentran en el SNE.

### 2.7.3.1 Acetilcolina (Ach)

La Ach, actuando a través de receptores colinérgicos nicotínicos, es el principal neurotransmisor involucrado en la activación sináptica rápida del SNE. Los receptores nicotínicos de las neuronas entéricas constan de subunidades Nicotínico

N<sub>M</sub> y muscarínico M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub>. La expresión de estos receptores no es uniforme en las neuronas del SNE, ya que existe variabilidad en su expresión en diferentes grupos de neuronas (Obaid *et al.*, 2005).

Los receptores nicotínicos neuronales contribuyen a la transmisión sináptica rápida en los plexos entéricos. En tanto que los receptores muscarínicos, principalmente localizados en la membrana celular del músculo liso, intervienen en la contracción provocada por Ach en las capas del músculo liso (Eglen *et al.*, 1996; Zholos *et al.*, 2004). Los receptores muscarínicos M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> son co-expresados en el músculo liso gastrointestinal y su activación produce dos efectos principales que involucran la inhibición de adenilato ciclasa y la activación de la fosfolipasa C (PLC), respectivamente en el músculo liso (Eglen *et al.*, 1996; Zholos *et al.*, 2004).

#### **2.7.3.2 Trifosfato de Adenosina (ATP)**

El ATP es otro neurotransmisor y neuromodulador de la activación sináptica rápida y lenta en el SNE y presenta diferentes receptores purinérgicos (P<sub>2</sub>X<sub>1</sub>-P<sub>2</sub>X<sub>7</sub>). En el íleon de cobayo se han encontrado despolarizaciones rápidas, mediadas por la interacción del ATP con receptores (P<sub>2</sub>X<sub>3</sub>) y despolarizaciones lentas, resultado de la estimulación de receptores P<sub>2</sub>Y<sub>2</sub> (Xiang and Burnstock, 2005).

#### **2.7.3.3 Serotonina (5-hidroxi-triptamina)**

La serotonina desempeña un papel muy importante en el mantenimiento de la función normal del tracto digestivo y en la comunicación entre éste y el SNC (Gershon, 2005). En el SNE se encuentran receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub> y 5-HT<sub>7</sub> (Tonini *et al.*, 2005).

Los receptores 5-HT<sub>4</sub> se encuentran en el plexo submucoso y el mientérico. La activación de estos receptores, localizados pre-sinápticamente, provoca la liberación de Ach, lo cual resulta en una estimulación del músculo liso intestinal (Liu

*et al.*, 2005). En contraste, la activación de los receptores 5-HT<sub>7</sub> provoca una relajación del intestino, mediada por una estimulación de neuronas nitrérgicas, que expresan óxido nítrico sintetasa (NOS). Dicha estimulación, da como resultado la producción de óxido nítrico (NO), el cual estimula su receptor intracelular, la guanilato ciclasa soluble (sGC), localizada en las células del músculo liso, provocando su relajación (Tonini, 2005).

#### **2.7.3.4 Histamina**

La histamina es un importante neurotransmisor endógeno ampliamente distribuido a lo largo del tracto gastrointestinal y éste regula una variedad de eventos patofisiológicos del sistema digestivo, incluyendo la secreción ácida gástrica, la motilidad intestinal, las respuestas vasomotoras, las enfermedades que involucran úlceras pépticas, las respuestas inflamatorias intestinales y las reacciones alérgicas. Todos estos eventos implican la interacción de la histamina con receptores H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> y H<sub>3</sub> (Hill *et al.*, 1997). En las células del músculo liso gastrointestinal se expresan principalmente receptores H<sub>1</sub>. La respuesta contráctil del íleon a la histamina se produce a través de la activación de este receptor, lo cual provoca la elevación de los niveles de inositol 1,4,5-trifosfato, induciendo movilización del calcio intracelular (Donaldson y Hill., 1986).

#### **2.7.3.5 Óxido Nítrico**

La óxido nítrico sintetasa (NOS) se encuentra presente en un gran número de neuronas entéricas, en las que el NO contribuye en los mecanismos que controlan la motilidad. Además de esta fuente neuronal de NO (nNOS), este mensajero químico también es producido por otros componentes del sistema inmune gastrointestinal, tales como los monocitos y macrófagos.

Como ya se describió anteriormente, el NO provoca relajación del músculo liso intestinal, la cual esta mediada por la estimulación de la guanilato ciclasa soluble (sGC), con la respectiva elevación en la producción de CMPc (Kreiss *et al.*, 2004).

#### **2.7.3.6 Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA)**

El GABA es un neurotransmisor presináptico en el SNE. Se forma a partir de la descarboxilación enzimática del ácido glutámico y su acción esta mediada en el SNE por receptores metabotrópicos GABA<sub>B</sub> (Liu *et al.*, 2005).

#### **2.7.3.7 Ácido glutámico**

El ácido glutámico es uno de los neurotransmisores excitatorios que se localizan en el SNE, en cuyas neuronas se han localizado receptores ionotrópicos NMDA. (Singewald and Sharp., 2000).

#### **2.7.3.8 Dopamina**

La dopamina es un neurotransmisor que se produce principalmente en *nucleus accumbens*, la *substancia nigra* y el cuerpo estriado. Aunque también en el SNE se han encontrado receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> (Ahn y Phillips., 2003).

#### **2.7.3.9 Noradrenalina (NA)**

En el SNE se localizan neuronas adrenérgicas que producen noradrenalina la cual, actúa sobre receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , y  $\beta_2$  (Furness, 2000; Galligan *et al.*, 2000).

### **2.7.3.10 Somatostatina**

Este neuromodulador constituye uno de los neuropéptidos más importantes localizados en el SNC (con mayor predominio en el hipotálamo) y en el SNE. También se ha localizado en las células D del tracto gástrico y en los islotes de Langerhans del páncreas.

Los efectos más importantes de la somatostatina incluyen la inhibición de las secreciones del estómago, del páncreas, del intestino delgado y del aparato biliar. También se sabe que este neuropéptido modula la actividad motora gastrointestinal por su interacción con receptores SST<sub>1</sub> y SST<sub>2</sub> (Brookes, 2001; Ubilluz, 1993).

### **2.7.3.11 Polipéptido vasoactivo intestinal (VIP)**

El VIP es liberado por las neuronas del plexo submucoso, es el único péptido en el intestino que actúa por la vía del AMPc (Leung *et al.*, 2003).

### **2.7.3.12 Neuropéptido Y**

El neuropéptido Y, es el principal agente pro-absorción y anti-secreción liberado por las terminaciones nerviosas entéricas (Costa *et al.*, 2000; Furness, 2000).

## **2.7.4. Receptores a otros mensajeros químicos recientemente localizados en el SNE**

### **2.7.4.1 Receptores al factor liberador de corticotropina**

Se sabe que cambios en el SNC, tales como la depresión o la ansiedad influyen, de manera importante, en la función del tracto gastrointestinal y pueden producir procesos inflamatorios en éste. Existen evidencias que sugieren que el

factor liberador de corticotropina está involucrado en estas alteraciones intestinales inducidas por el estrés (Taché, 2004), las cuales incluyen disfunciones en la función motora de propulsión del intestino, en la secreción de la mucosa y en la barrera epitelial. En el íleon de cobayo se han encontrado receptores al factor liberador de corticotropina CRF<sub>1</sub>. En el SNE del humano, a la fecha todavía no se han identificado receptores CRF<sub>1</sub> (Liu *et al.*, 2005).

#### **2.7.4.2 Receptores a cannabinoides**

Los cannabinoides inhiben la motilidad gástrica e intestinal a través de la activación de receptores CB<sub>1</sub> (Mathison *et al.*, 2004).

#### **2.7.4.3 Receptores a prostaglandinas**

En las neuronas del SNE se expresa, de manera constitutiva la ciclooxigenasa (COX)-2, de tal manera que las prostaglandinas se consideran como otra clase de moléculas de señalización liberadas por el SNE (Costa *et al.*, 2004 y Porcher *et al.*, 2004).

### **2.8 Contracción espontánea del músculo liso intestinal**

El músculo liso intestinal se contrae de manera espontánea cuando se estira y esta contracción no depende de ninguna inervación extrínseca. Existen estímulos en el intestino, por ejemplo la presencia de alimentos, que generan la distensión de las paredes gastrointestinales, induciendo una actividad motora en las células del músculo liso intestinal. Esta actividad, que incluye los movimientos peristálticos está controlada por circuitos nerviosos intrínsecos del SNE (Furnes *et al.*, 1987; Hasler *et al.*, 1994;). Los circuitos nerviosos intrínsecos contienen neuronas intrínsecas aferentes primarias que responden a la distensión de las paredes del intestino y son las primeras en recibir la información sobre la naturaleza e intensidad del estímulo (Grider y Jin, 1994; Furness *et al.*, 1998; Kunze *et al.*, 1999). Las neuronas

intrínsecas aferentes primarias, son neuronas Dogiel tipo II que se encuentran distribuidas en ambos plexos (mientérico y submucoso) del SNE (Furness *et al.*, 1998).

La respuesta de estas neuronas al estiramiento depende de la apertura de canales activados por estiramiento ("stretch activated channels") localizados en la membrana del músculo liso intestinal. La apertura de estos canales inicia la contracción de la célula muscular. El movimiento mecánico provocado por la contracción induce la distorsión de sitios específicos en las membranas de las neuronas intrínsecas aferentes, provocando la activación de canales iónicos en las membranas neuronales, con lo cual se generan y propagan potenciales de acción que se transmiten a otras neuronas y a otras células musculares (Kunze *et al.*, 1999).

## **2.9 Modelo de íleon aislado de cobayo**

El hecho de que exista una gran variedad de sustancias neurotransmisoras en el SNE, permite compararlo farmacológicamente con el sistema nervioso central (SNC). Así, la musculatura lisa gastrointestinal inervada por el SNE constituye un tejido adecuado para la caracterización de compuestos con potencial actividad farmacológica a nivel del sistema nervioso y del músculo liso gastrointestinal. Este modelo presenta ventajas adicionales como la relativa facilidad del bioensayo y el requerimiento de pequeñas cantidades de sustancia para inducir un efecto en el íleon. Por las razones antes mencionadas el modelo de íleon aislado de cobayo resulta muy apropiado, tanto en la evaluación farmacológica preliminar de los extractos crudos preparados a partir de diferentes organismos, como en el monitoreo de la actividad biológica durante el proceso de aislamiento de los principios activos (Samuelsson, 1991; Rojas *et al.*, 2002).

Los modelos experimentales *in vitro* para determinar la actividad farmacológica usados con mayor frecuencia son íleon aislado de cobayo y yeyuno aislado de conejo, según Astudillo-Vázquez, *et al.*, (2009).

### III. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, el estudio de los aceites esenciales obtenidos a partir de diversas plantas de uso alimenticio y medicinal tiene un gran auge, debido a que se ha demostrado que las esencias constituyen un gran reservorio de compuestos bioactivos. Estos aceites representan una mezcla compleja de metabolitos secundarios volátiles, entre los que se encuentran mono y sesquiterpenos, alcoholes, éteres, aldehídos y cetonas, responsables no sólo de las características aromáticas, sino también de las propiedades medicinales que se les han atribuido a muchas esencias (Kalemba y Kunicka, 2003).

Los estudios realizados sobre la actividad biológica de los aceites esenciales se han centrado principalmente en la determinación de su actividad antimicrobiana e insecticida (Daferera *et al.*, 2000; Burt, 2004). Aunque también se ha demostrado que diversos aceites esenciales y/o sus componentes poseen propiedades antiinflamatorias (Iskan *et al.*, 2006), antioxidantes (Sacchetti *et al.*, 2004; Singh, *et al.*, 2006; El-Massry *et al.*, 2009), antitumorales (Kalemba y Kunicka, 2003) antiespasmódica y vasorrelajantes (Yanaga *et al.*, 2006; Caldas-Magalhaes *et al.*, 2008; Pinto *et al.*, 2009), lo que ha contribuido a incrementar el interés en las propiedades funcionales de las esencias y su posible aplicación medicinal.

Se ha encontrado que los principios activos antiespasmódicos principalmente son flavonoides, terpenos y alcaloides (Astudillo-Vázquez *et al.*, 2009).

Los trabajos reportados con respecto a las propiedades medicinales de *Psidium guajava* L. se han enfocado al estudio de los extractos acuoso, metanólico y etanólico de las hojas y de los compuestos polifenólicos identificados en estos extractos, algunos de los cuales tienen propiedades antiespasmódicas e inhiben el crecimiento de bacterias asociadas con enfermedades intestinales en humanos (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2008).

Los estudios para determinar el efecto biológico del aceite esencial y de sus componentes mayoritarios extraídos a partir de las hojas de *Psidium guajava* L. son muy limitados. De hecho, sólo se ha reportado el efecto antimicrobiano del aceite esencial total de la hoja de *Psidium guajava* L. (Gonçalves *et al.*, 2008); y el efecto antiespasmódico de  $\beta$ -cariofileno, limoneno y cineol, componentes mayoritarios del aceite esencial de la hoja de *Psidium guajava* pero en mezclas y a diferentes concentraciones en aceites esenciales de otros productos naturales, que contienen alguno de estos compuestos (Prakasha *et al.*, 2006, Ponce-Montera *et al.*, 2008; Karim *et al.*, 2010; Pinho da Silvaa *et al.*, 2010). Por lo anterior, en este proyecto de investigación se plantea estudiar la actividad farmacológica y antimicrobiana del aceite esencial y de sus componentes aromáticos volátiles mayoritarios obtenidos a partir de la hoja de *Psidium guajava* L., a fin de validar su empleo etnomédico para el tratamiento de los denominados desórdenes gastrointestinales. Los resultados derivados de este trabajo contribuyen a revalorar y considerar uno de los recursos naturales de nuestro país, a través de la acreditación científica de su potencial nutracéutico para la prevención y el tratamiento de enfermedades asociadas con el tracto gastrointestinal.

## IV. HIPÓTESIS

El aceite esencial y sus componentes mayoritarios obtenidos a partir de las hojas de *Psidium guajava* L. presentan un efecto antimicrobiano y antiespasmódico.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del aceite esencial y sus componentes mayoritarios presentes en las hojas de la especie vegetal *Psidium guajava* L. sobre las contracciones espontáneas de íleo aislado de cobayo y su actividad antimicrobiana en bacterias patógenas que afectan el tracto gastrointestinal.

### 5.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial y sus componentes mayoritarios obtenidos a partir de las hojas de *Psidium guajava* L. en bacterias patógenas que afectan el tracto gastrointestinal, mediante el método de microplaca utilizando el indicador azul alamar.
- Evaluar el efecto del aceite esencial y sus componentes mayoritarios obtenidos a partir de las hojas de la especie *P. guajava* sobre las contracciones espontáneas de la musculatura lisa del íleo de cobayo.
- Determinar la  $CE_{50}$  y el  $E_{max}$  del aceite esencial y sus componentes mayoritarios obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L. sobre las contracciones espontáneas del íleo aislado de cobayo.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Descripción del material biológico

#### 6.1.1 Material vegetal

Las hojas de *Psidium guajava* L. se obtuvieron de una plantación de guayaba ubicada en el pueblo de Amatlán, Municipio de Tepoztlán, en el Estado de Morelos. El material vegetal fue identificado por el Dr. Robert Bye del Instituto de Biología y una muestra de referencia se depositó en el Herbario Nacional (MEXU) del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

#### 6.1.2 Animales de experimentación

Para los ensayos en íleon se utilizaron cobayos machos adultos (de 600-800 g) de la cepa Harley. Los cobayos se colocaron en jaulas individuales bajo condiciones controladas de temperatura ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ), humedad relativa (45 a 55%) y luz (ciclos de luz-oscuridad 12:12 h). El cuidado y manejo de los animales se llevó a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

#### 6.1.3 Material biológico

Para realizar el ensayo de la actividad antimicrobiana del extracto y los compuestos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L., se utilizaron como microorganismos de prueba cepas de microorganismos de la American Type Cultural Collection (ATCC) asociadas con una infección gastrointestinal como *Salmonella typhi* (ATCC 6539), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Listeria monocytogenes* (ATCC 244). También se evaluó la actividad antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), microorganismo no asociado con afecciones del tracto gastrointestinal; sin embargo, este

microorganismo se puede transmitir al humano a través de los alimentos y es multi resistente (Tenover, 2006), por lo que también se decidió incluir en este proyecto de investigación. Las cepas fueron proporcionadas por el M.C. José Tomás Hernández Méndez del cepario del Laboratorio de Bacteriología Médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

## **6.2 Análisis de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Psidium guajava* L. y de sus componentes mayoritarios**

### **6.2.1 Preparación de la suspensión bacteriana de trabajo**

Se tomó una alícuota de 1 ml de cultivo bacteriano de 5 a 6 horas, cultivado en medio Mueller Hinton a 37 °C y se transfirió a un tubo de rosca. Después se ajustó la suspensión al estándar No. 1 de Mc Farland con medio de cultivo Mueller Hinton; de esta suspensión se realizó una dilución 1:10 con el medio Mueller Hinton, esta dilución se realizó directamente en una caja de Petri. Por cada placa a ensayar se deben preparar 10 ml de dilución (Luna-Herrera *et al.*, 2007).

### **6.2.2 Preparación de las soluciones “stock” del aceite esencial de hoja de *Psidium guajava* L. y de sus componentes mayoritarios**

Se disolvieron 20 mg del aceite esencial y de cada uno de sus componentes mayoritarios en 1 ml de DMSO, y se mantienen en ultra congelación (- 70 °C) para su conservación. Las soluciones “stock” se prepararon a una concentración de 200 µg/ml, posteriormente se homogeneizaron perfectamente.

### **6.2.3 Preparación de la placa**

Se tomó una placa para cultivo de 96 pozos, se dejaron los pozos de la periferia intactos y a los 60 restantes se les adicionó 100 µl de medio Mueller Hinton, con una pipeta multicanal.

Se adicionaron 100 µl de las soluciones “stocks” de los compuestos a ensayar en el pozo que inicia cada hilera de trabajo. Una vez depositadas las soluciones “stock”, se realizaron las correspondientes diluciones seriadas con una pipeta multicanal, se resuspendió la dilución del primer pozo y se tomaron 100 µl del mismo para transferirlos al siguiente conjunto de pozos.

Se tomaron 100 µl de la nueva dilución y se transfirieron cuantitativamente al siguiente conjunto de pozos, se resuspendieron las diluciones, evitando la formación de burbujas. Este paso se repitió de manera sucesiva, hasta completar la dilución seriada de 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 y 1.5625 µg/ml, eliminando los 100 µl de la última dilución de cada compuesto y del aceite esencial.

Una vez realizadas las diluciones seriadas, se adicionaron 100 µl de la suspensión bacteriana en cada pozo con los compuestos y el aceite esencial.

Se prepararon los controles en la última hilera de la parte inferior de la placa. Para el control de 100 %, se adicionaron 100 µl de la suspensión bacteriana, para el control de 10 %, se adicionaron 10 µl de la suspensión bacteriana y 90 µl del medio de cultivo Mueller Hinton y para el control del 1 %, se adicionaron 1 µl de la suspensión bacteriana y 99 µl del medio de cultivo Mueller Hinton.

Para revelar, se adicionaron 20 µl de solución de azul alamar en cada pozo. Posteriormente, se colocaron 200 µl de agua destilada estéril en los pozos de la periferia y se incubaron de acuerdo a la bacteria que se trabajó, las condiciones de incubación de cada bacteria se muestran en el Cuadro 6.1.

**Cuadro 6.1:** Condiciones de incubación de la placa para el ensayo de la actividad antimicrobiana por el método de azul alamar

Bacteria	Tiempo de incubación (horas)	Temperatura de incubación
<i>Listeria monocytogenes</i>	3	37 °C
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	37 °C
<i>Salmonella typhi</i>	2	37 °C
<i>Escherichia coli</i>	2	37 °C
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	3	37 °C

Fuente: Luna-Herrera *et al.*, 2007.

## 6.2.4 Interpretación de resultados

### 6.2.4.1 Lectura visual

Se realizó la lectura de los pozos, cerciorándose de que el control del 100 %, tenga un color rosa intenso, que se tomó como concentración mínima inhibitoria (CMI) a la concentración correspondiente al último pozo que permaneció azul y cuya intensidad sea igual o menor a la obtenida en el control del 10 %.

### 6.2.4.2 Lectura fluorométrica

La fluorescencia se midió en fluorómetro de placa (Fluoroskan Ascent FL, Thermo, Finland) con filtros de excitación de 544 nm y de emisión de 590 nm y se compararon las lecturas en unidades relativas de fluorescencia (URF) del control del 10 %, con las de los pozos de prueba. Se tomó como concentración mínima inhibitoria a la concentración correspondiente al último pozo cuyo valor de URFs sea igual o menor al obtenido en el control del 10 %. La CMI se define como la más baja concentración de medicamento que presenta valores más bajos de unidades relativas de fluorescencia que los que se presentan por el control del 10 % de crecimiento. Siempre debe existir una correlación entre fluorimetría y las

observaciones visuales, por ejemplo celdas rosas presentan altos valores de unidades relativas de fluorescencia (Luna-Herrera *et al.*, 2007).

### **6.3 Evaluación farmacológica del aceite esencial de las hojas de *Psidium guajava* L. y de sus componentes mayoritarios**

Los animales de experimentación se sacrificaron por dislocación cervical. Se removió el íleon, se lavó en solución de Krebs-Henseleit y posteriormente se puso en solución de Krebs-Henseleit a 37 °C y pH 7.4, de la siguiente composición (mM): NaHCO<sub>3</sub> 20, NaCl 119, KCl 4.6, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 1.5 y glucosa 11.4, burbujeando constantemente con una mezcla gaseosa de 95 % de oxígeno y 5 % de dióxido de carbono, incubado a una temperatura de 37 °C, para simular las condiciones fisiológicas *in vivo*. (Rojas *et al.*, 1999).

El íleon se cortó en segmentos de 1 cm de longitud, cada segmento se colocó verticalmente en una cámara de tejido de 20 ml con solución de Krebs-Henseleit. Después de media hora de incubación y bajo una tensión de 1 g, se midieron las respuestas contráctiles usando transductores de fuerza isométrica (Grass FT 03) conectados a un polígrafo (Grass 7D). Después del periodo de estabilización, se registró en 10 minutos la respuesta, que es un periodo de control, cada compuesto puro y el extracto total se añaden al baño a diferentes concentraciones no acumulativas y las respuestas se observaron por 10 minutos. Solamente una concentración se usó para cada segmento de íleon (Rojas *et al.*, 1999).

El efecto de los extractos se determinó comparando las áreas bajo la curva inscritas por la frecuencia y la amplitud de las contracciones de íleon, antes y después de la aplicación del extracto y de los compuestos de prueba. Las áreas se miden de los trazos del polígrafo usando una tableta analítica digital (CPLAB-10) y un software especialmente diseñado (Rojas *et al.*, 1999).

## **6.4 Análisis Estadístico**

Los datos obtenidos solamente de los ensayos farmacológicos, ya que los resultados de los ensayos antimicrobianos se leen directamente en el fluorómetro y sólo se realizaron por duplicado, se analizaron aplicando un análisis de varianza (ANOVA) y utilizando la prueba de Tukey para detectar diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ). Este análisis se llevó a cabo empleando el programa estadístico STATGRAPHICS (Graphics Software System, Manufistics, Inc., USA).

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Actividad antimicrobiana del aceite esencial de la hoja de *Psidium guajava* L. y de sus componentes mayoritarios

Los resultados del análisis para la determinación del efecto antimicrobiano del aceite esencial y de sus componentes mayoritarios en las hojas de *Psidium guajava* L. por el método utilizando el indicador azul alamar sobre las cepas ATCC de *Salmonella typhi* ATCC 6539, *Listeria monocytogenes* ATCC 244, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Escherichia coli* ATCC 25922 se muestran en el Cuadro 7.1. Se ha establecido que un extracto total es efectivo para determinado microorganismo cuando su concentración mínima inhibitoria (CMI) es menor o igual a 50 µg/ml, en tanto que en el caso de los compuestos puros su CMI debe ser menor o igual a 5 µg/ml (Luna-Herrera *et al.*, 2007). La CMI en microbiología, es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de su incubación. La concentración mínima inhibitoria es importante en diagnósticos de laboratorio para confirmar la resistencia de microorganismos a un agente antimicrobiano y además para monitorizar la actividad de los nuevos agentes antimicrobianos (Andrews, 2001). Por otra parte, la concentración mínima bactericida (CMB) es la concentración a la cual el 99.9% o más del inóculo inicial muere por efecto de un agente antimicrobiano (Carson *et al.*, 1995; Canillac y Mourey, 2001).

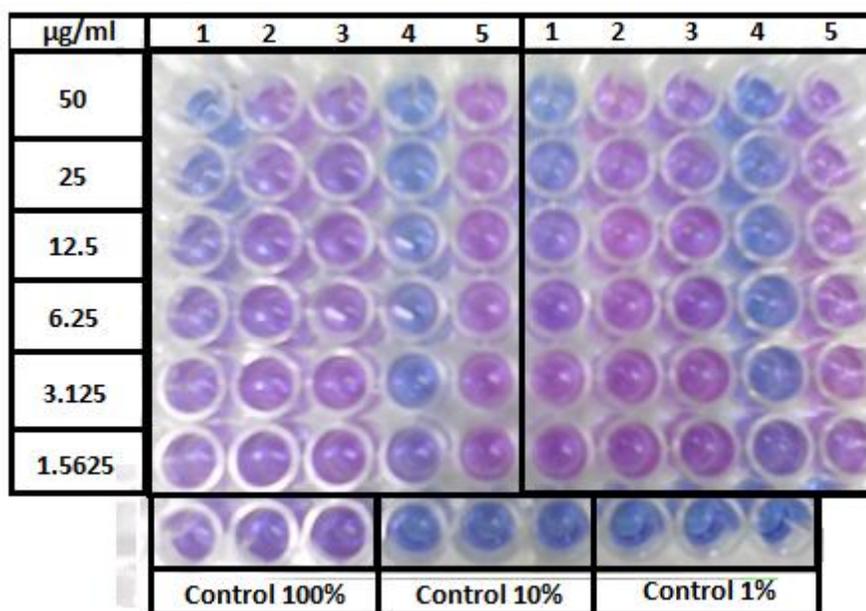
**Cuadro 7.1:** Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de guayaba y sus componentes mayoritarios sobre las cepas de prueba

Microorganismo de prueba	Concentración mínima inhibitoria (µg/ml)				
	Aceite esencial de guayaba	(S)-Limoneno	(R)-Limoneno	β-cariofileno	Cineol
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 244	50	NA	NA	3.125	NA
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 9027	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	NA	NA	NA	NA	NA

NA= No activo, en donde la CMI >50 µg/ml.

Las concentraciones del aceite esencial y de sus componentes mayoritarios para el análisis de su actividad antimicrobiana fueron de 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 y 1.5625 µg/ml, como se ejemplifica en la Figura 7.1. En esta figura también se muestran los controles que corresponden a suspensiones bacterianas a una concentración del 100, 10 y 1 % en el caldo de cultivo en ausencia de un agente antimicrobiano para demostrar la viabilidad de los microorganismos en las condiciones de prueba del ensayo. El color rosa en el control para la suspensión bacteriana al 100 % indica una reducción del colorante azul alamar por la presencia del microorganismo, el cual se desarrolló sin restricción debido a la ausencia de un

agente antimicrobiano en el medio. La reducción del colorante no se observa en los controles correspondientes a las suspensiones bacterianas al 10 y 1 %, en virtud de que la cantidad de microorganismos en el medio no es suficiente para llevar a cabo la reducción del colorante, la cual es directamente proporcional al número de microorganismos que se encuentran en contacto con el colorante (Luna-Herrera *et al.*, 2007).



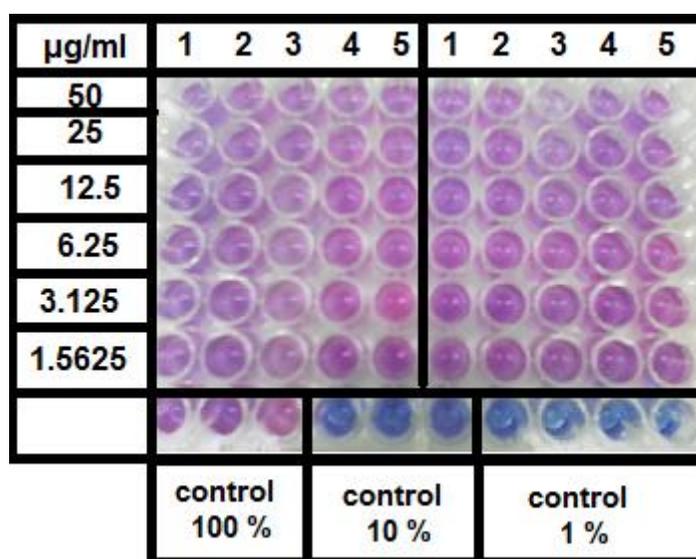
**Figura 7.1:** Actividad antimicrobiana en placa del aceite esencial de guayaba y sus componentes mayoritarios contra *Listeria monocytogenes* ATCC 244. (1) aceite esencial de *Psidium guajava* L, (2) S - limoneno, (3) R – limoneno, (4)  $\beta$  – cariofileno, (5) cineol.

Como se puede observar en la Figura 7.1, el aceite esencial de las hojas de *Psidium guajava* L. no presentó actividad antimicrobiana *versus* los microorganismos de prueba a excepción de *Listeria monocytogenes* ATCC 244. Estos resultados no concuerdan con lo reportado por Gonçalves *et al.* (2008), quienes observaron que el aceite esencial de las hojas de *Psidium guajava* L. extraído por el método de hidrodestilación inhibió el crecimiento de dos cepas de *Staphylococcus aureus*, una de ellas correspondiente a una cepa aislada y tipificada en el laboratorio y otra

aislada a partir de *Xiphopenaeus kroyeri* (camarón), así como en una cepa aislada y caracterizada en el laboratorio de *Salmonella* Anatum. Sin embargo, estos autores señalan que el aceite esencial no tuvo un efecto antimicrobiano en una cepa *E. coli* aislada y tipificada en el laboratorio y en otra cepa de *E. coli* aislada a partir de *X. kroyeri*. En este mismo trabajo se menciona que el extracto de las hojas llevado a cabo con metanol presentó un mayor efecto antimicrobiano con respecto al aceite esencial y a los extractos con hexano y acetato de etilo, en ningún caso se indican los componentes mayoritarios presentes en los extractos. Por otra parte, Joseph *et al.* (2010) evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *P. guajava* en 10 cepas bacterianas MTCC (Microbial Type Culture Collection) entre las que se incluyó el *Staphylococcus aureus* (MTCC-87). El aceite esencial inhibió el crecimiento de este microorganismo aunque su efecto antimicrobiano fue más significativo en las cepas de *Bacillus cereus*, (MTCC-430), *Lactobacillus lactis* (MTCC-440), *Enterobacter aerogenes* (MTCC-2822) y *Glucanobactor oxidans* (MTCC-904). Es importante señalar que los componentes mayoritarios del aceite esencial de *P. guajava* obtenido por Joseph *et al.* (2010) fueron dos alcaloides: la criptonina (56%) y la dihidrobenzofenantridina (20%), un terpeno simple: el prenol (26%) y una flavanona (4.2%). Es evidente que la composición del aceite esencial de *P. guajava* evaluado por Joseph *et al.* (2010) es diferente con respecto a los constituyentes del aceite esencial que se evaluó en este trabajo, cuyos componentes mayoritarios son principalmente monoterpenos como el R-limoneno, S-limoneno y el 1-8 cineol (eucaliptol) y un sesquiterpeno ( $\beta$ -cariofileno). A este respecto, se ha señalado que los factores ambientales como son el suelo, clima, flora asociada y métodos de cultivo pueden afectar a los metabolitos secundarios de los vegetales. Por ejemplo, muchas plantas productoras de alcaloides, acumulan mayores concentraciones de estos componentes en suelos húmedos que en suelos áridos, lo que puede estar relacionado con la cantidad de nitrógeno, ya que los suelos áridos suelen ser pobres en este elemento (Núñez-Rivas, 2003; Madeira *et al.*, 2005).

Los resultados que se reportan en este trabajo de investigación apoyan por una parte los datos publicados por Gonçalves *et al.* (2008) para *E. coli*, ya que no se

observó una inhibición en el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 como se muestra en la Figura 7.2. Por otra parte, los resultados de esta investigación contradicen los hallazgos previos con respecto a la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *P. guajava* para inhibir el crecimiento de cepas de *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* señalado por Gonçalves *et al.* (2008) y Joseph *et al.* (2010). La variabilidad en los resultados puede explicarse en función de las diferencias en cuanto a los componentes mayoritarios del aceite esencial presente en las hojas de *P. guajava* y a que su actividad antimicrobiana fue evaluada en diferentes especies bacterianas.



**Figura 7.2:** Actividad antimicrobiana en placa del aceite esencial de guayaba y sus componentes mayoritarios contra *Escherichia coli* ATCC 25922. (1) aceite esencial de *Psidium guajava* L, (2) S - limoneno, (3) R – limoneno, (4) β – cariofileno, (5) cineol.

El aceite esencial de *P. guajava* evaluado en esta investigación únicamente presentó un efecto antimicrobiano sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 244 detectándose una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 50 µg/ml (ver Figura 7.1). Cosentino *et al.* (1999).observaron que la concentración mínima bactericida (MBC por sus siglas en inglés) sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 del aceite esencial de diferentes variedades de tomillo (*Thymus capitatus* y *Thymus herba-*

*barona*) fue de 450 y 225 µg/ml respectivamente. Por otra parte, Taran *et al.* (2010) determinaron el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Ferulago angulata* subsp. *carduchorum* contra *Listeria monocytogenes* (ATCC 29843) detectando una CMI en un rango desde 137, hasta 170 µg/ml. Estas concentraciones resultan significativamente más altas comparadas con la CMI detectada para el aceite esencial de *P. guajava* contra *L. monocytogenes* ATCC 244 que fue de 50 µg/ml. Esto indica que efecto antimicrobiano del aceite esencial de *P. guajava* versus *L. monocytogenes* es mayor con respecto al efecto antimicrobiano reportado para el aceite esencial de *T. capitatus*, *T. herba-barona* y *Ferulago angulata*.

Las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales extraídos de diferentes especies vegetales, se atribuye a su alto contenido de compuestos fenólicos como el timol y el carvacrol. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que los componentes minoritarios (terpenos que no contengan un grupo fenol en su estructura) puedan contribuir al efecto antimicrobiano de los aceites esenciales (Cosentino *et al.*, 1999; Botelho *et al.*, 2007; Bassolé *et al.*, 2010).

Con respecto a los componentes mayoritarios del aceite esencial, únicamente el β-cariofileno mostró actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, detectándose una CMI de 3.13 µg/ml (Cuadro 7.1). Esta concentración es menor a la CMI observada para el aceite esencial de *P. guajava* (50 µg/ml). Esto puede atribuirse a un efecto antagonista entre los componentes del aceite esencial, lo cual ya ha sido reportado para el aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*, *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha piperita* L. y *Ocimum basilicum* L., ya que sus compuestos de manera individual presentaron un efecto antimicrobiano mayor en comparación con el aceite esencial (Carson y Riley, 1995; Bassolé *et al.*, 2010).

La Figura 7.1 muestra evidencia de la inhibición de crecimiento de *Listeria monocytogenes* por el β - cariofileno a una concentración de 3.125 µg/ml. El color azul en los pozos indica que no hubo reducción del colorante azul alamar por el

microorganismo de prueba debido a que se inhibe su crecimiento por la presencia de un agente antimicrobiano en el medio.

Se ha señalado que el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de origen vegetal tiene un carácter bacteriostático, debido a que la actividad que poseen los aceites esenciales sobre las bacterias es inhibir su crecimiento a través de un daño a la membrana y a la coagulación del citoplasma (Bakkali *et al.*, 2008), de modo que el efecto inhibitorio que presentó el aceite esencial de la hoja de *Psidium guajava* L. y el  $\beta$  - cariofileno sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 244 pudiera obedecer a estas transformaciones en la célula bacteriana.

Así mismo, se ha descrito que en el caso de los terpenos de tipo fenólico como el eugenol, el grupo hidroxilo podría reaccionar con las proteínas e inhibir la actividad de las enzimas en los microorganismos (Wendakoon y Sakaguchi, 1993). Por su parte, el carvacrol y el timol han mostrado tener un carácter hidrófobo con capacidad para modificar la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, a través de la liberación de los lipopolisacáridos provocando un aumento en la permeabilidad de la membrana citoplásmica induciendo una disminución en la concentración de trifosfato de adenosina (ATP) intracelular (Lambert *et al.*, 2001). El daño a la pared y a la membrana celular puede dar lugar a la liberación de macromoléculas y a la lisis de la célula bacteriana (Oussalah *et al.*, 2006).

Es importante destacar que la CMI de la penicilina para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* ha sido reportada con un valor de 1.56  $\mu\text{g/ml}$  (National Committee for the Clinical Laboratory Standards, 1993), la cual resulta inferior con respecto a la CMI observada para el  $\beta$  - cariofileno (3.125  $\mu\text{g/ml}$ ). Sin embargo, esta concentración es menor con respecto a la CMB detectada para el  $\alpha$ -pineno, p-cimeno,  $\gamma$ -terpineno, linalool,  $\alpha$ -terpineol (en todos ellos fue > 900  $\mu\text{g/ml}$ ), timol y carvacrol (en ambos fue de 450  $\mu\text{g/ml}$ ). Estos resultados indican que el  $\beta$  - cariofileno tiene un efecto antimicrobiano *versus* *L. monocytogenes* menor a la

penicilina; sin embargo, su efecto antimicrobiano es mejor con respecto al reportado para diferentes terpenos (Cosentino *et al.*, 1999).

Leverentz *et al.* (2003) evaluaron la actividad de la nisina, que es una bacteriolisina producida por bacterias lácticas y posible responsable de la restricción del crecimiento de *Listeria monocytogenes* en los alimentos. Estos autores encontraron que la CMI de la nisina para *Listeria monocytogenes* fue de 200 µg/ml. Este dato indica que la sensibilidad de *L. monocytogenes* al aceite esencial de *P. guajava* L. (CMI= 50 µg/ml) y al β - cariofileno (CMI= 3.125 µg/ml) es mayor en comparación con la que este microorganismo presentó ante la nisina.

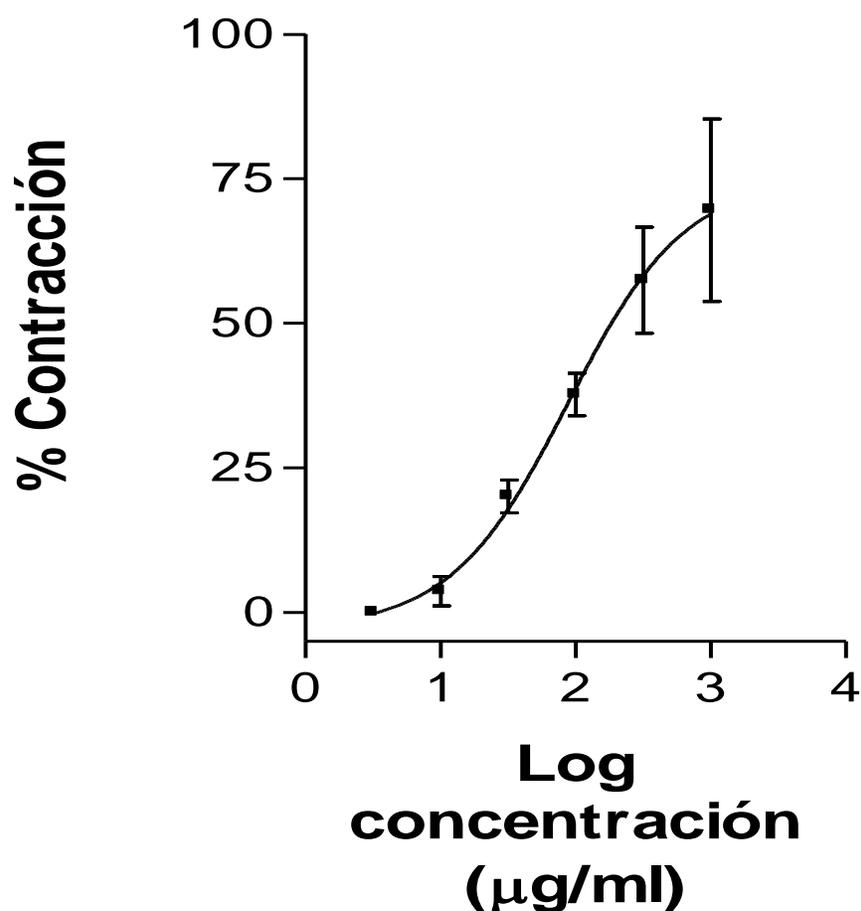
González *et al.* (2012) evaluaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Xenophyllum poposum* (pasto) empleando el método de difusión en agar observando concentraciones mínimas inhibitorias de 0.74 mg/ml para *Escherichia coli* (ATCC 35218 y ATCC 25922), 0.71 mg/ml para *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y de 0.5 mg/ml para *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), en el caso de *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) ésta mostró resistencia al aceite esencial de *X. poposum*. Estos autores mencionan que el aceite esencial de esta especie vegetal está compuesto en un 72.2% por sesquiterpenos como el 6-hidroxitrimetona (14.7%) y trimetona (1.7%). El aceite esencial de hoja de *P. guajava* L. contiene β - cariofileno que también es un sesquiterpeno. Estos datos sugieren que la actividad antimicrobiana observada en este aceite para inhibir a *L. monocytogenes* sea atribuida en parte a este compuesto.

Sin embargo, es importante considerar que para trabajos futuros es necesario realizar un análisis de toxicidad del aceite esencial de las hojas de guayaba y el β - cariofileno, con la finalidad de asegurar su inocuidad como agente antimicrobiano para ser utilizado en alimentos, o bien, para ser empleados en el tratamiento de los desórdenes intestinales relacionados con cuadros de diarrea.

## **7.2 Evaluación farmacológica del aceite esencial de la hoja de *Psidium guajava* L. y de sus componentes mayoritarios con el ensayo de íleo aislado de cobayo**

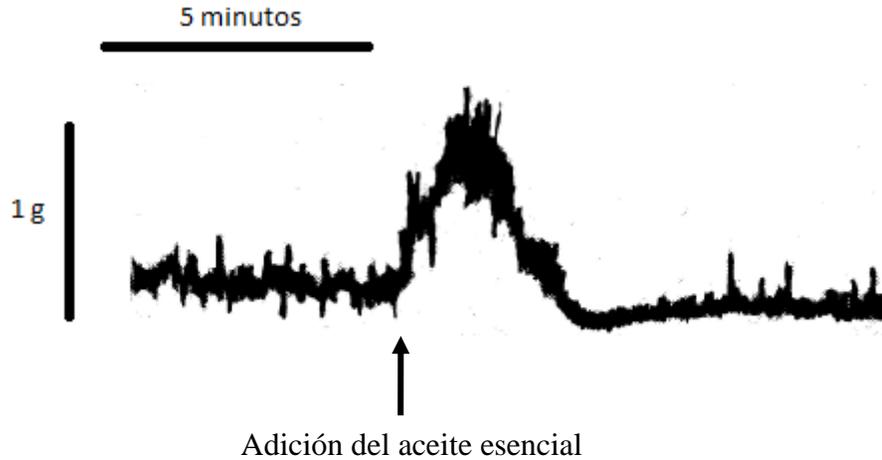
### **7.2.1 Evaluación farmacológica del aceite esencial de hoja de guayaba *Psidium guajava* L.**

Los resultados de las evaluaciones farmacológicas mostraron que el aceite esencial de las hojas de guayaba induce un efecto contráctil sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo (Figura 7.3). En esta figura se observa que el efecto contráctil del aceite esencial de *P. guajava* fue dosis dependiente. Los valores calculados a partir de la curva concentración-respuesta para la concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>) y el efecto máximo (Emax) fueron de 87.76 µg/ml y 70 %, respectivamente.



**Figura 7.3:** Curva concentración-respuesta del efecto contráctil inducido por el aceite esencial de las hojas de *Psidium guajava* L.

Por otra parte, durante la evaluación del efecto contráctil del aceite esencial de *P. guajava* sobre los segmentos de íleon, se observó que el aumento en la motilidad del tejido se manifiesta de manera inmediata a su aplicación y se mantiene durante 4 minutos aproximadamente. Una vez transcurrido este lapso de tiempo, se detectó una disminución en el tono basal y en la amplitud de las contracciones espontáneas del íleon en comparación con las contracciones observadas en el tejido antes de la aplicación del aceite esencial como se muestra en la Figura 7.4. La disminución en el tono y la amplitud de las contracciones espontáneas del íleon no se modificó en las diferentes concentraciones del aceite esencial evaluadas y por esta razón, no fue posible construir una curva concentración-respuesta.



**Figura 7.4:** Registro representativo del efecto contráctil inducido por el aceite esencial de la hoja de *Psidium guajava* L. sobre las contracciones espontáneas de íleo aislado de cobayo a una concentración de 316  $\mu\text{g/ml}$ .

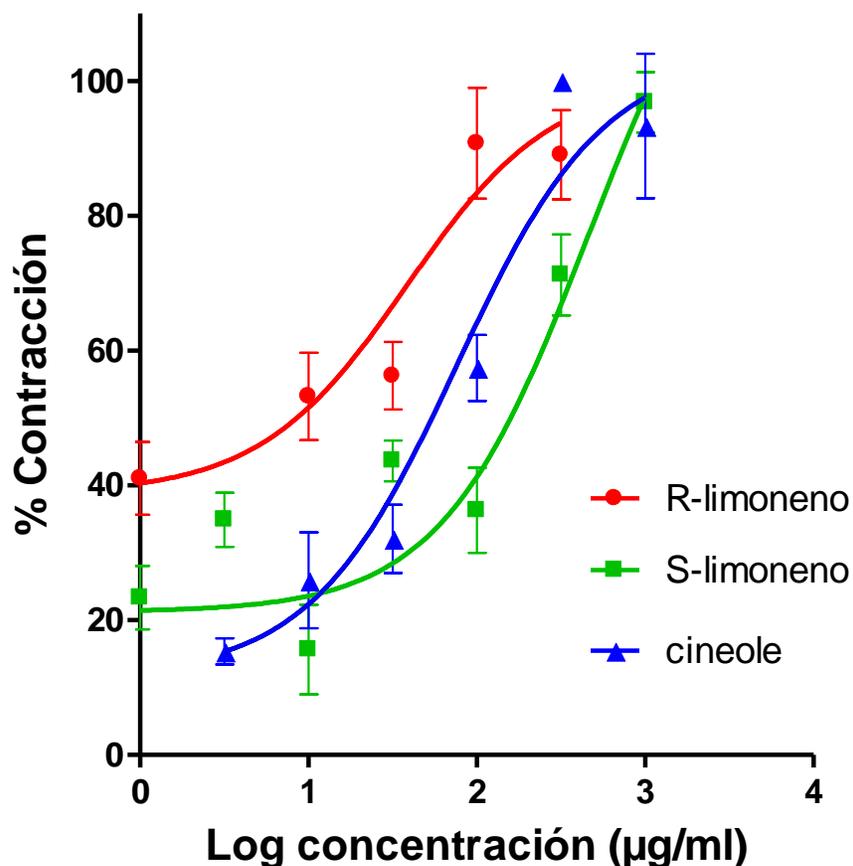
Un efecto similar al observado en este trabajo para el aceite esencial de *P. guajava* fue reportado por Magalhães *et al.* (1998) en el aceite esencial de *Croton nepetaefolius*, el cual aumentó el tránsito intestinal cuando se suministró vía intragástrica en ratones. De la misma manera, en segmentos de colon e íleon aislado de cobayo el aceite esencial de esta especie vegetal disminuyó de manera significativa el tono basal y en menor medida la amplitud de las contracciones espontáneas de ambos tejidos, los valores para la  $\text{CE}_{50}$  se encontraron en el intervalo de 0,9 a 16 y 8 - 150  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Como ya se mencionó anteriormente, la  $\text{CE}_{50}$  para el aceite esencial de *P. guajava* fue de 87.76  $\mu\text{g/ml}$ , la cual se encuentra en el rango de la  $\text{CE}_{50}$  donde se observó un efecto relajante para el aceite esencial de *C. nepetaefolius*. En este contexto, la disminución en el tono muscular y la amplitud en las contracciones de íleon aislado de cobayo inducidas por el aceite esencial de *P. guajava*, que se traducen en una relajación del músculo liso, justifican el empleo de las hojas de esta especie vegetal en la medicina tradicional como un antiespasmódico intestinal. Por otra parte, la disminución en el tono más que la amplitud de las contracciones espontáneas del íleo contribuye a reducir la resistencia al flujo luminal del contenido intestinal (Magalhães *et al.*, 1998).

Los aceites esenciales son mezclas complejas de terpenos (mono y sesquiterpenos) muchos de los cuales han mostrado tener un efecto relajante de la musculatura lisa en diferentes modelos experimentales *in vitro* (íleon aislado de cobayo, íleo aislado de rata, yeyuno aislado de conejo, duodeno de rata, colon de ratón y útero de rata). Se ha reportado que algunos de los componentes de los aceites esenciales responsables de su efecto relajante son el 1,8 cineol (éter monoterpeno) identificado en las especies *P. lactiflora* Peony *C. cassia* Blume, *Ocimum gratissimum*, *Croton nepetaefolus*, *Salvia santolinifolia*, *Salvia hydrangea*, *Salvia mirzayanii* y *Psidium guajava* L., eugenol (compuesto fenólico) aislado de las especies *Ocimum gratissimum*, y *Croton nepetaefolus*, timol identificado en las especies *Thymus membranaceus*, *Lippia sidoides* y *Acalypha phleoides*, carvacrol componente mayoritario de las especies *Satureja hortensis*, *Zingiber roseum* Rosc y *Lippia sidoides*, estragol y anetol identificados en *Croton zehntner*,  $\alpha$  y  $\beta$ -pinenos aislados de las especies *Ferula gummosa*, *Psidium guajava* L., entre otras, terpineol (alcohol monoterpeno) presente en la especie *Croton nepetaefolus*, nonanal presente en la especie *Artemisia ludoviciana*, linalol detectado en la especie (*Lavandula angustifolia*), citral (aldehído monoterpeno) compuesto aislado de *Melissa officinalis*,  $\beta$ -cariofileno (sesquiterpeno bicíclico) aislado de las especies *S. santolinifolia*, *S. hydrangea*, *S. mirzayanii*, *Pterodon polygalaeflorus* y *Plectranthus barbatus* y limoneno (R y S) identificado en *Mentha x villosa*, *Psidium guajava* L., *Salvia santolinifolia*, *Salvia hydrangea* y *Salvia Mirzayanii* (Magalhães *et al.*, 1998; Sadraei *et al.*, 2003; Câmara *et al.*, 2003; Prakasha *et al.*, 2006; Astudillo-Vázquez, 2009; Botelho *et al.*, 2007; Ponce-Montera *et al.*, 2008; Karim *et al.*, 2010; Leonhardt *et al.*, 2010). Las evaluaciones del efecto farmacológico de los aceites esenciales (AE) extraídos de las especies vegetales anteriormente señaladas demostraron que los AE disminuyen la motilidad del músculo liso. Se ha señalado que el mecanismo a través del cual los AE ejercen una relajación en la musculatura lisa es debido principalmente a un efecto inhibitorio sobre el influjo del  $\text{Ca}^{2+}$  desde el fluido extracelular a través de la membrana de las células del músculo liso mediante el bloqueo de los canales de calcio voltaje dependientes. De esta manera, la contracción del músculo liso, la cual es inducida por  $\text{K}^+$  y regulada por los iones de

Ca<sup>2+</sup>, no se lleva a cabo debido a la ausencia de este ión en el citoplasma (Astudillo-Vázquez *et al.*, 2009). Con base en lo anterior, se esperaría que el mecanismo descrito anteriormente sea el responsable del efecto relajante inducido por el aceite esencial de *P. guajava* sobre las contracciones espontáneas del íleo aislado de cobayo.

### **7.2.2 Evaluación farmacológica de los componentes mayoritarios del aceite esencial de la hoja de guayaba *Psidium guajava* L.**

Los resultados de las evaluaciones farmacológicas mostraron que el S-limoneno, el R-limoneno y el cineol inducen un efecto contráctil sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo como se muestra en la Figura 7.5. En esta figura se observa que el efecto contráctil de estos tres compuestos mayoritarios del aceite esencial de *P. guajava* fue dosis dependiente.



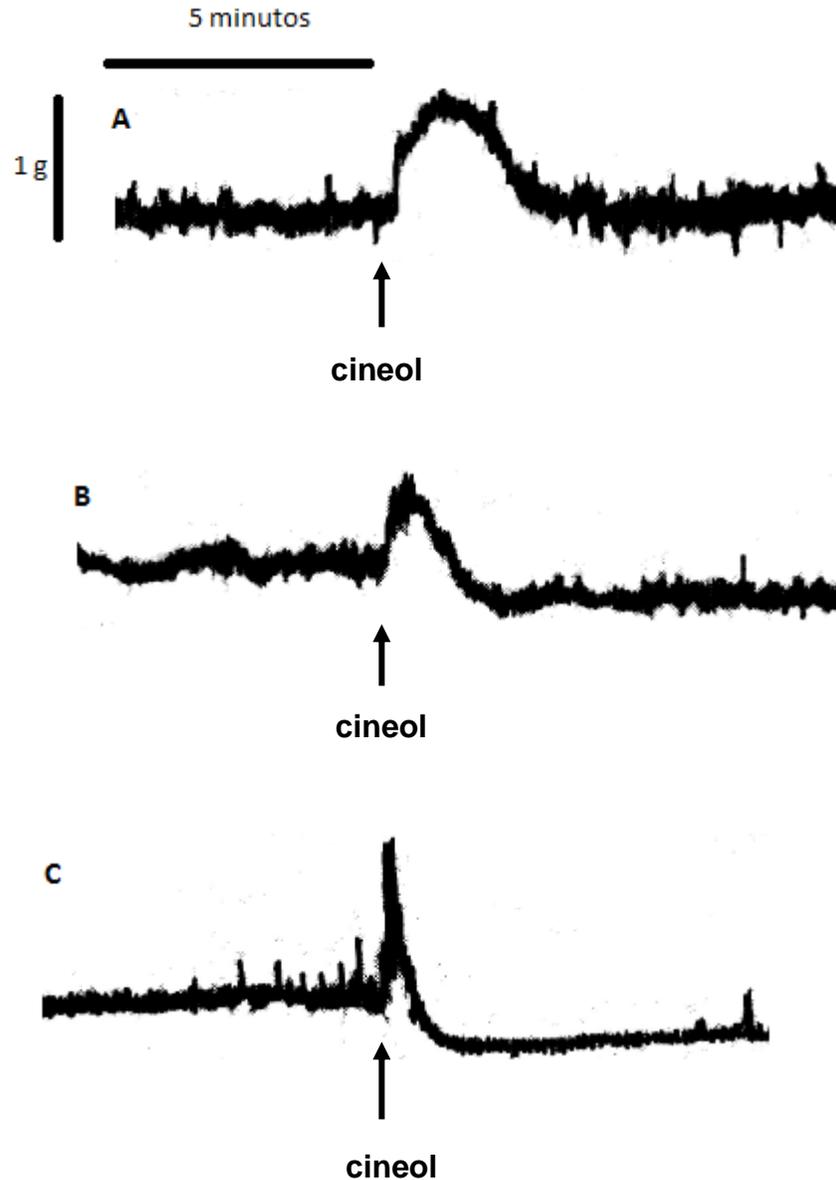
**Figura 7.5:** Curvas concentración-respuesta del efecto contráctil sobre el íleon aislado de cobayo del R-limoneno, S-limoneno y cineol identificados en el aceite esencial de la hoja de guayaba *Psidium guajava* L.

Los valores calculados a partir de la curva concentración-respuesta para la concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) y el efecto máximo ( $E_{max}$ ) se presentan en el Cuadro 7.2.

**Cuadro 7.2.** Valores de la concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) y del efecto máximo ( $E_{max}$ ) contráctil inducido por el R-limoneno, S-limoneno y cineol identificados en el aceite esencial de las hojas de *P. guajava* L.

Compuesto	$CE_{50}$ (µg/ml)	$E_{max}$ (%)
R-limoneno	$38.3 \pm 5.7$	$98.40 \pm 4.6$
S-limoneno	$455.2 \pm 9.3$	$100.0 \pm 1.3$
Cineol	$76.3 \pm 3.0$	$100.0 \pm 3.4$

El cineol es un éter monoterpeno que ha mostrado tener un efecto espasmolítico en el íleo aislado de cobayo al reducir el tono muscular ( $CI_{50} = 322 \mu\text{g/ml}$ ) y bloquear las contracciones inducidas por KCl 60 mM ( $CI_{50} = 419 \mu\text{g/ml}$ ) en este tejido (Magalhães *et al.*, 1998). Así mismo, se ha reportado que este compuesto produce una relajación en las contracciones de útero de rata inducidas por KCl 60 mM ( $CI_{50} = 81.39 \mu\text{g/ml}$ ) (Ponce-Montera *et al.*, 2008) y en las contracciones espontáneas de íleo de ratón ( $IC_{50} = 100 \mu\text{g/ml}$ ) (Lee *et al.*, 2009). Estos datos se contraponen con el efecto contráctil detectado para el cineol en esta investigación. Sin embargo, es importante señalar que si bien el efecto contráctil del cineol fue inmediato y consistente en todas las concentraciones evaluadas, a una concentración de 1000  $\mu\text{g/ml}$  este efecto se mantuvo en el tejido en un rango de 2 a 6 minutos, después de este lapso de tiempo se detectó una inhibición en las contracciones del íleo hasta de un 63.8 % que se conservó durante 2 minutos, en tanto que a una concentración de 10,000  $\mu\text{g/ml}$  el efecto contráctil se manifestó durante 1 minuto y posteriormente, se observó un efecto espasmolítico hasta de un 82.5 %. En la Figura 7.6, se muestra el efecto farmacológico del cineol en el íleon aislado de cobayo a tres concentraciones evaluadas.

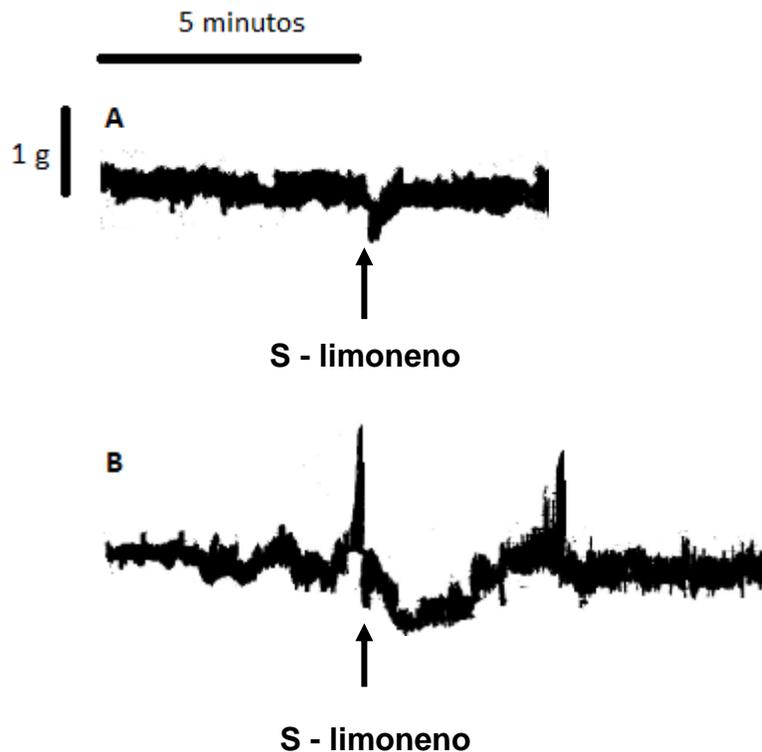


**Figura 7.6.** Registros representativos del efecto contráctil inducido por el cineol sobre las contracciones espontáneas de íleo de cobayo. A) 316  $\mu\text{g/ml}$ , B) 1,000  $\mu\text{g/ml}$  y C) 10,000  $\mu\text{g/ml}$ .

En lo que respecta al R- limoneno y S- limoneno, el primero mostró un efecto contráctil más potente ( $\text{CE}_{50} = 38.3 \mu\text{g/ml}$ ) en comparación con el S-limoneno ( $\text{CE}_{50} = 455.2 \mu\text{g/ml}$ ). En la literatura científica son escasos los trabajos reportados con respecto al efecto farmacológico de ambos isómeros. Uno de estos reportes es el publicado por De Sousa *et al.* (2008), quienes evaluaron la relación entre la

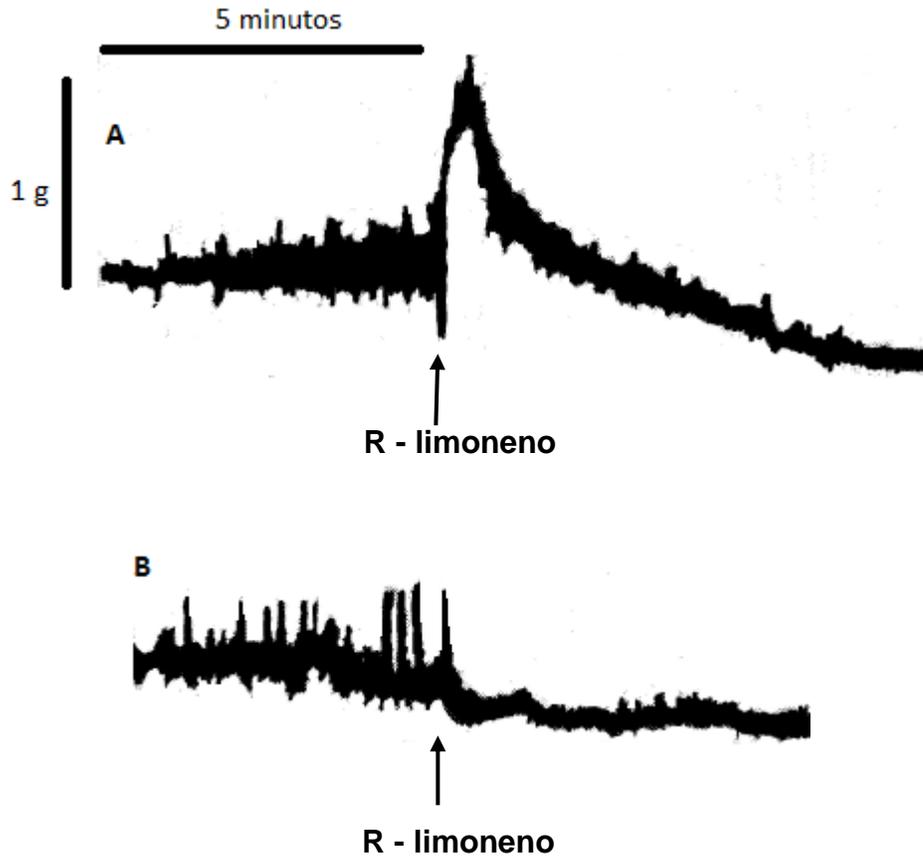
estructura y el efecto espasmolítico de monoterpenos análogos presentes en la especie *Mentha x villosa*. Estos autores señalan que el (+)- limoneno indujo una relajación en las contracciones del íleo aislado de cobayo inducidas por KCl 60 mM; sin embargo, no se especifica el tipo de isómero que corresponde (R-limoneno o S-limoneno). Por otra parte, en este trabajo se menciona que la (-)- carvona (compuesto aislado del aceite de menta verde) indujo un efecto espasmolítico más potente con respecto a la (+)-carvona (compuesto presente en la esencia de la alcaravea). Las diferencias en cuanto al efecto observado entre los enantiómeros de carvona se atribuyen a la influencia de la quiralidad de las moléculas en su actividad farmacológica. En este contexto, los resultados obtenidos en cuanto a la diferencia en la potencia del efecto contráctil del R-limoneno y S-limoneno detectados en esta investigación, concuerdan con lo reportado por De Sousa *et al.* (2008), ya que muestran evidencia de que el arreglo espacial de una molécula bioactiva tiene un efecto directo en sus propiedades farmacológicas.

De manera adicional, resulta importante destacar que el S-limoneno y el R-limoneno denotaron un efecto inhibitorio en las contracciones espontáneas de íleon aislado de cobayo, aunque el efecto contráctil fue el que predominó de manera consistente en todas las concentraciones evaluadas. En el caso del S-limoneno a bajas concentraciones desde 1 hasta 100 µg/ml se detectó una disminución en el tono del músculo liso de manera inmediata a la aplicación del compuesto en un rango desde 31.3 hasta 52 % con una duración de 0.5 minutos. A una concentración de 10,000 µg/ml este efecto relajante se observó un minuto después de la aplicación del compuesto con una disminución en el tono muscular hasta de un 41 % con una duración de 2 minutos como se muestra en la Figura 7.7.



**Figura 7.7.** Registros representativos del efecto contráctil inducido por el S-limoneno sobre las contracciones espontáneas de íleo de cobayo. A) 3.16  $\mu\text{g/ml}$  y B) 10,000  $\mu\text{g/ml}$ ).

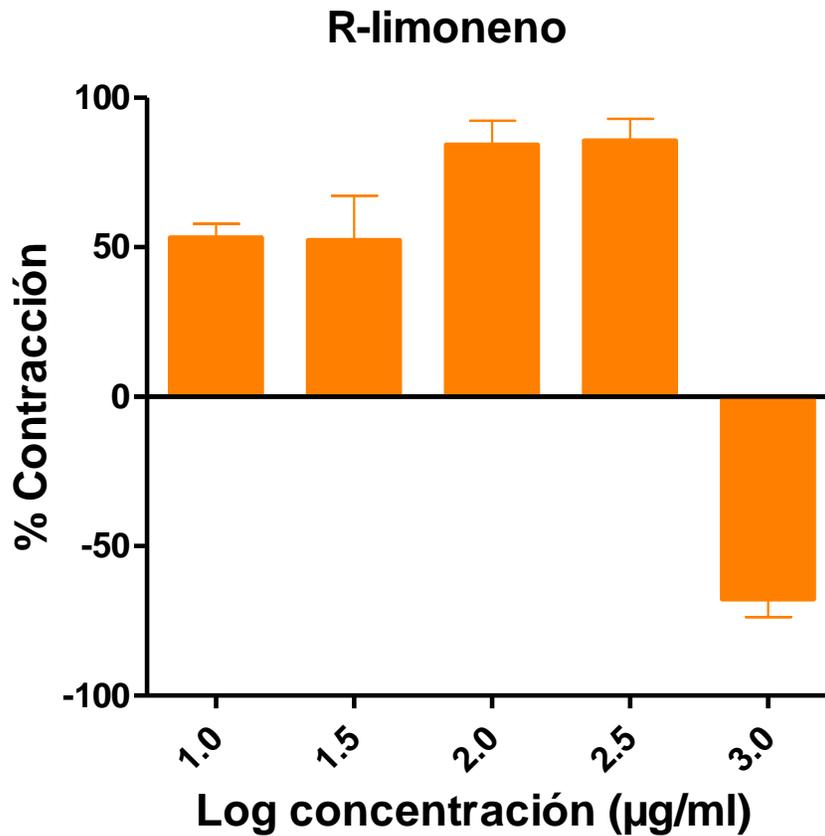
A diferencia del R-limoneno, se observó que hasta una concentración de 300  $\mu\text{g/ml}$  el efecto contráctil inducido por el R-limoneno sobre las contracciones espontáneas del íleo aislado de cobayo se manifestó de manera inmediata a la aplicación del compuesto con una duración de 2 minutos al término de este periodo se detectó una disminución el tono muscular hasta de un 44.6%. Por el contrario, a una concentración de 1000  $\mu\text{g/ml}$  se observó una inhibición en las contracciones del músculo liso intestinal de manera inmediata a la aplicación del compuesto hasta de un 85 % como se muestra en la Figura 7.8.



**Figura 7.8.** Registros representativos del efecto contráctil inducido por el R-limoneno sobre las contracciones espontáneas de íleo de cobayo. A) 300 µg/ml y B) 1,000 µg/ml).

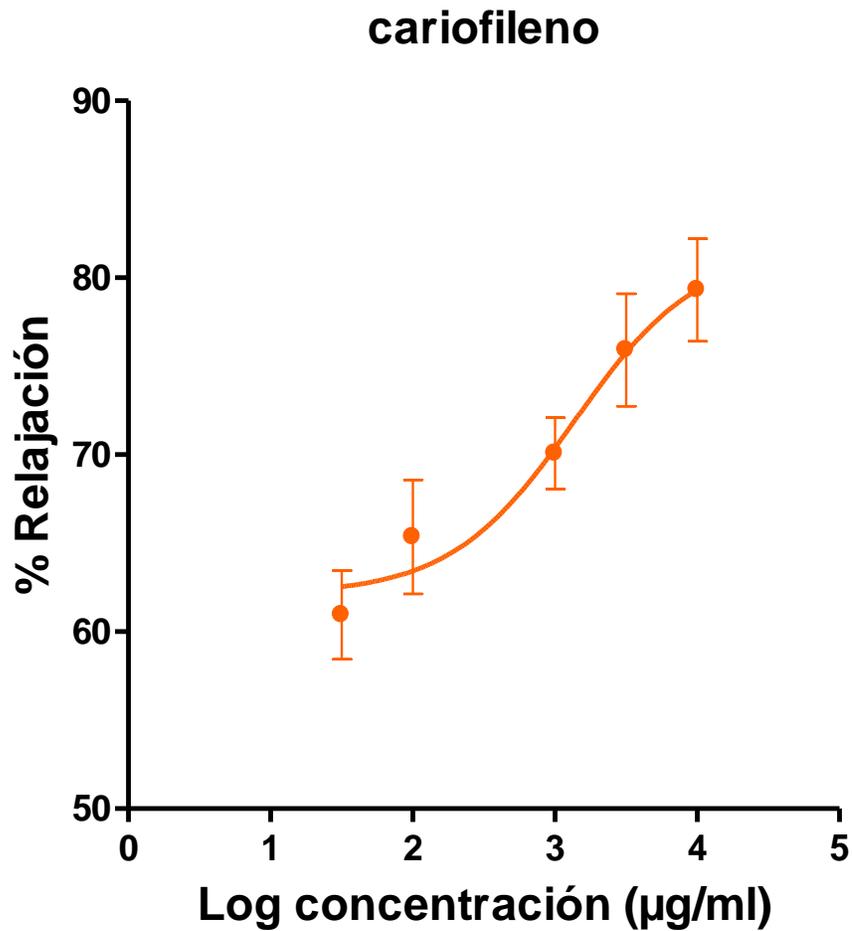
Debido a que el efecto espasmolítico del R-limoneno fue mayor a concentraciones más bajas en comparación al observado para el S-limoneno y cineol, se puede decir que el R-limoneno presenta un efecto farmacológico bifásico (antiespasmódico-espasmogénico) como se muestra en la Figura 7.9.

El efecto bifásico que presentan algunos terpenos como el taraxasteril (triterpenoide) ya ha sido reportado con anterioridad por Ammon *et al.* (2006). Por lo tanto, la dualidad del efecto farmacológico del R-limoneno concuerda con lo reportado en la literatura.



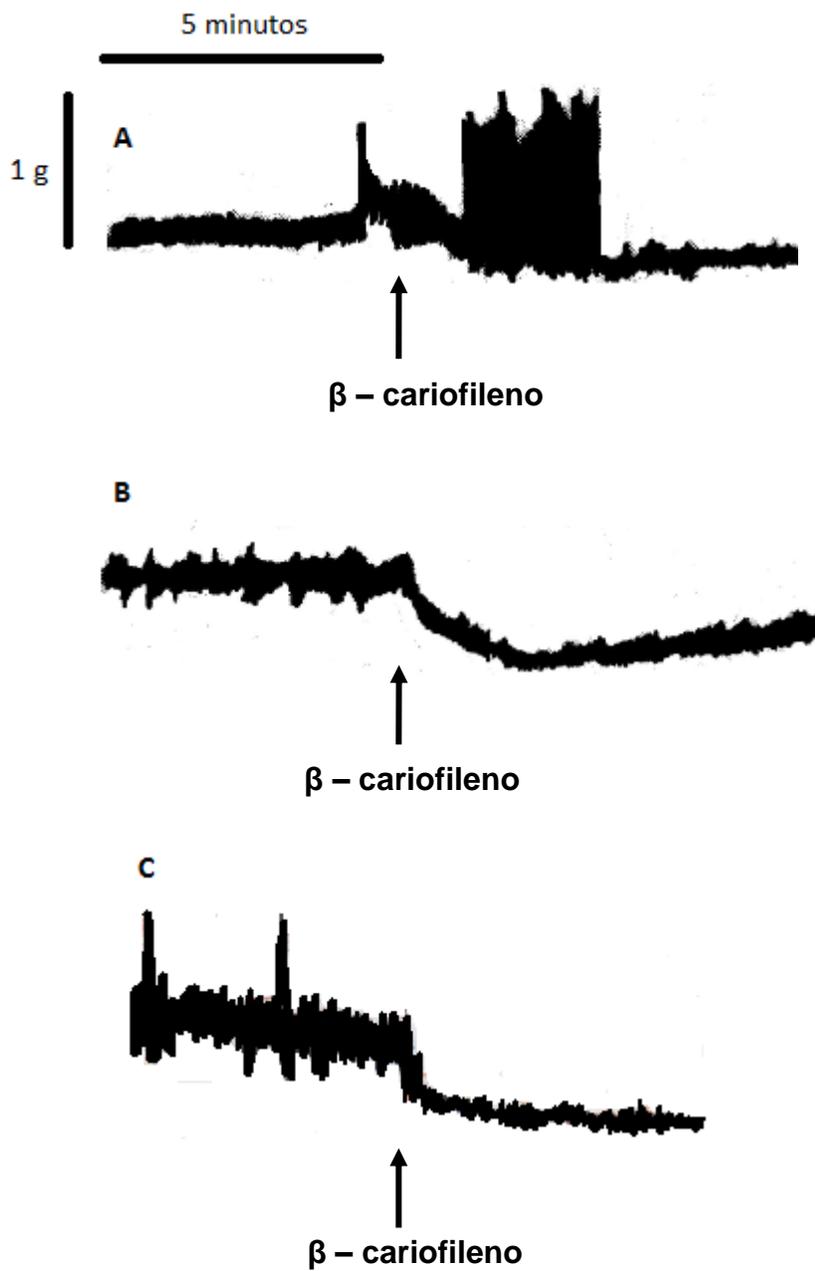
**Figura 7.9.** Efecto contráctil-inhibitorio inducido por R-limoneno sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo.

El  $\beta$ -cariofileno indujo un efecto inhibitorio sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo dependiente de la concentración como se muestra en la Figura 7.10. Los valores calculados a partir de la curva concentración-respuesta para la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) y el efecto máximo ( $E_{max}$ ) fueron de 1365  $\mu\text{g/ml}$  y 81.6 %, respectivamente.



**Figura 7.10:** Curva concentración-respuesta del efecto inhibitorio sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo inducidas por el  $\beta$ -cariofileno identificado en el aceite esencial de la hoja de guayaba *Psidium guajava* L.

El efecto espasmolítico del  $\beta$ -cariofileno sobre las contracciones espontáneas del íleo aislado de cobayo fue consistente en todas las concentraciones evaluadas como se observa en la Figura 7.11.



**Figura 7.11.** Registros representativos del efecto inhibitorio inducido por el  $\beta$ -cariofileno sobre las contracciones espontáneas de íleo de cobayo. A) 100  $\mu\text{g/ml}$ , B) 1,000  $\mu\text{g/ml}$  y C) 10,000  $\mu\text{g/ml}$ ).

El efecto espasmolítico del  $\beta$ -cariofileno sobre las contracciones espontáneas del íleo aislado de cobayo está acorde con la literatura en donde se reporta un efecto relajante de este sesquiterpeno sobre las contracciones en íleo de cobayo ( $CI_{50} = 12.4 \mu\text{g/ml}$ ,  $E_{\text{max}} = 12.4 \%$ ) y en íleo aislado de rata ( $CI_{50} = 17.4 \mu\text{g/ml}$ ) inducidas por acetil colina ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) y sobre las contracciones espontáneas de íleo de rata ( $CI_{50} = 68.65 \mu\text{g/ml}$ ) (Câmara *et al.*, 2003; Leonhardt *et al.*, 2010). No obstante que la  $CI_{50}$  del  $\beta$ -cariofileno obtenida en este estudio fue aproximadamente 20 veces mayor a lo señalado por otros autores, el  $E_{\text{max}}$  observado en este trabajo es significativamente mayor con respecto a lo reportado en la literatura.

## VIII. CONCLUSIONES

El aceite esencial de la hoja de *Psidium guajava* L. y sus componentes mayoritarios únicamente presentaron actividad antimicrobiana para *Listeria monocytogenes* (ATCC 244).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Psidium guajava* L. para *Listeria monocytogenes* (ATCC 244) fue de 50 µg/ml, la cual es significativamente menor a la reportada para el aceite esencial de *T. capitatus* (CMI = 450 µg/ml), *T. herba-barona* (CMI = 225 µg/ml) y *F. angulata* (CMI = 137 – 170 µg/ml). Por consiguiente, el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *P. guajava* para *L. monocytogenes* es mayor con respecto al reportado para los aceites esenciales obtenidos a partir de otras especies vegetales.

La sensibilidad de *L. monocytogenes* al β – cariofileno (CMI= 3.125 µg/ml) fue mayor en comparación con la que este microorganismo presentó ante la nisina cuya CMI ha sido reportada de 200 µg/ml. A su vez, la CMI del β – cariofileno resultó inferior a la CMI del aceite esencial de *P. guajava*. Estos datos sugieren que la actividad antimicrobiana del aceite esencial *P. guajava* para inhibir a *L. monocytogenes* sea atribuida en parte a este compuesto.

La actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Psidium guajava* L. y β – cariofileno sobre *L. monocytogenes* detectada en esta investigación, constituyen un hallazgo importante que no ha sido reportado en la literatura científica.

Las evaluaciones farmacológicas mostraron que el aceite esencial de *P. guajava* y sus componentes mayoritarios S-limoneno, el R-limoneno y el cineol inducen un efecto contráctil sobre las contracciones espontáneas del íleo aislado de cobayo dependiente de la concentración.

El  $\beta$ -cariofileno indujo un efecto inhibitorio sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo dependiente de la concentración, en donde su efecto máximo ( $E_{max} = 81.6 \%$ ) es significativamente mayor con respecto a lo reportado en la literatura.

El efecto espasmolítico del  $\beta$ -cariofileno y la disminución en el tono muscular y la amplitud en las contracciones del íleon aislado de cobayo inducidas por el aceite esencial de *P. guajava*, el S-limoneno, R-limoneno y cineol, justifican el empleo de las hojas de esta especie vegetal en la medicina tradicional como un antiespasmódico intestinal.

Las evaluaciones de la actividad antimicrobiana y farmacológica del aceite esencial y de sus componentes mayoritarios obtenidos a partir de las hojas de *P. guajava* que se derivan de este trabajo, contribuyen a validar el empleo etnomédico de esta especie vegetal para el tratamiento de los denominados desórdenes gastrointestinales.

## IX. REFERENCIAS

Abreu, P., Almeida, M., Bernardo, R., Bernardo, L., Brito, L., García, E., Fonseca, A. and Bernardo-Filho, M. (2006). Guava extract (*Psidium guajava*) alters the labelling of blood constituents with technetium-99m. *Journal of Zhejiang University Science*. 7(6): 429–435.

Ahn, S. and Phillips, A.G. (2003). Independent modulation of basal and feeding-evoked dopamine efflux in the nucleus accumbens and medial prefrontal cortex by the central and basolateral amygdalar nuclei in the rat. *Neuroscience*. 116(1): 295-305.

Akerele, O. (1987). WHO's Traditional Medicine Programme: progress and perspectives. *WHO Chronicle*. 38(2): 76-81.

Alam, N.H. and Ashraf, H. (2003). Treatment of infectious diarrhea in children. *Pediatric Drugs*. 5 (3): 151–65.

Ammon, H.P.T., Kelber, O., Okpanyi, S.N. (2006). Spasmolytic and tonic effect of Iberogast® (STW 5) in intestinal smooth muscle. *Phytomedicine*. 13: 6-4.

Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48 (Suppl. 1): 5-16.

Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S. and Cabras, P. (2006). Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 4364–4370.

Astudillo-Vázquez, A., Mata, R. y Navarrete, A. (2009). El reino vegetal, fuente de agentes antiespasmódicos. *Revista Latinoamericana de Química*. 37(1): 7-20.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 446-475.

Balows, A. (1970). *Manual of Clinical Microbiology*. Cap. 111. En: Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. Fifth edition. Ed. ASM. American society for microbiology. Washington D.C. 1120-1123.

Bassolé, I.H., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Tirogo, S., Franz, C., Novak, J., Nebié, R.C., and Dicko, M. (2010). Composition and Antimicrobial Activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. Essential Oils and Their Major Monoterpene Alcohols Alone and in Combination. *Molecules*. 15, 7825-7839

Bartoo, A.C., Sprunger, L.K. and Schneider, D.A. (2005). Expression and distribution of TTX-sensitive sodium channel alpha subunits in the enteric nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*. 486(2): 117-131.

Begum, S., Hassan, S.I., Siddiqui, B.S., Shaheen, F., Ghayur, M.N. and Gilani, A.H. (2002). Triterpenoids from the leaves of *Psidium guajava*. *Phytochemistry*. 61: 399-403.

Belemtougri, R., Constantin, B., Cognard, C., Raymond, G., Sawadogo, L. and Zhejiang, J. (2006). Effects of two medicinal plants *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) and *Diospyros mespiliformis* L. (Ebenaceae) leaf extracts on rat skeletal muscle cells in primary culture. *Journal of Zhejiang University Science*. 7(1): 56-63.

Betts, T.J. (2001). Chemical characterization of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases, *Journal of Chromatography*. 936: 33-46.

Bille, J. (1990). Epidemiology of human listeriosis in Europe with special reference to the Swiss outbreak. En: Foodborne listeriosis. Ed. Miller, Smith & Somkuti. 71-74.

Botelho, M.A., Nogueira, N.A., Bastos, G.M., Fonseca, S.G., Lemos, T.L., Matos, F.J., Montenegro, D., Heukelbach, J., Rao, V.S., and Brito, G.A. (2007). Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 40: 349-356.

Bowles, E.J. (2003). Chemistry of Aromatherapeutic Oils. Allen & Unwin. ISBN 174114051X.

Brookes, S.J. (2001). Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *Anatomical records*. 262: 58-60.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*. 94: 223-253.

Caldhas Magalhaes, P.J., Lahlou, S., Jucá, D.M., Coelho-de-Souza, L.N., Tibúrcio da Frota, P.T., Gurgel da Costa, A.M. and Leal-Cardoso, J.H. (2008). Vasorelaxation induced by the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents in rat aorta are partially mediated by the endothelium. *Fundamentals of Clinical Pharmacology*. 22: 169-177.

Câmara, C.C., Nascimento, N.R., Macêdo-Filho, C.L., Almeida, F.B., Fonteles, M.C. (2003). Antispasmodic effect of the essential oil of *Plectranthus barbatus* and some major constituents on the guinea-pig ileum. *Planta Medica*. 69(12):1080-5.

Canillac, N. and Mourey, A. (2001). Antibacterial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Letters in Applied Microbiology*. 16: 49-55.

Carson, C.F., Hammer, K.A. and Riley, T.V. (1995). Broth microdilution method for determining the susceptibility of *E. coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca aalternifolia* (tea tree oil). *Microbios* 82: 181-185.

Carson, C.F., Riley, T.V. (1995). Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*. 78: 264–269.

Carson, C.F., Mee, B.J. and Riley, T.V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46: 1914–1920.

Chah, K., Eze, A., Emuelosi, C. and Esimone, C. (2006). Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some nigerian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 104: 164-167.

Charpentier, E. and Courvalin, P. (1999). Antibiotic Resistance in *Listeria spp.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43(9): 2103-2108.

Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., Palmas, F. (1999). *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*. 29: 130–135.

Costa, M., Brookes, S. and Henning, G. W. (2000). Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut*. 47(4): 15-19.

Costa, B., Giagnoni, G., Franke, C., Trovato, A.E. and Colleoni, M. (2004a). Vanilloid.TRPV1 receptor mediates the antihyperalgesic effect of the nonpsychoactive cannabinoid, cannabidiol, in a rat model of acute inflammation. *Brithish Journal of Pharmacology*. 143(2): 247-250.

Costa, J., Evangelista, T., Conceição, I. and de Carvalho, M. (2004b). Repetitive nerve stimulation in myasthenia gravis--relative sensitivity of different muscles. *Clinical Neurophysiology*. 115(12): 2776-2782.

Cravioto, A., Trujillo, F., León, L.A., Hernández, J.M. y Esclava, C. (1996). Infections caused by enter pathogenic *E. coli*. *Gaceta Médica de México*. 132(6): 611-615.

Crespo, M.P., Vélez, J.D., Castañeda, C., Hoyos, F., López, M. y Salazar, J.C. (1999). Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en un hospital de tercer nivel. *Colombia Médica*. 30(2): 89-98.

Croteau, R., Kutchan, T.M. and Lewis, N.G. (2000). Natural products (secondary metabolites). En: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists. Ed. Buchanan B., Grissem W. y Jones R.

Curtis, M.L., Franceschi, O. y De Castro, N. (2002). *Listeria* en vegetales mínimamente procesados. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 52(3): 282-288.

Daferera, D.J., Ziogas, B.N. and M.G. Polissiou. (2000). GC-MS analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 2576-2581.

Dakkappa-Shruthi, S., Roshan, A., Shar-aTimilsina, S. and Sunita, S. (2013). A review on the medicinal plant *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae). *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*. 3(2): 162-168.

De Sousa, D., Genival, A.S., Junior, L.N., Andrade, F.R., Calasans, X.P., Nunes, J.M., Barbosa, F. and Batista, J.S. (2008). Structure and Spasmolytic Activity Relationships of Monoterpene Analogues Found in Many Aromatic Plants. *Zeitschrift für Naturforschung. A Journal of Biosciences*. 63: 808-812.

De Sousa, A., Gomez, P., Saldaña, A., Rufino Maiaa, A., Prata de Souza, E. and Sampaio-Assreuya, A.M. (2010). Antispasmodic effect of *Mentha piperita* essential oil on tracheal smooth muscle of rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 130(2): 433-436.

Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G. and Mauriello, G. (2006). Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 2745–2749.

Donaldson, J. and Hill, S.J. (1986). Selective enhancement of histamine H1-receptor responses in guinea-pig ileal smooth muscle by 1,4-dithiothreitol. *British Journal of Pharmacology*. 87(1): 191-199.

Eglen, R.M., Hegde, S.S. and Watson, N. (1996). Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. Review. *Pharmacology Reviews*. 48(4): 531-565.

El-Massry, K.F., El-Ghorab, A.H., Shaaban, H.A. and Shibamoto, T. (2009). Chemical composition and antioxidant/ antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 5265-5270.

Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Resultados Nacionales. (2012). Encontrado en: <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>.

Fields, R.D. and Lancaster, M.V. (1993). Dual-attribute continuous monitoring of cell proliferation/cytotoxicity. *American Biotechnology Laboratory Journal* Seek. 11: 48-50.

Furness, J.B., Costa, M., Rökaeus, A., McDonald, T.J. and Brooks, B. (1987). Galanin-immunoreactive neurons in the guinea-pig small intestine: their projections and relationships to other enteric neurons. *Cell Tissue Research*. 250(3): 607-615.

Furness, J.B., Kunze, W.A., Bertrand, P.P., Clerc, N. and Bornstein, J.C. (1998). Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. Review. *Progress in Neurobiology Journal*. 54(1):1-18.

Furness, J.B. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 81: 87-96.

Furness, J.B., Kearney, K., Robbins, H.L., Hunne, B., Selmer, I.S., Neylon, C.B., Chen, M.X. and Tjandra, J.J. (2004). Intermediate conductance potassium (IK) channels occur in human enteric neurons. *Autonomic Neuroscience*. 112(1-2): 93-97.

Galligan, J.J., Le Pard, K.J., Schneider, D.A. and Zhou, X. (2000). Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 81: 97-103.

Garrido, F., Borges, G., Cárdenas, V., Bobadilla, J.L., Ibarra, J. y Ruiz-Matus, C. (1990). Mortalidad Postneonatal por diarreas: un estudio de casos y controles. *Salud Pública de México*. 32(3): 261-268.

Gershon, M.D. (2005). Nerves, reflexes, and the enteric nervous system: pathogenesis of the irritable bowel syndrome. Review. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 39(5:3): 184-193.

Gloeckner, H., Jonuleit, T. and Lemke, H.D. (2001). Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue. *Journal of Immunological Methods*. 252: 131-138.

Gonçalves, F., Andrade, M., Bezerra, J., Macrae, A., De Sousa, O., Fonteles-filho, A. and Vieira, R. (2008). Antibacterial activity of guava, *Psidium guajava* Linnaeus, leaf extracts on diarrhea-causing enteric bacteria isolated from seabob shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (heller). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 50(1): 11-15.

González, A. M., Tracann, M. I., Amani S. M., Schuff C., Poch, M. J., Bach, H., Catalán, C. A. N. 2012. Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Properties of the Volatile Oil and Methanol Extract of *Xenophyllum poposum*. *Natural Products Communications*. 7(12): 1663-1666.

Grider, J.R. and Jin, J.G. (1994). Distinct populations of sensory neurons mediate the peristaltic reflex elicited by muscle stretch and mucosal stimulation. *Journal of Neuroscience*. 14(5:1): 2854-2860.

Grundy, D. and Schemann, M. (2006). Enteric nervous system. *Current opinion in gastroenterology*. 22(2): 102-110.

Hasler, W.L., Soudah, H.C. and Owyang, C. (1994). Somatostatin analog inhibits afferent response to rectal distention in diarrhea-predominant irritable bowel patients. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 268(3): 1206-1211.

Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I. Smid, E.J., Gorris, L.G.M. and Von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 3590–3595.

Hill, J.M., Alewood, P.F. and Craik, D.J. (1997). Solution structure of the sodium channel antagonist conotoxin GS: a new molecular caliper for probing sodium channel geometry. *Structure*. 5(4): 571-583.

Hof, H., Nichterlein, T. and Kretschmar, M. (1997). Management of listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 10(2): 345-357.

Iscan, G., Kirimer, N., Kurkcüoğlu, M., Arabacı, T., Küpelli, E., Can, K. and Baser, H. (2006). Biological activity and composition of the essential oil of *Achillea schischkinii* sosn. and *Achillea aleppica* DC. *Subsp. aleppica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 170-173.

Iwu, M. M. (1993). Handbook of African Medicinal Plants. CRC Press. 786–789.

Joseph, B., Priya, R.M., Helen, P.A. and Sujatha, S. (2010). Bio-active compounds in essential oil and its effects of antimicrobial, cytotoxic activity from the *Psidium guajava* (L.) leaf. *Journal of Biotechnology Advances*. 9:10-14.

Kalembe, D. and Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10: 813-829.

Karim, A., Berrabah, M., Mekhfi, H., Ziyat, A., Legssyer, A., Bouali, A., Habul, B., Amrani, S. and Aziz, M. (2010). Effect of essential oil of *Anthemis mauritiana* Maire & Sennen flowers on intestinal smooth muscle contractility. *Journal of Smooth Muscle Research*. 46(1): 65-75.

Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H. and Weis, N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components, *Journal of Essential Oil Research*. 1: 119–128.

Kreiss, C., Toegel, S. and Bauer, A.J. (2004). Alpha2-adrenergic regulation of NO production alters postoperative intestinal smooth muscle dysfunction in rodents. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 287(3): 658-666.

Kunze, W.A., Clerc, N., Bertrand, P.P. and Furness, J.B. (1999). Contractile activity in intestinal muscle evokes action potential discharge in guinea-pig myenteric neurons. *The Journal of Physiology*. 517 ( 2): 547-561.

Lambert, R.J., Skandamis, P.N., Coote, P., Nychas, G.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.

Lara, O.F. y Márquez, A.C. (1996). Plantas Medicinales de México. Composición, Usos y Actividad Biológica. UNAM. México, D.F. 137–139.

Lee, J.Y., Kang, H.S., Park, B.E., Moon, H.J., Sim, S.S., Kim, C.J. (2009). Inhibitory effects of Geijigajakyak-Tang on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Journal of Ethnopharmacology*.126(2): 244-251.

Leonhardt, V., Leal-Cardoso, J.H., Lahlou, S., Albuquerque, A.A., Porto R.S., Celedônio, N.R., Oliveira, A.C. Pereira, R.F., Silva, L.P., Garcia-Teófilo, T.M., Silva, A.P., Magalhães, P.J., Duarte, G.P., Coelho-de-Souza, A.N. (2010). Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* and its main constituent  $\beta$ -caryophyllene on rat isolated ileum. *Fundamentals of Clinical Pharmacology*. 24(6):749-58.

Leung, Y.L., Beredjikian, P.K., Donthineni-Rao, R. and Bozentka, D.J. (2003). Neuropathic arthropathy of the digit: a case report. *American Journal of Hand Surgery*. 28(2): 323-326.

Leverentz, B., Conway, W.S., Camp, M.J., Janisiewick, W.J., Abuladze, T., Yang, M., Saftnor, R. and Sulakvelidze, A. (2003). Biocontrol of *Listeria* on Fresh Cut Produce by Treatment with Lytic Bacteriophages and Bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(8): 4519-4526.

Levinson, W. (2004). Microbiología e Inmunología Médicas. Cap. 5. En: Clasificación de Bacterias de Importancia Médica., Cap. 6. En: Flora Normal y Cap. 7. En: Patogenia. 8ª. Edición. Editorial Mc Graw Hill – Interamericana. 29-30, 32 y 40.

Li, J., Chen, F. and Luo, J. (1999). GC–MS analysis of essential oil from the leaves of *Psidium guajava*. *Zhong Yao Cai*. 22: 78–80.

Liu, M., Geddis, M.S., Wen, Y., Setlik, W. and Gershon, M.D. (2005). Expression and function of 5-HT4 receptors in the mouse enteric nervous system. *American Journal of Physiology and Gastrointestinal Liver Physiology*. 289(6): 1148-1163.

Lozoya, X., Meckes, M., Abou-Zaid, M., Tortoriello, J., Nozzolillo, C., Arnason, J.T. 1994. Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of a spasmolytic principle. *Archives of Medical Research*. 25(1):11-5.

Luna-Herrera, J., Costa, M., González, H., Rodríguez, A., Castillo, P. (2007). "Synergistic antimycobacterial activities of sesquiterpene lactones from *Laurus* spp". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 59: 548–552.

Madeira, S.V., Rabelo, M., Soares, P.M., Souza, E.P., Meireles, A.V., Montenegro, C., Lima, R.F., Assreuy, A.M., and Criddle, D.N. (2005). Temporal variation of chemical composition and relaxant action of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) on guinea-pig ileum. *Phytomedicine*.12(6-7):506-9.

Martínez, J.M. y Beltrán, M.C. (1999). Estudios sobre la flora medicinal y condimenticia de Cuba. *Revista de Agricultura Orgánica*. (CU) 1 Abril. 5-9.

Martínez, G.E. (2002). Listeria. Agentes patógenos transmitidos por alimentos. *Journal of Food Microbiology*. 1: 263-304.

Martínez, I., Rorvik, L.M., Brox, V., Lassen, J., Seppola, M. and Gram L. (2003). Genetic variability among isolates of *Listeria monocytogenes* from food products, clinical samples and processing environments, estimated by RAPD typing. *Journal of Food Microbiology*. 84: 285-297.

Masotti V., Juteau F., Bessière J.M., Viano J. (2003). Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 7115–7121.

Mathison, R., Ho, W., Pittman, Q.J., Davison, J.S. and Sharkey, K.A. (2004). Effects of cannabinoid receptor-2 activation on accelerated gastrointestinal transit in lipopolysaccharide-treated rats. *British Journal of Pharmacology*. 142(8):1247-1254.

Magalhães, P., Criddle, D.N., Tavares, R.A., Melo, E. M., Mota, T. L., Leal-Cardoso, J. H. (1998). Intestinal Myorelaxant and Antispasmodic Effects of the Essential Oil of *Croton nepetaefolius* and its Constituents Cineole, Methyl-eugenol and Terpeneol. *Phytotherapy Research*. 12: 172–177.

Morin, J.; Malhuret, R. and Bastide, P. (1983). Aromatherapy. *Pharmacie Hospitaliere Francaise*, 63: 23-28.

National Committee for Clinical Laboratory Standards Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility tests for Bacterial That Grow Aerobically. (1993). Approved Standard. M7-A3 National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.

Nisha, K., Darshana, M., Madhu, G. and Bhupendra, M. (2011). GC-MS Analysis and anti-microbial activity of *Psidium Guajava* (leaves) grown in Malva region of India. *International Journal of Drug Development & Research*. 3(4): 237 – 245.

Núñez-Rivas, M.J. 2003. Metabolitos secundarios bioactivos aislados de *Maytenus chiapensis* y *Crossopetalum uragoga* (Celastraceae). Tesis doctoral. Universidad de la Laguna. Canarias, España.

Obaid, A.L., Nelson, M.E., Lindstrom, J. and Salzberg, B.M. (2005). Optical studies of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in guinea-pig enteric nervous system. *The Journal of Experimental Biology*. 208(15): 2981-3001.

O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. and Pognan, F. (2000). Investigation of the AB (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*. 267: 5421-5426.

Oliver-Bever, B., 1986. Medicinal Plants in tropical West Africa. Cambridge University Press, Cambridge. 457–461.

OMS (Organización Mundial de la Salud). (2002). Informe sobre la salud en el mundo 2002.

OMS (Organización Mundial de la Salud). (2007). Manual Sobre las Cinco Claves para la Inocuidad de los Alimentos. Departamento de Inocuidad de los Alimentos, Zoonosis y Enfermedades de Transmisión Alimentaria. Ediciones de la OMS. Francia. 4.

Oussalah, M., Caillet, S., Lacroix, M., (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 69: 1046–1055.

Page, K.M., Heblich, F., Davies, A., Butcher, A.J., Leroy, J., Bertaso, F., Pratt, W.S. and Dolphin, A.C. (2004). Dominant-negative calcium channel suppression by truncated constructs involves a kinase implicated in the unfolded protein response. *Journal of Neuroscience Methods*. 24(23): 5400-5409.

Pelaia, G., Gallelli, L., Vatrella, A., Grembiale, R.D., Maselli, R., De Sarro, G.B. and Marsico, S.A. (2002). Potential role of potassium channel openers in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Life Science*. 70: 977–990.

Pérez-Gutiérrez, R.M. Mitchell, S. and Vargas-Solis, R. (2008). *Psidium guajava*: A review of its traditional uses phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 117: 1-27.

Pettit, R., Weber, C. and Pettit, G. (2009). Application of a high throughput Alamar blue biofilm susceptibility assay to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Annals of Clinical Microbiology and antimicrobials*. 8:28.

Pichersky E., Noel J.P., Dudareva N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*. 311: 808–811.

Pinho-da-Silvaa, L., Mendes-Maiaa, P.V., do Nascimento Garciaa, T.M., Cruzb, J.S., de Moraisc, S.M., Coelho-de-Souzaa, A.N., Lahloua, S., Leal-Cardosoa, J.H. (2010). *Croton sonderianus* essential oil samples distinctly affect rat airway smooth muscle. *Phytomedicine*. 17(10): 721-725.

Pinto, N.V., Assreuy, A.M.S., Coelho-de-Souza, A.N., Cecatto, V.M., Magalhaes, P.J., Lahlou, S. and Leal-Cardoso, J.H. (2009). Endothelium dependent vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Alpinia zerumbet* and its main constituent 1,8-cineole in rats. *Phytomedicine*. 16(12): 1151-1155.

Ponce-Montera, H., Campos, M.G., Pérez, S., Pérez, C., Zavala, M., Macías, A., Oropeza, M., Cárdenas, N. (2008). Chemical composition and antispasmodic effect of *Casimiroa pringlei* essential oil on rat uterus. *Fitoterapia*. 79(6): 446-450.

Porcher, C., Horowitz, B., Ward, S.M. and Sanders, K.M. (2004). Constitutive and functional expression of cyclooxygenase 2 in the murine proximal colon. *Journal of Neurogastroenterology Motility*. 16(6): 785-799.

Prakasha, O., Kasana, V.K., Pant, A.K., Zafar, A. Hore, S.K., Mathela, C.S. (2006). Phytochemical composition of essential oil from seeds of *Zingiber roseum* Rosc and its antispasmodic activity in rat duodenum. *Journal of Ethnopharmacology*. 106(3): 344-347.

Rey, J. R. (2007). Emerging Infectious Diseases. Entomology and Nematology Department. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida. Publication date: May, 2007.

Ríos, C., Salazar, C., Cardona, C., Victoria, K., Torres M. (1977). Guayaba. En: Frutales. Instituto Colombiano Agropecuario. Manual de Asistencia Técnica No. 4., Segunda Edición. Bogotá, Colombia. 221–248.

Rojas, A., Bah, M., Rojas, J.I., Serrano, V. and Pacheco, S. (1999). Spasmolytic activity of some plants used by the Otomi Indians of Queretaro (Mexico) for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytomedicine*, Vol. 6(5): 367-371.

Rojas, A., Torres, M., Rojas, J.I., Feregrino, A., Heimer-de la Cotera, E. (2002). Calcium-dependent smooth muscle excitatory effect elicited by the venom of the hydrocoral *Millepora complanata*. *Toxicon*. 40: 777-785.

Sacchetti, G., Medici, A., Maietti, S., Radice, M., Muzzoli, M., Manfredini, S., Braccioli, E. and Bruni, R. (2004). Composition and functional properties of the essential oil of Amazonian basil, *Ocimum micranthum* Willd., *Labiatae* in comparison with commercial essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 3486-3491.

Sadraei, H., Ghannadib, A., Malekshahia, K. (2003). Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. *Phytotherapy*. 74(5): 445-452.

Samuelsson B. (1991). Arachidonic acid metabolism: role in inflammation. Review. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 50 | 1: 3-6.

Schneider, K.R., Goodrich, R.M. and Waithe, S.Z. (2003). Preventing Foodborne Illness: Salmonellosis. University of Florida: EDIS/IFAS.

Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 269: 8022–8028.

Silva J., Abebe W., Sousa S.M., Duarte V.G., Machado M.I.L., Matos F.J.A. (2003). Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 89: 277–283.

Singh, G., Marimuthu, P., de Heluani, C.S. and Catalan, C.A. (2006). Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (seed) essential oil, oleoresin, and their selected components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 174–181.

Singewald, N. and Sharp, T. (2000). Neuroanatomical targets of anxiogenic drugs in the hindbrain as revealed by Fos immunocytochemistry. *Neuroscience*. 98(4): 759-770.

Smith-Palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Food Microbiology*. 26: 118-122.

Smith, J., and Nigel, H. (1992). Tropical Forests and their Crops. Cornell University Press, London.

Southwick, F.S. and Purich, D.L. (1996). Intracellular Pathogenesis of Listeriosis. *The New England Journal of Medicine*. 334(12): 770-776.

Stone, B. (1970). The flora of Guam. *Micronesica*. 6: 454–455.

Taché, Y. (2004). Corticotropin releasing factor receptor antagonists: potential future therapy in gastroenterology? *Gut BMJ Journals*. 53(7): 919-921.

Taran M, Ghasempour HR, Shirinpour E. (2010). Antimicrobial activity of essential oils of *Ferulago angulata* subsp. *carduchorum*. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 3(1): 10-14.

Tenover, F.C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Medicine*. 119: 3-10.

Tonini, M., Vicini, R., Cervio, E., de Ponti, F., de Giorgio, R., Barbara, G., Stanghellini, V., Dellabianca, A. and Sternini, C. (2005). 5-HT<sub>7</sub> receptors modulate peristalsis and accommodation in the guinea pig ileum. *Gastroenterology*. 129(5): 1557-1566.

Turina, A.V., Nolan, M.V., Zygadlo J.A., Perillo, M.A. (2006). Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry*. 122: 101–113.

Ubilluz R. (1993). Advances in gastrointestinal peptides: somatostatin. Review Spanish. *Revista de Gastroenterología del Perú*. 13(3): 178-185.

Ultee, A., Kets, E.P., Alberda, M., Hoekstra, F.A., Smid, E.J., (2000). Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol, *Archives of Microbiology*. 174: 233–238.

Ultee, A., Bennik, M.H., Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 1561–1568.

Vargas, A.D., Soto, H.M., Gonzalez, H.V.A., Engleman, E.M., Martinez, G.A., 2006. Kinetics of accumulation and distribution of flavonoids in guava (*Psidium guajava*). *Agrociencia*. 40: 109–115.

Walter, F.S. (2000). Foodborne Listeriosis. Division of Infectious Diseases. *Clinical Infectious Diseases*. 31: 770-775.

Wendakoon, C.N., Sakaguchi, M. (1993). Combined effect of sodium chloride and clove on and biogenic amine formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract. *Journal of Food Protection*. 56: 410–413.

Wilson, M.E. (2000). Environmental Change and Infectious. *Diseases. Ecosystem Health*. 6: 7-12.

Wilson M.E. (2005). "Diarrhea in nontravelers: risk and etiology". *Clinical Infectious Diseases*. 41(8): 541–546.

World Health Organization. (2001). Stop TB annual report 2001. Forging new partnerships to stop TB. *Geneva: WHO*: 3-11.

Xiang, Z. and Burnstock, G. (2005). Distribution of P2Y2 receptors in the guinea pig enteric nervous system and its coexistence with P2X2 and P2X3 receptors, neuropeptide Y, nitric oxide synthase and calretinin. *Histochemistry and Cell Biology*. 124(5): 379-390.

Yanaga, A., Gotto, H., Nakagawa, T., Hikiami, H., Shibahara, N. and Shimada, Y. (2006). Cinnamaldehyde induces endothelium-dependent and independent vasorelaxant action on isolated rat aorta. *Biological Pharmaceutical Bull.* 29(12): 2415-2418.

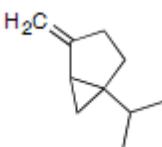
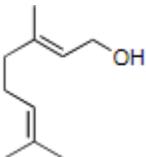
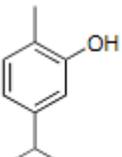
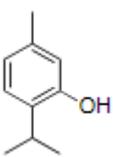
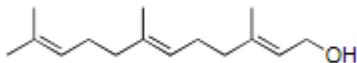
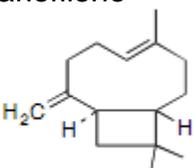
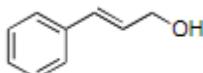
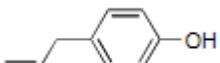
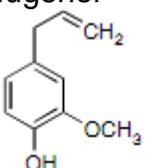
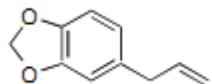
Zakaria, M. and Mohd, M.A., 1994. Traditional Malay medicinal plants. *Penerbit. Fajar Bakti Sudan Bernhard*. 129–132.

Zholos, A.V., Tsytsyura, Y.D., Gordienko, D.V., Tsvilovskyy, V.V. and Bolton, T.B. (2004). Phospholipase C, but not InsP3 or DAG, -dependent activation of the muscarinic receptor-operated cation current in guinea-pig ileal smooth muscle cells. *Brithish Journal of Pharmacology*. 141(1): 23-36.

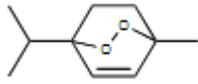
## X. ANEXOS

### Anexo I

Estructuras químicas de componentes selectivos de aceites esenciales

1. Terpenos			
- Monoterpenos Carburos monocíclicos Cimeno (Y) o p-cimeno	Sabineno 	Carburos bicíclicos Alfa-pineno 	Betapineno 
Alcoholes acíclicos Citronelol	Geraniol 	Fenoles Carvacrol 	Timol 
- Sesquiterpenos			
Carburos Farnesol			Alcoholes Cariofileno 
2. Compuestos aromáticos			
Aldehídos Cinamaldehído	Alcoholes Cinamil-alcohol 	Fenoles Cavicol 	Fenoles Eugenol 
Derivados metoxi Anetol	Derivados metoxi Estragol 		Compuestos de dioximetileno Safrol 

Estructuras químicas de componentes selectivos de aceites esenciales  
(continuación)

3. Terpenoides (isoprenoides)	
<p>Ascaridol</p> 	<p>Mentol</p> 