

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE QUIMICA FARMACEUTICA**



DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-*Helicobacter pylori* DE *Plantago major* (Llantén), *Verbena officinalis* (Verbena), *Clinopodium bolivianum* (Khoa), *Caléndula officinalis* (Caléndula), *Piper angustifolium* (Matico) y *Rubus boliviensis* (Khari khari) POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN DE DISCO.

POSTULANTE: Maysa R. Claros Paz

ASESORES: Dr. Eduardo Gonzáles Dávalos Ph.D
Dra. Teresa Alvarez Ph.D
Dr. Miguel Estensoro

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA
EN QUÍMICA FARMACEUTICA**

La Paz-Bolivia
2006

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE QUIMICA FARMACEUTICA**



DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-*Helicobacter pylori* DE *Plantago major* (Llantén), *Verbena officinalis* (Verbena), *Clinopodium bolivianum* (Khoa), *Caléndula officinalis* (Caléndula), *Piper angustifolium* (Matico) y *Rubus boliviensis* (Khari khari) POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN DE DISCO.

Maysa R. Claros Paz

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA
EN QUÍMICA FARMACEUTICA**

La Paz-Bolivia
2006

Tabla de Contenido

I. INTRODUCCION.....	1
II. JUSTIFICACION.....	5
III. OBJETIVOS.....	8
A. OBJETIVO GENERAL.....	9
B. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	9
IV. DISEÑO TEORICO.....	10
A. MARCO TEORICO.....	11
B. MARCO REFERENCIAL.....	15
1. DESCRIPCION DE LAS PLANTAS EN ESTUDIO.....	16
a. <i>Plantago major ssp Major L.</i>	
1) Sinónimos.....	18
2) Nombre popular.....	18
3) Situación taxonómica.....	18
4) Historia.....	18
5) Origen y distribución.....	19
6) Descripción botánica.....	20
7) Composición química.....	20
8) Acción farmacológica.....	23
b. <i>Verbena officinalis L.</i>	
1) Sinónimos.....	27
2) Nombre popular.....	27
3) Situación taxonómica.....	27
4) Historia.....	27
5) Origen y distribución.....	27
6) Descripción botánica.....	28
7) Composición química.....	28
8) Acción farmacológica.....	28
c. <i>Clinopodium bolivianum Kutze</i>	
1) Sinónimos.....	32

2)	Nombre popular.....	32
3)	Situación taxonómica.....	32
4)	Origen y distribución.....	32
5)	Descripción botánica.....	33
6)	Composición química.....	34
7)	Acción farmacológica.....	34
d. <i>Calendula officinalis</i> Lin		
1)	Nombre popular.....	37
2)	Situación taxonómica.....	37
3)	Historia.....	37
4)	Origen y distribución.....	38
5)	Descripción botánica.....	39
6)	Composición química.....	39
7)	Acción farmacológica.....	41
e. <i>Piper angustifolium</i> Ruiz et Pavon		
1)	Sinónimos.....	44
2)	Nombre popular.....	44
3)	Situación taxonómica.....	44
4)	Origen y distribución.....	44
5)	Descripción botánica.....	44
6)	Composición química.....	45
7)	Acción farmacológica.....	45
f. <i>Rubus boliviensis</i> Focke		
1)	Nombre popular.....	49
2)	Situación taxonómica.....	49
3)	Origen y distribución.....	49
4)	Descripción otánica.....	49
5)	Composición química.....	50
6)	Propiedades farmacológica.....	50
2. DESCRIPCION DE HELICOBACTER PYLORI.		
a. HISTORIA.....		53

b. CLASIFICACION TAXONOMICA.....	54
c. ESPECIES DEL GENERO.....	55
d. <i>Helicobacter pylori</i>	56
1) Generalidades.....	56
2) Morfología bacteriana.....	56
3) Genoma.....	57
4) Identificación bioquímica.....	58
5) Técnicas de diagnostico.....	59
a) Método Histológico.....	60
b) Prueba Rápida de la Ureasa.....	60
c) Cultivo.....	61
d) Reacción en cadena de la Polimerasa.....	62
e) Serología.....	62
f) Prueba del aliento.....	63
6) Epidemiología.....	63
7) Patología y fisiopatología.....	64
a) Gastritis.....	65
b) Anemia perniciosa.....	67
c) Ulcera peptica.....	68
d) Cancer de estómago.....	69
e) Linfoma de MALT.....	70
8) Terapia.....	70
a) Criterios para seleccionar el tratamiento.....	73
b) Resistencia.....	74
c) Terapia erradicadora.....	74
9) Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos.....	76
a) Dilución en agar.....	77
b) Difusión por E-test.....	77
c) Difusión de disco.....	78
d) Técnicas moleculares.....	79

V. MATERIALES METODOS Y PROCEDIMIENTOS.....	81
A. DISEÑO METODOLOGICO.....	82
1. AJUSTE PRELIMINAR.....	83
a. EVALUACIÓN DEL ANTIBIOGRAMA.....	83
1) Preparación del antibiótico.....	83
2) Preparación de la suspensión bacteriana.....	83
3) Inoculación en las placas de agar.....	83
4) Aplicación de disco empapado.....	83
5) Incubación en las placas de agar.....	84
6) Lectura de resultados.....	84
7) Interpretación de resultados.....	84
2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	84
a. MATERIAL VEGETAL.....	84
1) Recolección, desecado, pulverización y conservación....	84
2) Preparación de los extractos.....	85
a) Extracto diclorometanico.....	85
b) Extracto hidroalcoholico.....	85
c) Extracto acuoso.....	86
b. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTI- <i>Helicobacter pylori</i>	86
1) Recuperación de cepa <i>Helicobacter pylori</i>	86
2) Prueba de susceptibilidad Bauer Kirby.....	87
3. DESCRIPCION DEL TIPO DE ESTUDIO.....	89
4. DESCRIPCION DEL AMBITO DE ESTUDIO.....	90
a. DESCRIPCIÓN DE LA UNIDAD DE ANÁLISIS.....	90
b. DESCRIPCIÓN DEL AMBIENTE DE TRABAJO.....	90
c. DESCRIPCIÓN DE LA UNIDAD BIOLÓGICA.....	91
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	92
A. RESULTADOS AJUSTE PRELIMINAR.....	93

B. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS.....	95
C. ACTIVIDAD ANTI- <i>Helicobacter pylori</i>	102
VII. CONCLUSIONES.....	123
VIII.BIBLIOGRAFIA.....	126
ANEXOS.....	135

Abreviaturas

CMI:	Concentración mínima inhibitoria
mg.:	Miligramos.
mL.:	Mililitro
aC.:	Antes de Cristo
cm.:	Centímetro.
mm.:	Milímetro.
m.:	Metro
nm.:	Nanómetro
µg.:	Micrómetro
ppm.:	Partes por millón
LC₅₀:	Dosis Letal Media
CLSI:	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<i>S. aureus:</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>B. subtilis:</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>S. disenteriae:</i>	<i>Shigella disenteriae</i>
<i>E. coli:</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. flexneri:</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>M. gypseum:</i>	<i>Microsporium gypseum</i>
SNC:	Sistema Nervioso Central
IIFB:	Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas
m.s.n.m.:	Metros sobre el nivel del mar

RESUMEN

Helicobacter pylori es el agente etiológico de gastritis, úlceras, cáncer gástrico y linfoma de MALT. La prevalencia de la infección causada por este microorganismo es aproximadamente del 50% a nivel mundial, la eficacia de la quimioterapia para su erradicación es del 90%. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda como terapia alternativa emergente a las plantas medicinales. OBJETIVO: Determinar la actividad anti-*Helicobacter pylori* de *Plantago major* (llantén), *Verbena officinalis* (verbena), *Clinopodium bolivianum* (khoa), *Caléndula officinalis* (caléndula), *Piper angustifolium* (matico) y *Rubus boliviensis* (khari-khari) por el método de difusión de disco. METODOS: Se prepararon extractos diclorometánico e hidroalcohólico (por maceración en frío) y extracto acuoso (por infusión), se utilizo como control positivo a la tetraciclina y control negativo a los solventes de extracción, se utilizó cepas salvajes de *Helicobacter pylori* de origen clínico. RESULTADOS Y CONCLUSIONES: A excepción de *Plantago major* y *Rubus boliviensis*, por lo menos un extracto de cada especie vegetal mostró actividad sobre la bacteria estudiada, siendo *Clinopodium bolivianum* y *Piper angustifolium* la mas representativa en su actividad inhibitoria con un nivel de confianza del 99% ($p \leq 0,01$).



I. INTRODUCCIÓN



Desde el descubrimiento de *Helicobacter pylori* el año 1982 en “Perth” Australia por los investigadores Robin Warren y Barry Marshall, quienes demostraron la presencia de bacterias curvadas espirales en muestras de biopsias obtenidas por endoscopia de la mucosa gástrica, se han realizado muchas investigaciones, las que confirman que *H. pylori* es el agente etiológico de la mayoría de las enfermedades a nivel gástrico, entre las más representativas tenemos a la gastritis, úlcera, linfoma de MALT (Tejido Linfoide Asociado a Mucosa) y cáncer gástrico. (Alvarez, 1997; Koneman, 1999; Ramírez, 2003; Krause, 2004).

Helicobacter pylori esta dentro de las infecciones bacterianas crónicas más comunes en el mundo. Se estima que el 50% de la población mundial está infectada por *Helicobacter pylori*; sin embargo, existen diferencias según la raza, los países, factores genéticos y los niveles socioeconómicos. La infección la padecen principalmente los niños y su incidencia se incrementa con la edad. Algunos estudios sugieren que durante los primeros tres años de vida el núcleo de la infección es el hogar (González *et al*, 2004). Se conoce que el modo de transmisión, puede ocurrir de persona a persona, por vía oral-oral y fecal-oral. En la ciudad de La Paz, más del 50% de la población presenta infección por *Helicobacter pylori* (Alvarez 1997), según un estudio realizado por Prado *et al* en la ciudad de Santa Cruz se reporta que alrededor del 73% de esa población presenta infección por este microorganismo.

Actualmente en todos aquellos pacientes en los que se identifica la presencia de *Helicobacter pylori* se les prescribe terapias combinadas para la erradicación de este microorganismo. Se han propuesto muchos esquemas terapéuticos en base a consensos de profesionales expertos en el área, es así que postulan la doble terapia, triple terapia y tetra terapia; la terapia doble consta de un inhibidor de la bomba de protones y un antibiótico (omeprazol y tetraciclina), esta terapia no es utilizada en la actualidad por la mayoría de los médicos debido a su baja eficacia y elevada toxicidad; la triple terapia se constituye como la terapia de primera elección, por su elevada eficacia en comparación con otros esquemas propuestos, está compuesta por un inhibidor de la bomba de protones y dos antibióticos (omeprazol, claritromicina y amoxicilina) (omeprazol, claritromicina, metronidazol), el metronidazol sustituye a la amoxicilina en caso de que el paciente presente alergia a beta-lactámicos, el omeprazol puede ser sustituido por fármacos de su mismo grupo como el



pantoprazol y lanzoprazol, sin presentar variaciones significativas en su acción, sin embargo estos últimos se recomiendan cuando existen reacciones adversas al omeprazol aunque el costo del tratamiento es mayor; la tetra terapia consiste en la asociación de un inhibidor de la bomba de protones, un compuesto a base de sales de bismuto y dos antimicrobianos (omeprazol, ranitidina citrato bismuto, tetraciclina y metronidazol). El tiempo de duración de la terapia varía de 7 a 15 días, no obstante reportes clínicos demuestran que 10 días de terapia muestran resultados óptimos en la erradicación de esta bacteria no existiendo mucha diferencia si se prolonga el tratamiento.

El costo del tratamiento es bastante elevado y varía de acuerdo al tipo de enfermedad y esquema de tratamiento erradicador de *Helicobacter pylori*, siendo este poco accesible a las poblaciones de escasos recursos, por lo que en muchos casos el paciente ni siquiera llega a tratarse, en otros casos los pacientes abandonan el tratamiento lo que puede llegar a producir la resistencia bacteriana. Además, esta terapia es incómoda por la cantidad de fármacos y el tiempo de duración.

En el mundo se vienen realizando continuamente muchos estudios sobre la actividad anti-*Helicobacter pylori* de plantas medicinales tanto in vitro como in vivo, buscando una terapia alternativa natural, como son la *Cistus laurifolius*, *Cedrus libani*, *Centaurea solstitialis* ssp. *solstitialis*, *Momordica charantia*, *Sambucus ebulus*, y *Hypericum perforatum* (Yeşilada et al 1999); *Croton lechleri*, (Ortiz, 2003); *Anthemis melanolepis*, *Cerastium candidissimum*, *Chamomilla recutita*, *Conyza albida*, *Dittrichia viscosa*, *Origanum vulgare* *Stachys alopecuroides* (Stamatis et al, 2003); *Extractum liquiritiae glycyrrhizin* (Krausse, 2004); *Abrus cantoniensis*, *Saussurea lappa*, *Eugenia caryophyllata*, *Hippophae rhamnoides*, *Fritillaria thunbergii*, *Magnolia officinalis* and *Schisandra chinensis*, *Corydalis yanhusuo*, *Citrus reticulata*, *Bupleurum chinense*, *Ligusticum chuanxiong*, *Cassia obtusifolia*, *Fritillaria thunbergii*, *Eugenia caryophyllata* (Li et al, 2005); *Paederia scandens*, *Plumbago zeylanica* L. *Anisomeles indica*, *Bombax malabaricum* *Alpinia speciosa*. (Wang y Huang, 2005).

En Bolivia no existen publicaciones a cerca de la actividad anti-*Helicobacter pylori* de plantas medicinales, pese a que es un país que cuenta con una extensa flora medicinal.



Para la selección de las plantas utilizadas en este trabajo, se tomo en cuenta la información de libros de medicina tradicional (Girault 1987; Piñeros 1991; Oblitas, 1992; Arteché, 1992; Los amigos del libro 1992; Zalles 1995; Gupta, 1997), artículos científicos (Teedrogen M.,1989; Acosta de la Luz, 1995; Tirillini B. *et al.* 1996; Figueroa N. *et al* 1997; Hernández NE *et al.* 2000; Hetland G.*et al.* 2000; Vanaclocha B. *et al* 2003) y el Manual N° 14 del Ministerio de Salud de Bolivia (que regula el uso de plantas en Bolivia). Considerando toda esta información se ha seleccionado a *Plantago major* (llantén), *Verbena officinalis* (verbena), *Clinopodium bolivianum* (khoa), *Calendula officinalis* (calendula), *Piper angustifolium* (matico) y *Rubus boliviensis* (khari-khari), las cuales son recomendadas para el tratamiento de gastritis, úlceras y cáncer gástrico; a excepción de la *Rubus boliviensis* las mencionadas plantas también poseen actividad antibacteriana.





II. JUSTIFICACIÓN



El área de Farmacología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas lleva a cabo diferentes estudios de plantas medicinales de la herbolaria boliviana, estos tienen el objetivo de comprobar los efectos terapéuticos descritos en libros de medicina natural y tradicional.

Un estudio relacionado con este tema, evaluó la actividad gastroprotectora *in vivo* de plantas medicinales de la herbolaria boliviana en los que se verificó un elevado porcentaje de inhibición de la ulceración inducida por etanol en ratones de experimentación. Continuando la línea de investigación a nivel gastrointestinal, se pretende encontrar plantas que posean actividad anti-*Helicobacter pylori*, conocido como el principal agente causal de la úlcera, gastritis, linfoma de MALT y cáncer gástrico, como una terapia natural alternativa.

En este estudio se evaluó la actividad anti-*Helicobacter pylori* de *Plantago major* (llantén), *Verbena officinalis* (verbena), *Clinopodium bolivianum* (khoa), *Calendula officinalis* (caléndula), *Piper angustifolium* (matico) y *Rubus boliviensis* (khari-khari), que fueron seleccionadas principalmente en base a los conocimientos de la medicina tradicional plasmada en la literatura.

Para el estudio de estas especies vegetales se preparó extractos basados en la diferencia de su polaridad, utilizando la técnica de extracción por agotamiento para la extracción con diclorometano e hidroalcohol; la extracción acuosa se realizó por infusión. Este procedimiento ha sido seleccionado por que permite lograr una mayor cantidad de extracto y además separarlos de acuerdo a su polaridad (González, 1998; Ankli *et al*, 2002).

El estudio *in vitro*, es considerado un primer paso para la determinación antibacteriana sobre cepas de *Helicobacter pylori*, ya que este da una pauta para que posteriores estudios puedan separar los principios activos y finalmente se realicen los experimentos en modelos *in vivo*. El método utilizado para este estudio fue la difusión de disco (Bauer Kirby), con la variante de que se preparó los discos a partir de la impregnación en papel filtro. Esta técnica ha sido seleccionada porque es sencilla, económica y confiable

para determinar inicialmente la actividad de los extractos crudos frente *H pylori* (Ankli *et al*, 2001; Farahnaz *et al.*, 2004; Soo *et al.*,2005; Nostro *et al.*,2005) la información de esta técnica sobre esta bacteria es escasa y no se clasifica como sensible o resistente sino en escalas de actividad (Wang *et al* 2005).





III. OBJETIVOS



A. OBJETIVO GENERAL.

Determinar la actividad anti-*Helicobacter pylori* de *Plantago major* (llantén), *Verbena officinalis* (verbena), *Clinopodium bolivianum* (khoa), *Caléndula officinalis* (caléndula), *Piper angustifolium* (matico) y *Rubus boliviensis* (khari-khari) por el método de difusión de disco.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Evaluar el rendimiento de los extractos diclorometánico, hidroalcohólico y acuoso de: *Plantago major*, *Verbena officinalis*, *Clinopodium bolivianum*, *Caléndula officinalis*, *Piper angustifolium* y *Rubus boliviensis*.
2. Determinar la actividad anti-*Helicobacter pylori* del extracto diclorometánico, hidroalcohólico y acuoso, de cada especie vegetal en estudio y del antimicrobiano tetraciclina por el método de difusión de disco.
3. Comparar la actividad anti *Helicobacter pylori* del extracto diclorometánico, hidroalcohólico y acuoso de cada especie vegetal en estudio frente al control negativo.
4. Determinar si existe variación entre cepas salvajes de *Helicobacter pylori* utilizadas en este estudio, en función a la actividad de cada extracto de las especies estudiadas.



IV. DISEÑO TEORICO



A. MARCO TEORICO



Desde la confirmación del aislamiento de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas por Warren y Marshall en el año 1982, hasta la fecha se ha asociado a esta bacteria con las enfermedades gastrointestinales como son la úlcera péptica y duodenal, gastritis aguda y crónica, cáncer gástrico y linfoma de MALT. Estas enfermedades gastrointestinales presentan un riesgo de infección del 40% al 60 % en la población Mundial (Ramírez, 1999) y en nuestro país es mayor al 51% (Alvarez, 1997).

Existen numerosos esquemas de tratamiento propuestos en base a antibióticos y fármacos que inhiben la bomba de protones y/o sales de bismuto para erradicar a *Helicobacter pylori*, sin embargo estas terapias causaron muchos problemas en función a la resistencia que se produce en caso de no cumplir el tratamiento, además de los efectos adversos (Hernández y Tapia 1999). También debemos indicar que estas terapias solo han alcanzado hasta un 90% de efectividad.

En 1994, la Organización Mundial de la Salud, publicó una Guía para Formulación de Políticas Nacionales para Hierbas Medicinales. En la misma se destaca el importante papel que tienen las plantas medicinales en diferentes trastornos o patologías.

Bolivia cuenta con un importante potencial fármaco-botánico y una tradición milenaria en el uso de plantas medicinales. De este potencial, la etnofarmacología Boliviana nos muestra plantas que cumplen con una actividad antiulcerosa y antibacteriana. (Girault 1987). Estas plantas de uso tradicional son recomendadas para el tratamiento de las gastritis e infecciones bacterianas según la medicina tradicional o científica, sin embargo no está demostrada la actividad anti-*Helicobacter pylori*.

Las búsqueda de un tratamiento alternativo ha llevado a considerar la medicina tradicional como fuente de posibles vías de análisis; así, inicialmente se investiga el posible efecto anti-*Helicobacter*, mediante pruebas de inhibición *in vitro* empleando extractos crudos de las plantas y en una segunda etapa las investigaciones conducen al estudio de fracciones del extracto en busca de los principios activos. Posteriormente, se plantea la evaluación *in vivo*, ya sea en animales de experimentación o con voluntarios.



Algunos ejemplos de este tipo de investigación los encontramos en la evaluación de plantas medicinales en Kenya (Fabry *et al.* 1996) y en Yucatec, México (Ankli *et al.* 2002). En el primer estudio se identificaron tres plantas: *Terminalia spinosa*, *Harrisonia abyssinica* y *Ximenia caffra*, cuyas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) fueron de 125 mg/ml en la primera y de 250 mg/ml en las otras dos. En el estudio mejicano se encontraron cuatro plantas cuyas CMI fueron como máximo de 10 mg/ml; éstas fueron: *Casimiroa tetrameria*, *Dostenia contrajerva*, *Jatropha gaumeri* y *Piscidia piscipula*. También, la evaluación de *Pteleopsis suberos*, una planta empleada en África en el tratamiento de las úlceras, mostró que presentaba efectos anti-*Helicobacter* (Germanó *et al.* 1998). Otros estudios han señalado el efecto antibacteriano de las catepsinas aisladas del té (*Camellia sinensis*) que en las concentraciones usuales ingiriendo una taza diaria inhiben a cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (Yam *et al.* 1999) y en el caso de *Helicobacter* la CMI fue de 8 mg/ml, resultando en un descenso significativo en las alteraciones histopatológicas inducidas experimentalmente (Yee *et al.* 2002); además, un estudio comparó el consumo de té en dos grupos de individuos, grupo de infectados y grupo de no infectados con *Helicobacter*; encontrándose que el grupo de los infectados consumía menor cantidad de té en relación al grupo de los no infectados; lo que plantea la posibilidad de que el consumo de té podría interferir con la infección por *Helicobacter* (Tabak *et al.* 1996). Yuan-Chuen Wang *et al.* evaluaron al *Plumbago zeylanica* primero por difusión y luego busco el CMI.

Existen estudios que han identificado las moléculas activas de las plantas medicinales realizando su modificación en pos de incrementar el efecto, como es el caso de flavonoides (Bae *et al.* 1999) y rotenoides aislados de leguminosas (Takashima *et al.* 2002), lo que llevó a la descripción de un nuevo rotenoide, conocido como derrisin, cuya CMI es de 85 mg/ml y a la evaluación de otros conocidos como el teflosin y el toxicarol cuyas CMI son de 0,3mg/ml. De igual manera se describió como activo contra el *H. pylori* a los flavonoides y xanthanolide de *X. brasiliicum* y *T. copticum* el CMI fué 25-250ug/mL (Farahnaz *et al.* 2004). La 1,4-naftoquinona de *Tabebuia impeginosa* Martius tendría un efecto antibacteriano sobre *Helicobacter pylori* (Byeoung *et al.* 2006).

Por lo tanto, ante una infección que exhibe una marcada resistencia a los antibióticos que se traduce en una falla sistémica en los esquemas de tratamiento, se augura que la investigación en plantas medicinales podría llevarnos al descubrimiento de nuevos principios activos cuya explotación farmacológica nos llevará a nuevas opciones de tratamiento, tanto preventivo como curativo.





B. MARCO REFERENCIAL.



1. DESCRIPCIÓN DE LAS PLANTAS EN ESTUDIO

Plantago major ssp. **Major L**



a. *Plantago major* ssp. Major L

1) **Sinónimos**

Plantago asiático L., *Plantago erosa* Wall., *Plantago lanceolatum* Link., *Plantago loureri*, *Plantago mexicana* Link.

2) **Nombre Populares**

Llantén común, plantaina, siete venas, pan de los caminos, planten, tanchagem (Brasil), plantain (Ingl), plantaggine (Ital), grand plantain (Franc) (Alonso 1998).

3) **Situación taxonómica**

Reino: Plantae

División: Spermatophyta

Clase: Dicotiledónea

Orden: Plantaginales

Familia: Plantaginaceae

Género: *Plantago*

Especie: *Plantago major* L.

4) **Historia**

Estudios del polen mostraron que el *Plantago major* fue cultivado en el Continente Nordico, paralelo al primer cultivo sembrado en la era de la piedra 4000 años aC. El *Plantago major* fue alimento del hombre de Europa y los alrededores del mundo. Los indios lo llamaron “la huella del hombre blanco” porque se encontraba en cualquier lugar.

Esta ha sido adaptada dentro del género llamado *Plantago* que viene del latín *planta* que significa la planta del pié. La denominación de psyllum a las semillas, proviene de la palabra griega psylla que significa pulga, en alusión a la forma y tamaño de las mismas.

P. major es una planta que mucha gente conoce solamente como hierva, pero el *Plantago major* se conoce además como una planta medicinal desde hace cientos de años (Alonso J. 1998; Berit A. 2000; García M. *et al.* 2003).



En Escandinavia esta planta es conocida principalmente por sus propiedades curativas de heridas. El *Plantago major* es conocido en Noruega y Suecia popularmente con el nombre de “grobld” que significa “sanar vidas”.

Las propiedades curativas del *Plantago major* en el uso tradicional son conocidas desde hace mucho tiempo atrás. Esto fue descrito por el físico griego Dioscórides en “La materia médica” en la primera centuria. Las hojas fueron prescritas para el tratamiento de mordeduras de perros (Roca-García, 1972). Procedente de “Volsuga saga” es conocido que los Vikingos usaron las hojas del *Plantago major* para curar su heridas. El *Plantago major* además fue descrito en el siglo XII y XIII por el autor islámico Ibn El Beithar adoptando el conocimiento de la medicina griega.

Henrik Harpestreng de Dinamarca escribió acerca del *Plantago major* en su libro “Liber Harbarum” que puede curar cualquier herida interna. Mezclada con miel es recomendada como cataplasma sobre heridas. Tostado en aceite y comido este puede curar cualquier órgano del cuerpo humano.

Además a sido usada comúnmente en el tiempo de Shakespeare y es mencionada en su obra ”Romeo y Julieta”, Acto I, escena II.

El *Plantago major* fue descrito por Simón Pauli en 1648 en “Flora Danica” como un muy eficiente remedio que cura heridas.

El boticario inglés Nicolás Culpeper publicó ‘El Herbario completo’ en 1649, postulaba que el uso de plantas en el tratamiento de enfermedades era basado en la astrología, según esta teoría *P major* está bajo Venus.

5) Origen y distribución

Oriunda de Europa, Asia y norte de Africa, crece en casi todos los terrenos, estando ampliamente distribuida en todo el mundo, siendo considerada por muchos de los jardineros como “mala hierba”.



En el Herbario Nacional de Bolivia se encuentran depositadas 3 especies de *Plantago major* L. que fueron recolectadas de:

Departamento	Provincia	Localidad	Lugar
La Paz	Bautista Saavedra	Charazani	Charazani
La Paz	Murillo	-	Lago Zongo
Cochabamba	Punata	Punata	Punata

Fuente: Herbario Nacional de Bolivia

6) Descripción Botánica

Caracterizada por su baja altura (entre 10 y 50 cm) debido a su corto rizoma pero el tamaño depende del hábitat de crecimiento (García *et al.* 2003; Alonso 1998; Berit 2000).

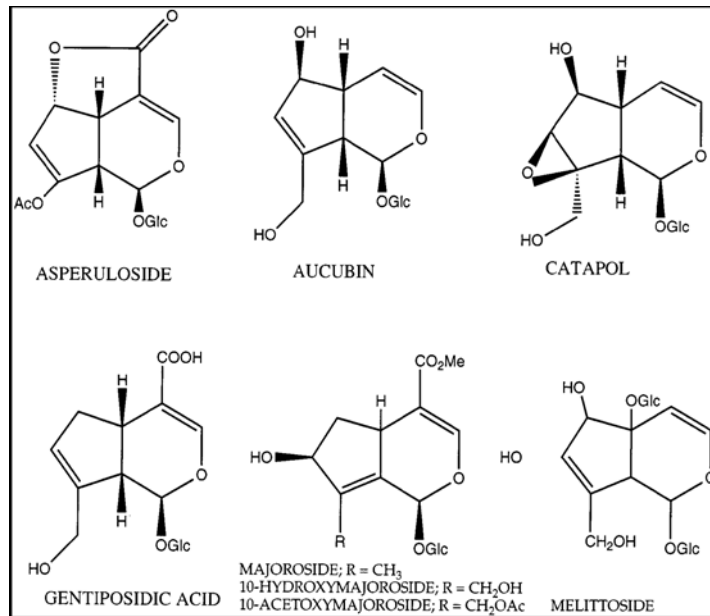
- **Hojas:** son glabras, aovadas a elíptico, de color verde, basales con siete nervaduras y dispuestas en roseta. Con un irregular margen dentado.
- **Flores:** Son pequeñas, simples y erectas, cada uno de los cuales lleva una espiga verde amarillenta.
- **Semillas:** Son bastante pequeñas con una forma aovada (0.4–0.8 x 0.8–1.5 mm) y un sabor ligeramente amargo. Se localizan en las cápsulas (8–16 por la cápsula) y se pone pegajoso en época húmeda debido al hinchazón de los polisacáridos
- **Floración:** En primavera verano, abarcando su recolección todo el año.

7) Composición fitoquímica

Los estudios realizados sobre la composición química de esta planta son amplios, así se encontraron mucílagos, flavonoides, glucósidos iridoide, cumarinas, ácido fenolcarboxílico, sales minerales, alcaloides, ácidos grasos, vitaminas (Berit 2000; García *et al.* 2003; Alonso 1998).

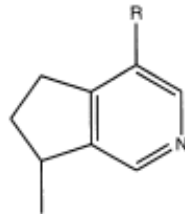
- **Mucílago:** Presente en las hojas y semillas (6,5%) compuestos por polisacáridos de tipo ramno-galacturonano, arabinogalactano, glucomanano y pectina.
- **Glucósidos iridoide:** En las flores 0.023% de asperulósido, en las hojas 1,3% de aucubina, y en las partes aéreas Catapol 0.003%, Gardósido 0.001%, ácido

geniposídico 0.005%, Majrosido 0.004%, 10-Actoximajorosido 0.03%, 10-Hidroximajorosido 0.02%, melittósido 0.004%.



Fuente: Berit 2000

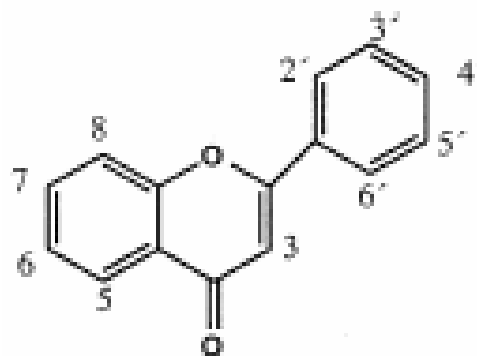
- **Cumarinas:** esculetinalos
- **Ácido fenolcarboxílico:** clorogénico, neoclorogénico, gentísico, protocatequico
- **Sales minerales:** Si, Zn, K
- **Alcaloides:** Indicaina, Plantagonina,



Alcaloides de *P. major* L. Indicaina: R = CHO; plantagonina: R = COOH

Fuente: Berit 2000

- **Flavonoides:** apigenina 7 glucósido, luteonina, luteonina 7-glucósido, luteonina 7-diglucósido, luteonina 6-hidroxi-4'-metoxi-7-galactósido, escutelarina, baicaleina, hispidulina, hispidulina 7-glucorinido, homoplantaginina, neptina 7- glucósido.



	3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'
Apigenin 7-glucosido	H	OH	H	Oglc	H	H	H	OH	H	H
Baicalein	H	OH	OH	OH	H	H	H	H	H	H
Hispidulin	H	OH	Ome	OH	H	H	H	OH	H	H
Hispidulin 7-glucoronido	H	OH	Ome	OglcA	H	H	H	OH	H	H
Homoplantaginina	H	OH	Ome	Oglc	H	H	H	OH	H	H
Luteolin 7-glucosido	H	OH	H	Oglc	H	H	OH	OH	H	H
Luteolin 7-diglucosido	H	OH	H	OGlc-OGlc	H	H	OH	OH	H	H
Luteolin 6-hydroxi-4'-metoxi-7-galactosido	H	OH	OH	Ogal	H	H	OH	OMe	H	H
Nepetin 7-glucosido	H	OH	Ome	Oglc	H	H	OH	OH	H	H
Plantaginina	H	OH	OH	Oglc	H	H	H	OH	H	H
Scutellarein	H	OH	OH	OH	H	H	H	OH	H	H

Fuente: Berit 2000

- **Acidos grasos:** Presente en semillas y hojas, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido 9-hidroxi-*cis*-11-octadecenoico.
- **Vitaminas:** β -caroteno, ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico. Vitamina K₁.
- **Otros:** Manitol, Sorbitol, Emulsina, invertina, saponinas, Pectina, Taninos

8) Acción farmacológica

El *Plantago major* se usa para diferentes fines tradicionales, por consiguiente los investigadores del mundo han probado diferentes actividades biológica. La mayoría de las pruebas se han realizado con los extractos crudos sin examinar los compuestos activos de aquí tenemos los siguientes estudios:

Yaremenko en 1990 determinó la actividad **profiláctica frente al cáncer**. De igual manera Lithander estudia al extracto acuoso atribuyéndole la propiedad de **profiláctico frente al cáncer de mama** en ratones. Los compuestos polifenólicos hallados en las hojas a mostrado un efecto protector frente a la acción carcinogénica de la nitrosodimetil amina (Karpilovskaya *et al.*,1989).

El *Plantago major* ha sido incluido en estudios de plantas medicinales usadas en **infecciones bacterianas**. El extracto acuoso, metanólico y etanólico al 50% y 70% fueron estudiados por la técnica de difusión de disco sobre diferentes bacterias tanto gram positivas como gram negativas, midiendo la zona de inhibición para determinar el efecto. El extracto metanólico es activo contra *Salmonella typhimurium* (McCutcheon *et al.*1992). El extracto de etanol al 50% es activos contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. disenteriae* y *E. coli* (Cáceres *et al.* 1987). El extracto de etanol al 70% tiene actividad contra *S. flexneri* (Moskalenko.1986; Cáceres *et al.* 1990). Las actividades antibióticas registradas del *Plantago major* eran más débiles en comparación con la gentamicina usado como control positivo.

Se sugiere que el compuesto responsable del efecto antibacteriano sea el aglicón de la *aucubina*, denominado *aucubigenina*, liberado por una *b-glucosidasa* (Teedrogen 1989).

Bacteria	H2O	MeOH	50% EtOH	70% EtOH
<i>Staphylococcus aureus</i>	-		++	+
<i>S. aureus, meticillin resistant</i>		+		
<i>S. aureus, meticillin sensitive</i>		-		
<i>Streptococcus pyogenes</i>			-	
<i>Bacillus subtilis</i>		-	++	-
<i>Shigella sonnei</i>				+
<i>S. flexneri</i>			-/+	++
<i>S. dysenteriae</i>			++	
<i>Salmonella typhi</i>			-/+	
<i>S. enteritidis</i>			-	
<i>S. typhimurium</i>		++		
<i>Serratia marcescens</i>		-		
<i>Escherichia coli</i>	-	-	++	+
<i>Escherichia "crim"</i>				+
<i>Klebsiella pneumonia</i>		-		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		-	-	
<i>Proteus vulgaris</i>			-	
<i>Mycobacterium phlei</i>		+		
<i>M. Smegmatis</i>				+

(-) zona de inhibición 6–8 mm; (+) zona de inhibición 8–10 mm; ++ zona de inhibición 10–15 mm.

Fuente: Moskalenko.1986; Cáceres *et al.* 1987; Cáceres *et al.* 1990; McCutcheon *et al.*1992

El efecto antibacteriano sobre el *Streptococcus pneumoniae* 6B del extracto etanólico al 80% de las hojas de *Plantago mayor* en ratones es dado por un polisacárido soluble denominado pectina PMII (Hetland *et al.* 2000).

Hongo	MeOH	50%EtOH
<i>Aspergillus flavus</i>	-	
<i>Fusarium tricuiatum</i>	+	
<i>Sacchariomyces cerevisiae</i>	+	
<i>Trichoderma viridae</i>	-	
<i>Microsporum cookerii</i>	-	
<i>M. gypseum</i>	+	
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	-	
<i>Candida albicans</i>	+	-

(-) zona de inhibición 6–8mm; (+)zona de inhibición 6–10 mm.

Fuente: Cáceres *et al.*, 1987; McCutcheon *et al.*, 1994



Cáceres et al. y McCutcheon estudiaron la actividad **antifúngica** del extracto metanólico y etanólico al 50% mediante la técnica de difusión de disco obteniendo el siguiente resultado. (Cáceres *et al*, 1987; McCutcheon *et al*, 1994)

Un estudio realizado por Ponce-Macotela et al. muestra que la decocción de la planta en solución salina se incubó con el trofozoito de **Giardia duodenalis**. La mortalidad de este parásito fue de 7691.2 similar a la mortalidad que produjo el tinidazol que fue el control positivo 7991.9 (Ponce-Macotela *et al*. 1994).

El extracto acuoso de las hojas secas de *Plantago major* dadas por vía oral ha mostrado actividad **antiinflamatoria** en ratones mediante la prueba del edema plantar inducida por carregenina y también mostró actividad analgésica que se evaluó por la prueba del “golpecito en la cola” que se relaciona a la inhibición de síntesis de prostaglandinas. (Guillen et al., 1997). Se cree que los compuestos involucrados en este efecto son los flavonoides, alcaloides, saponinas y polifenoles.

En una prueba doble ciego realizada sobre 51 pacientes con **hemorroides**, el empleo por vía oral de los extractos de *Plantago major* a demostrado disminución de síntomas tales como el sangrado y el dolor al evacuar. (Moesgaard *et al*, 1982)

La decocción de la hoja a demostrado tener efectos **diurético** suaves en animales de laboratorio probablemente debido al manitol (Girón *et al* 1987).

Un trabajo realizado en la Escuela Medica Paulista del Brasil demostró que el extracto acuoso elaborado en base a las hojas de *P. major* presenta actividad **antisecretora y antiulcerogénica in vitro**. También la decocción de la planta fresca a dosis de 15-25g/l, a demostrado un efecto antiácido similar al del *hidróxido de aluminio*, y un efecto **analgésico sobre la mucosa del tracto urinario** (Carballo 1994).

El Ministerio de Salud de Bolivia aprueba las hojas de *Plantago major* para su uso como **antiinflamatorio y cicatrizante**. (Manual N°14 Ministerio de Salud de Bolivia 2000).

Verbena officinalis L.



b. *Verbena officinalis* L

1) **Sinónimo**

Verbena hastata L (Alonso J. 1998).

2) **Nombre popular**

Aistrika (vasco), Berbena (catalán), Eisenkraut (alemán), Herb of the cross (inglés), Herb-of-the-cross (inglés), Herba da crus (gallego y/o portugués), Izusta (vasco), Lung-ya-ts'ao (chino), Ma-pien-ts'ao (chino), Pamukh (hindi), Prostrate verbena (inglés), Urgebão (gallego y/o portugués), Verbena (castellano), Verbena halei (sinónimo), Verbenaceae (familia), Vervain (inglés)

3) **Situación taxonómica**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Verbenaceae

Género: *Verbena*

Especie: *Verbena officinalis* L.

4) **Historia**

La *verbena*, junto a otro grupo de plantas entre las que se destaca la *betónica*, estuvo muy relacionada con la brujería y la magia por los pueblos antiguos celtas y germanos de Europa. Ya los romanos y griegos la conocían con los nombres de *herba sacra* y *herba veneris*, creyendo que tenerla en la casa era señal de buen agüero. En la Edad Media solía ser común bañarse en aguas que contenían ejemplares de *verbena* en la creencia que con ese acto podía vislumbrar el futuro o cumplir sus deseos. Asimismo, formó parte de varias pociones amorosas y de otras que protegían contra los malos espíritus. (Alonso 1998).

5) **Origen y distribución**

Originaria de la zona mediterránea, en la actualidad la *verbena* es una especie cosmopolita. Crece en los bordes de caminos, praderas secas, taludes, baldíos o suelos ricos.



6) Descripción botánica

Planta anual, bienal o perenne, caracterizada por tener una altura oscilante entre 35 y 80 cm. (Alonso 1998).

- **Raíz:** Fusiforme, blanquecina y ramificada
- **Tallos:** El tallo es erecto, rígido, cuadrangular y ramificado en la parte superior
- **Hojas:** Opuestas, escasas, pecioladas y lanceoladas de hasta 6 cm de largo, de un color verde apagado y oblongo ovadas. Están divididas profundamente en 3 lóbulos. Presentan la superficie arrugada y tomentosa.
- **Flores:** Pequeñas, en espiga alargada y delgada, color lila, apareciendo desde el verano hasta finales del otoño.

7) Composición química

Esta compuesta por Heterósidos, Fenilpropanoides, aceites, Flavonoides y otros como carbohidratos, carotenos, saponinas, alcaloides, ácidos y taninos (Deepak *et al* 2000; Zhang *et al.* 2000)

- **Heterósidos (Iridoides) (0,2-0,5%):** *hastatósido* (0.08%), *verbenalósido* (*verbenalina*) (0.15%), *dihidroverbenalina* (0.01%) y *acubósido* (Tian *et al.* 2005).
- **Fenilpropanoides heterosídicos:** *verbascósido* (0,8%) *eukuvósido*, el primero derivado del ácido cafeico.
- **Aceite esencial** (0,3%) compuesto principalmente por monoterpenos y sesquiterpenos, como limoneno (7,5%), 1,8-cineol (7,5), α -curcumeno (6,0%) epoxicariofileno (7,5%), espatulenol (10,8%), citral, geraniol y verbeneno
- **Flavonoides, aglicones** (artemitina, sorbifolina, pedalitina, nepetina) como heterósidos (7-O- β -D-glucuronopiranosil-apigenina).
- **Otros constituyentes:** carbohidratos (mucílagos), β caroteno, saponinas, taninos, ácidos y alcaloides (vincamina).

8) Acción farmacológica

Existe poca informaciones científicas sobre la farmacología y clínica de esta planta.

Estudios realizados muestran que el extracto de cloroformo de las partes aéreas tienen actividad **antiinflamatoria** en modelos animales según el modelo de inflamación



aguda “edema plantar inducido por carregenina” relacionando este efecto a los componentes que se aíslan como el β -sitosterol, ácido oleanólico, ácido 3-epioleanólico y ácido 3-epiursólico (Deepak M. *et al* 2000); Calvo MI. en el año 2006 según el mismo modelo muestra que el extracto metanólico al 50% de verbena tiene acción **antiinflamatoria** aplicada por vía tópica además de **analgésica**, se cree que en este extracto el que cumple este efecto es el 2-iridoide glucósido, verbenalina, hastatósido, varbascósido y β -sitosterol-D-glucósido (Alonso 1998; Deepak *et al* 2000).

También se estudió la actividad **antitusiva** atribuida a la verbenalina (Gui CH. 1985; Alonso 1998). También se ha puesto de manifiesto una acción **expectorante** en un extracto de sumidad de verbena. (Alonso 1998).

En el Beijing Medical Collage se ha demostrado que la sumidad de verbena posee un efecto sinérgico con la prostaglandina E₂, provocando **contracción de la musculatura lisa del útero** e inhibiendo la acción de la hormona gonadotropina. Los extractos de verbena tienen acción **antitiroidea**: algunos componentes son capaces de bloquear los receptores de tirotrópina o de unirse a la TSH. (Alonso 1998).

El aucubósido, a pequeñas dosis, actúa como agonista de las terminaciones nerviosas simpáticas, y a dosis alta como agonista. Además actúa como **neuroprotector** de células del SNC. (Lai *et al* 2006)

Se postula que el extracto hidroalcohólico refuerza la actividad **anticoagulante** de la warfarina. (Argento *et al*. 2000)

La infusión de la planta actúa sobre la **urolitiasis** y puede ser atribuida a las saponinas. (Carnat *et al*. 1995)

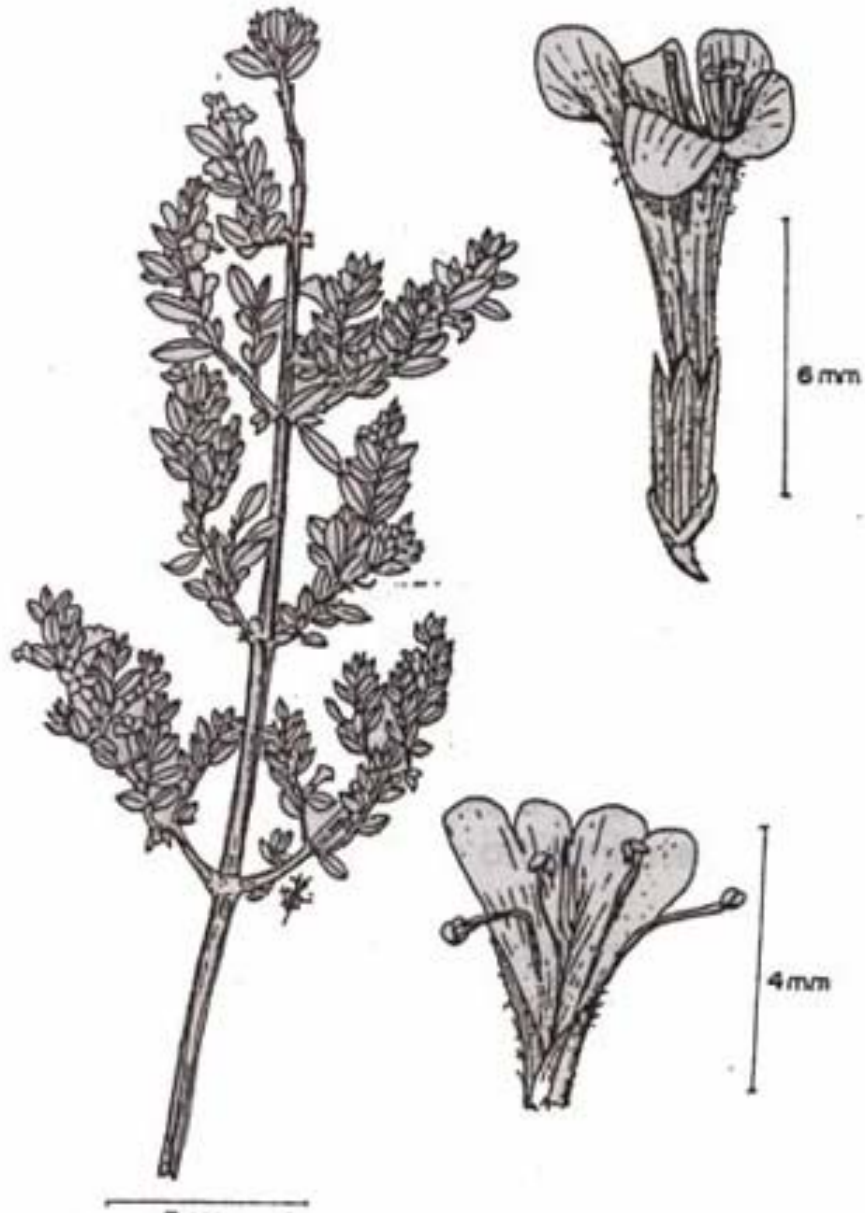
Se asocia a la verbena con la actividad **antirreumática** (Guarrera *et al* 2005)

Un estudio realizado en el Valle de Tafi (Tucumán-Argentina) muestra que los flavonoides mono y dihidroxilados de la *verbena* tienen acción **antibacteriana** sobre gram positivos y gram negativos. (Hernández *et al.* 2000)

Además entre otros efectos podemos mencionar la actividad **diurética** y **galactogoga**, (Alonso 1998).



Clinopodium bolivianum Kuntze



c. *Clinopodium bolivianum* KuntzeAntes *Satureja boliviana* (Benth) Briquet

1) Sinónimos

Satureja boliviana (Benth) Briquet , *Clinopodium kuntzeanum* Kuntze, *Micromeria boliviana* Benth, *Micromeria boliviana* Benth var. *angustifolia* Weddel, *Satureia Kuntzeana* Briquet; *Xenopoma bolivianum* Grisebach (Correa *et al.*, 1994; Gupta 1995).

2) Nombres populares

Khoa; Martín Muña, Pampa Muña, Muña, Té de indio, Poleo; Pichuysisa (Girault, 1987; Oblitas, 1992; Correa *et al.*, 1994; Gupta, 1995).

3) Situación taxonómica (Cronquist, 1981)

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsidae

Subclase: Asteridae

Orden: Labiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Clinopodium*

Especie: *Clinopodium boliviana*

4) Origen y distribución

Oriunda de las zonas montañosas del altiplano boliviano

En los archivos del herbario Nacional de Bolivia se encuentran registrados los lugares de recolección , así tenemos los siguiente:

Departamento	Provincia	Localidad	Lugar
La Paz	Murillo	-	Ovejuyo
La Paz	Murillo	-	Villa Fátima
La Paz	Omasuyos	Huarina	Huatajata
La Paz	Los Andes		Cerro Kohani



Departamento	Provincia	Localidad	Lugar
La Paz	Nor Yungas	Unduavi	
La Paz	Manco Cápac	Chua	
La Paz	Larecaja	Sorata	Quiabaya
La Paz	Murillo		Zongo
Tarija	Villamontes		
Tarija	Méndez		
Santa Cruz	Vallegrande	Huasacañada	
Cochabamba	Arque	Challa	
Cochabamba	Provincia Carrasco		
Cochabamba	Campero		
Cochabamba	Quillacollo		
Cochabamba	Carrasco	Pojo	

5) Descripción botánica

Arbusto de hasta 1,5 m de altura

- **Tallos:** Racemosos, pubérulos, con pubescencia más pronunciada en los nudos foliares.
- **Hojas:** Peciolos glabros, 1,5 a 4 mm de longitud, láminas de 0,5 a 2,5 cm. de longitud por 0,4 a 1 cm de ancho, lanceoladas, glabras o pubéculas en ambas caras.
- **Flores:** Solitarias, axilares; caliz de 2,5–3,5 mm, infundibuliforme, pubescente en la cara externa; corola blanca de 8,5-10 mm de longitud, glabrecente en la cara interior; filamentos estaminales exentos, superiores de 4 mm de longitud, inferiores de 6 mm de longitud; estilo de 8–12 mm de longitud.

6) Composición química

Como se mencionó anteriormente no existen estudio que hablen de esta especie, sin embargo se rescata el único estudio de la composición química de la *Satureja boliviana* que menciona sus aceites:

- **Aceites esenciales:** α -Tujeno (1.35%); α -Pino (1,09%); Sabineno 2,92%; 1-metil-2-(1-metil)-benceno 9,04%; 1,8-cineol (9,02%); γ -terpineno (1,04%);

Isomentona 33,61%; α -terpineol (1%); Pulegona (9,79%); Indo bornil acetato (1,53%); Carbacrol (11,14%); Cariofileno (1%); Epibicilosquifelandrino (0,97%), (Figuroa *et al.*1997)

7) Usos terapéuticos

No existe ninguna información científica sobre *Clinopodium boliviana*, sin embargo se rescata esta información con el nombre de *Satureja boliviana* como se la conocí hasta el año 2003.

Se ha visto que presenta actividad **antibiótica** en pruebas in vitro contra diversas bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*) y hongos (*Neurospora crassa*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* y *Microsporum cannis*) con muy buenos resultados (Alonzo 1998). En una tesis realizada en el IIFB Figuroa N. et al. evalúan la actividad antibacteriana, antifúngica e insecticida, donde la *Clinopodium boliviana* (*Satureja boliviana*) presenta actividad antibacteriana, antifúngica, además tiene actividad insecticida porque actúa contra huevos y larvas de *Triatoma infestans* (vinchuca) (Figuroa *et al* 1997).

Antibacteriana

Halo de inhibición en mm

Gram positivo		Gram negativo		
<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>
21	31	16	11	-

Fuente: Figuroa N. *et al* 1997

Antifúngica

Hongos patógenos		
<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>H cannis</i>
+	+	+

Fuente: Figuroa N. *et al* 1997

Insecticida

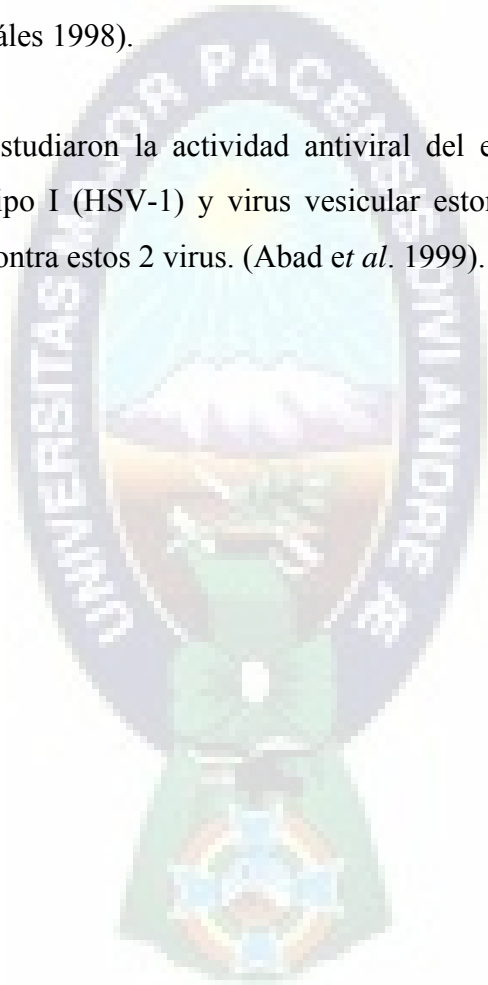
<i>Triatoma infestans</i>		
Huevos/larvas	larvas (4to estadio)	<i>Aedes aegypti</i>
Ovicida 10 a 20%	-	-
Larvicida 3 a 20%	-	-

Fuente: Figuroa N. *et al* 1997



González E. estudió la actividad **antiinflamatoria** siguiendo el modelo de inducción de edema de pata por carregenina en ratones donde los extractos acuosos y etanólicos mostraron una interesante actividad en todas las fases del proceso encontrándose estos con buena o elevada actividad, con porcentajes de inhibición máximos de 55,6% y 66,6% respectivamente a las 5 horas de administración. Además estudió la actividad **citoprotectora** de la mucosa gástrica mediante el modelo de inducción de úlcera gástrica por etanol en ratas dando como resultado el extracto acuosos 52.8% y el extracto hexánico 25,7% de actividad (González 1998).

Abad MJ. et al. estudiaron la actividad antiviral del extracto etanólico y acuoso contra el herpes simple tipo I (HSV-1) y virus vesicular estomatitis VSV., resultando el extracto acuoso positivo contra estos 2 virus. (Abad *et al.* 1999).



Calendula officinalis Lin.



d. *Caléndula officinalis* Lin. Det : J. C. Solomon 1986

1) Nombres populares

Caléndula, maravilla, virreina, clavel de muerto, marquesita, china, marigold, o ringflower (Ing), cappucina dei campi o calenzola (Ital), soucides jardins (Franc), maravilba (Port), copetuda (Cuba).

2) Situación taxonómica (Urions 1992)

Reino: Plantas

Subreino: Embryophyta siphonogama (Spermatophyta)

División: Angiosperma (Anthophyta)

Clase: Dicotiledónea (Magnoliopsida)

Orden: Campanulales

Familia: Compositae (Asteraceae)

Sub familia: Asteroideae

Tribu: Calenduleae

Género: *Caléndula*

Especie: *Caléndula officinalis*

3) Historia

Las virtudes medicinales y colorantes de la caléndula fueron conocidas desde la antigüedad, en especial por los árabes e hindúes, siendo posteriormente cultivada por los griegos. Estos últimos solían adornar sus festivales con flores de caléndula así como armaban guirnaldas para sus héroes, su denominación botánica proviene del latín, *kalendulae*, que representa el primer día del mes del calendario romano, en virtud de que estas plantas florecen al principio de la mayoría de los meses del año, Los romanos le denominaron *solsequium*, que significa “seguidora del sol” ya que sus flores se abren al alba y se cierran a la caída del sol.

Sus pétalos secos fueron empleados como sustituto del azafrán tanto por griegos como por romanos, debido al alto costo que tenía este último condimento



En la Edad Media fue muy empleada, siendo recomendada por la Abadesa Hildegarda de Bingen (1099-1179) en el tratamiento del impétigo y máculas dérmicas. Fue Albertus Magnus (1193-1280) siendo incorporada en prácticamente todos los textos herbarios de la época. El padre Sebastián Kneipp (1821-1897) recomendaba la aplicación externa de *caléndula* en úlceras, várices y maculopatias dérmicas de todo tipo. Tanto durante la guerra civil Norteamericana, como durante la 1^{ra} Guerra Mundial, se han empleado unguentos y pomadas en base a *caléndulas* como desinflamatorio y antiséptico de heridas.

Varios informes citan la exportación de grandes cantidades de *caléndula* cultivada en Sussex (Inglaterra) hasta los hospitales de campaña situados en Francia. Debido a que sus flósculos se asemejan a rayos de gloria, esta flor fue consagrada y reverenciada por los creyentes a la Virgen Maria. Actualmente en la India, de acuerdo con la vieja tradición, se hacen guirnaldas con flores de *caléndula* en honor de las deidades Mahadevi y Durga. (Alonzo, 1998; Acosta *et al.* 2001)

4) Origen y distribución

Se plantea que es originaria de Egipto y cultivada en Europa en el siglo XII, luego se extendió por el resto del mundo. Existe subespontánea por toda la región mediterránea, crece fácilmente durante los meses de verano en las islas Británicas y goza de gran fama como planta ornamental cultivada en patios, jardines, macetas, ya que tolera todo tipo de suelos, preferentemente arcillosos

Se cultiva desde el siglo XVII en Europa, específicamente en Inglaterra, Alemania, Colombia, Costa Rica, España, Estados Unidos, Francia, Hungría, Japón, Kuwait, México, Polonia, Rumania, Suecia, Suiza, Unión Soviética. (Acosta *et al.* 2001)

En el Herbario Nacional de Bolivia se encuentran depositadas 2 especies de *Caléndula officinalis* L. que fueron recolectadas de :

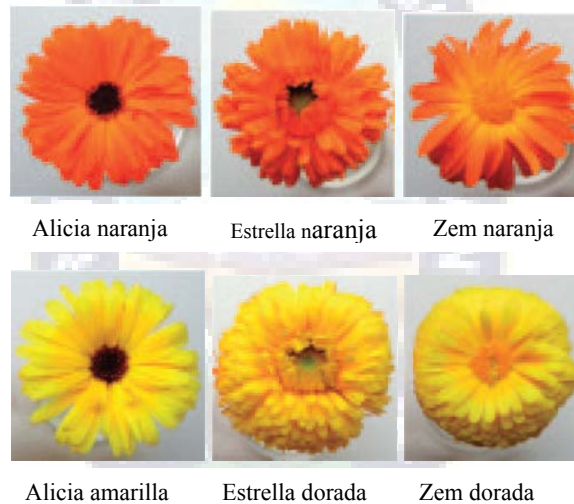
- Tarija, Provincia Cercado se halla a una altura de 1900 msnm
- La Paz, Provincia Murillo se halla a una altura de 3300 msnm

Fuente (Herbario Nacional)

5) Descripción botánica

Es una planta herbácea de ciclo de vida anual, pero que puede comportarse como bianual en climas templados. caracterizada por presentar una altura cercana al medio metro. (Alonso. 1998; Acosta et al. 2001).

- **Tallos:** erectos y ramificados alcanza 30 a 60 cm de altura y termina en capítulos solitarios.
- **Hojas:** Oblongolanceoladas, pilosas por ambas caras.
- **Inflorescencias:** Grandes, de fuerte tonalidad naranja o amarillo, liguladas en la periferia y tubulosas en el centro. (Kishimoto *et al.*, 2005).



Fuente: Kishimoto et al., 2005.

- **Fruto:** Es un aquenio espinoso.

6) Composición química

Existen diferentes investigadores que se interesaron por describir la composición química, es así que se conoce hasta hoy que tiene aceites, saponinas, flavonoides, alcaloides, polisacáridos y carotenoides (Alonso, 1998; Acosta *et al.* 2001; Chudnicka *et al.* 2005).

- **Aceite esencial (0,1-0,4%).-** Abundante en mono y sesquiterpenos oxigenados: carvona, gerinilacetona, mentona, isomentona, cariofileno, α y β -iononas, pedunculatina, dihidroactinidiólido, γ -terpireno, α -muuroleno, γ y δ -cadineno, cariofilenocetona,



- **Saponósidos: (2-5%)** calendulósidos A, D, D₂, F. (derivados del ácido oleanólico)
- **Flavonoides:** Derivados del quercetol (quercetin-3-O-glicósido) y del isorramnetol, rutósido.
- **Alcaloides triterpénicos pentacíclicos:** *arnidio, faradiol, ácido faradiol-3-mirístico, lupol, taraxasterol, ácido faradiol-3-palmítico, etc.*
- **Polisacáridos:** *ramno-arabino-galactano* y dos *arabinogalactanos*.
- **Carotenoides:** calendulina, violaxantina, rubixantina, citroxantina, flavocromo, flavoxantina, galenina, luteína, licopeno, valentiaxantina, auroxantina, microxantina, 5,6 epoxicaroteno, mutatoxantina y lutein epóxido. (Kishimoto *et al.* 2005)

Nº 1	Carotenoides	% total de carotenoides	λ_{\max} (nm)
1	(8' R) – Luteoxantina	11,0	398,422,448
2	Luteína - 5,6 – epoxido	1,6	416,438,469
3	Flavoxantina	28,5	398,420,448
4	(8 R, 8' R) – Auroxantina	7,1	380,401,425
5	(9' Z) – Luteína – 5,6 – epoxido	5,0	413,435,463
6	Luteína	2,0	444,473
7	Anteraxantina	1,0	440,467
8	(9 Z) – Luteína	0,6	440,467
9	(5'Z,9'Z) – Rubixantina	4,0	455,485
10	α – Caroteno	0,8	446,475
11	β – Caroteno	3,4	452,479
12	(5'Z) – Rubixantina	3,0	461,491
13	δ – Caroteno	1,4	433,457,488
14	(5 Z,9 Z, 5'Z,9'Z) – Licopeno	4,1	437,461,491
15	γ – Caroteno	2,0	461,493
16	(5'Z) – γ – Caroteno	4,4	463,493
17	(5 Z,9 Z, 5'Z) – Licopeno	3,5	442,467,497
18	(5 Z,9 Z) – Licopeno	4,1	442,467,497
19	(all E) – Licopeno	8,7	446,473,505

Fuente: Kishimoto *et al.* 2005

- **Otros:** *ácido málico (6,8%), mucílago (1,5%), resina, goma (calendulina), sustancia amarga (calendeno o calendina), taninos, poliacetilenos, esteroides (sitosterol, estigmasterol, isofucosterol, campesterol, metil-enecholesterol y colesterol), ácido salicílico (0,34 mg/k), arvosido A (glicósido sesquiterpénico) e inulina (raiz).*



7) Acciones farmacológicas

Para fines terapéuticos se utiliza principalmente la flor, ya sea fresca o seca, su uso más difundido es el que concierne a su actividad **reepitelizante y cicatrizante**, en donde entraría en juego el accionar conjunto de *mucílagos, flavonoides* (en especial el quercetin-3-0-glicósido), *triterpenos y carotenos*. Dicha actividad activaría el metabolismo de las glucoproteínas, nucleoproteínas y el tejido colágeno. Los ungüentos de extractos florales de *caléndula* al 5% en combinación con *alatoína* promueven una marcada epitelización en modelos de heridas experimentales en ratas, señalándose en este estudio una mayor intensidad en el metabolismo de glucoproteínas, nucleoproteínas y fibras colágenas durante el periodo regenerativo tisular (Klouček-Popova *et al.* 1982; Berti *et al.* 2003)

Las aplicaciones tópicas de *caléndula* han demostrado mejoría en procesos dermatológicos tales como **liquen, eczemas, dermatitis** (Piñeros *et al.* 1988).

Estudios en Gran Bretaña sugieren un papel inductor de la microvascularización en los extractos acuosos de las flores de *caléndula* aplicados sobre heridas de piel contribuyendo así a una más rápida **cicatrización** (Patrick *et al.* 1996).

El extracto hidroalcohólico exhibe actividad **antibacteriana** (frente a *Staphylococcus aureus, Streptococcus fecalis*), **antimicótico** frente a *Trichomona vaginalis* y **antiviral** (frente a virus influenza y virus herpes simple). El extracto orgánico de las flores de *caléndula* causa una inhibición, dosis y tiempo dependiente, de la transcriptasa inversa del HIV-1. Además los polisacáridos poseen un efecto adhesivo (efecto de adsorción), concentración dependiente, al tejido epitelial de la mucosa bucofaringea. Esta acción contribuye al efecto terapéutico en el tratamiento de la inflamación de la mucosa bucofaringea (Acosta, 1995; Vanaclócha *et al.* 2003).

Estudios experimentales realizados postulan que los esteroides como el *faradiol* y *taraxasterol*, presentan una actividad **antiedematosa** en test sobre orejas de ratas inyectadas con aceite de cortón (Zitterl *et al.* 1997)



En 1987 la West German Bundesgesundheitsamt basados en estudios en animales bajo inducción de carragenina confirman la actividad **antiinflamatoria** en caso de heridas o golpes, aunque no tiene un efecto mayor que los compuestos sintéticos usuales. Toshihiro Akihisa *et al* evaluó los alcoholes triterpénicos de las flores de *Caléndula officinalis* con respecto a su actividad **antiinflamatoria** contra la inflamación inducida con 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato-inducido (1 µg por la oreja) en los ratones. Mostrando una marcada actividad inhibitoria, (Toshihiro *et al.* 1996).

Las flores de caléndula han demostrado actividad **inmunomoduladora**. Los polisacáridos de caléndula estimulan la fagocitosis de células polimorfonucleares humanas, *in vitro*, este efecto también se muestra en ensayos *in vivo* en ratón. (Zahra 2000).



Piper angustifolium Ruiz et Pavón



e. *Piper angustifolium* Ruiz et Pavón

1) **Sinónimo**

Eupatorium glutinosum Lam.

2) **Nombres populares**

Matico (Bolivia y Perú), hierba del soldado, chuzalongo, migla.

3) **Situación taxonómica**

Reino: Plantae

División: Angiosperma (Anthophyta)

Clase: Dicotiledónea

Orden: Piperales

Familia: Piperaceae

Género: *Piper*

Especie: *Piper angustifolium*

4) **Origen y distribución**

Principalmente se encuentra en lugares donde el clima es templado tropical pero se ha encontrado ejemplares hasta a 3500 m.s.n.m.

Abunda de manera especial en el Perú, Ecuador, Bolivia, Paraguay, Brasil y norte de Argentina, prefiere los lugares húmedos en las orillas de los riachuelos, en los fangos, etc. Se adapta fácilmente a cualquier clima.

En el Herbario Nacional de Bolivia se encuentra depositada una sola especie de *Piper angustifolium* que fué recolectada de :: La Paz-Inquisivi: 1650-1780 msnm

5) **Descripción botánica**



Es una planta dicotiledónea semiarbusciva arbórea que alcanza una altura entre 1-3 metros

- **Tallo:** Cilíndrico, ramificado leñoso que a su vez presenta nudos prominentes y abultados.
- **Hojas:** Hojas opuestas de color verde brillante, simples sésiles, estipuladas enteras alternas, de apariencia muy rugosa por el haz y con las nervaduras sobresalientes en forma de malla por el lado del envés. miden 7-10 cm de largo por 2,5 a 3,5 cm de ancho, con bordes dentados y envés claro (albescente).
- **Inflorescencia:** espiga simple densa o compuesta con flores pequeñas hermafroditas aclamídeas desnudas acompañadas de una bráctea que va a tener un ovario supero con dos estambres.
- **Fruto:** Es una drupa
- **Semilla:** Inseminial

6) Composición química

En ensayos fitoquímicos se hallaron triterpenos, sustancias volátiles, flavonoides y otros.(Alonzo 1998)

- **Triterpenos:** *Friedelinol, friedelina, delta-amirenona, dammaradienilo.*
- **Sustancias volátiles:** *sesquiterpenos (gama-gurjuneno, beta-bisaboleno) parafinas.*
- **Flavonoides:** *kaempferol.*
- **Otros:** *guayanólidos, eupatorina, eupatilina y diterpenos*

7) Usos tradicionales

Se han realizado pocos estudios científicos con esta especie, a pesar de su alta valoración por la medicina popular.

Gonzales E. et al. estudiaron la actividad **citoprotectora** sobre un modelo experimental de lesiones necrosantes realizadas con etanol sobre la **mucosa gástrica** de ratones, Para ello se utilizó la infusión al 10% , la que luego de ser filtrada y liofilizada, se administró por vía oral en una dosis de 1g/kg . El resultado fue de 67.5% de efectividad en este tipo de lesión.



Las lactonas terpénicas del matico actúan a nivel de la *protein quinasa-C*, inhibiendo el metabolismo del ácido araquidónico y produciendo de esta manera un efecto **antiinflamatorio**. (Rios 1995).

También se estudiaron las actividad **antifúngica** y **bacteriostática** de los aceites esenciales de *Piper angustifolium*, dando activos contra *Trichophyton Mentagrophytes*, *Pseudomona aeruginosa*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, y *Escherichia coli*. (Tirillini *et al.* 1996).

Viendo la actividad farmacológica que presentan otras especies que componen este género encontramos los siguientes estudios científicos

En estudios realizados para determinar la actividad **antibacteriana** de los extractos crudos de algunas de las plantas medicinales normalmente usadas en Malasia, se evaluó extractos crudos de *Piper sarmentosum*, sobre cinco bacterias: *Staphylococcus aureus* *Methicillin* resistente, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, usando el protocolo normal de Método de Difusión de Disco. Las actividades antibacterianas se evaluaron por la presencia o ausencia de zonas de inhibición y valores de MIC. El extracto metanólico de *Piper sarmentosum*. Presenta una potente actividad contra bacterias gram positivos (*S. aureus* y *S. aureus Methicillin resistente*) Sin embargo no presenta efecto contra bacterias gram negativas (*E. coli* y *K. pneumoniae*) (Zaidan *et al.* 2005).

Los extractos etanólicos de tres especies de la familia *Piperáceas*, **la *Piper longum* L., *Piper ribesoides* Wall., y *Piper. sarmentosum* Roxb. ex Hunt**, Se probó la actividad **larvicida** sobre *Aedes aegypti* en el 4to estadio larvario. La eficacia larvicida más alta se dio con el *Piper longum* L., siguió por *Piper. sarmentosum* Roxb. ex Hunt y *Piper ribesoides* Wall, con los valores de LC₅₀ de 2.23, 4.06, y 8.13 ppm, respectivamente. (Chaithong *et al.* 2006)

Asimismo Batista-Pereira LG *et al* estudió la actividad de las **amidas del género *Piper*** contra la larva de *Spodoptera frugiperda* y los resultados muestran que la amida más



activa era N-[3-(3',4'-metilendioxfenil)-2-(E)-propenoil]piperidina con un LD₅₀ de 1.07 mg. (Batista-Pereira *et al.* 2006)

La pimienta negra (*Piper nigrum* L.) muestra actividad sobre el **cáncer del colon** inducido por la inyección hipodérmica en dosis de 20 mg/kg peso (15 dosis) en ratas por un carcinógeno colon-específico, 1,2-dimetilhidrazina.. Las ratas siguieron una dieta de la pelotilla normal más el *P. nigrum* L., 0.5% . Se observó la incidencia y número de tumores en el colon comprobando que con el *Piper nigrum* L. suprime la carcinogénesis del colon en presencia del procarcinógeno DMH. (Nalini *et al.* 2006)

Garavito G *et al.* demostraron la actividad **antimalárica** del extracto etéreo de las frutas y hojas *Piper Kunth* y *Piper holtonii* C. DC., evaluada en cultivo de *Plasmodium falciparum* cloroquina resistente y *Plasmodium berghei*.

Además de evaluó el efecto **anti-hepatotóxico** del extracto de las hojas de *Piper betel* induciendo lesión en ratas con la administración de tetracloruro de carbono (8%, ml/kg de peso corporal) tres veces por semana durante 4 semanas. El examen histológico mostró que el extracto de *Piper betel* protegió el hígado del daño inducido por el inductor. (Young *et al.* 2006).

Rubus boliviensis Focke



f. *Rubus boliviensis* Focke

1) Nombres populares

Kari-Kari, Wari chapi, Zarza común (Girault 1997)

2) Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Angiosperma (Anthophyta)

Clase: Dicotiledónea

Orden: Compuestas

Familia: Compositáceas

Género: *Rubus*

Especie: *Rubus boliviensis*

3) Origen y distribución

Es una planta espinosa originaria de los Yungas de La Paz Bolivia, propio de las regiones tropicales y sub tropicales. Podemos encontrarla en el Departamento de Cochabamba y los Valles de La Paz, así también en la región de Río Abajo.

La única *Rubus boliviensis* Focke depositada en el Herbario Nacional de Bolivia fué recolecta del Departamento de Santa Cruz, Provincia Florida, en el valle de “El Fuerte” Samaipata.

4) Descripción botánica

Arbusto sarmentoso que hecha todos los años vástagos nuevos de uno a dos metros de largo, los cuales encorvándose llegan a tocar el suelo y arraigan en el por su extremo; luego se endurecen y se vuelven leñosos y amargos de duros agujones forman zarzales a menudo impenetrables.

- **Hojas:** Se componen de cinco hojuelas desiguales, dispuestas de manera digitada, es decir, con sus respectivos pecíolos arrancando del extremo del pesón común, el cual también suele estar armado de agujoncitos. Las láminas foliares tienen bordes



dentados, y son verdes y casi lampiñas en la cara superior, blanquecinas y tomentosas en el reverso.

- **Inflorescencia:** Forman ramilletes en los extremos de las ramitas nuevas, Tienen el cáliz de cinco sépalos tomentosos y reflexos, la corola de cinco pétalos redondeados; los estambres son numerosos.
- **Fruto:** Es la zarzamora, constituido por numerosos frutículos negros, jugosos, con una sola semilla cada uno. Madura en verano, primero tiene color verde, después rojo, finalmente cuando están bien maduras toman coloración negra

5) Composición química

Esta es una especie que no fue muy estudiada en sus componentes fitoquímicos sin embargo se puede rescatar los siguiente:

- **Azúcares:** hasta un 7% levulosa
- **Acidos:** Acido cítrico, Acido láctico, Acido succinico, Acido oxálico, y Acido salicílico, vitamina C, ácido málico, ácido fórmico,
- **Otros:** Taninos, pectina, mucílagos, antocianidinas, resinas

6) Propiedades farmacológicas

Se han realizado pocos estudios científicos con esta planta, a pesar de ser muy usada en la medicina tradicional de la región.

Rocabado G. el año 2002 estudió las propiedades farmacológicas de la *Rubus boliviensis*. El extracto acuoso muestra actividad **antiinflamatoria** en modelos animales de inflamación aguda “edema plantar inducido por carregenina” con un porcentaje de actividad del 49,6% frente a sus controles diclofenaco e ibuprofeno. El extracto diclorometano muestra mayor actividad antiinflamatoria con un porcentaje de 63.2%. Además tanto el extracto acuoso como el diclorometano mostraron actividad **analgésica** en un porcentaje de 52.3 y 54% respectivamente en animales de experimentación siguiendo el modelo de analgesia química inducido por ácido acético. El efecto **gastroprotector** fue evaluado por la inducción de úlceras con etanol absoluto en esta prueba solo se testó el extracto diclorometano con un 62% de actividad frente al omeprazol, ranitidina y atropina que fueron los controles positivos. También se evaluó la actividad **antipirética** del extracto



diclorometánico en conejos, según el modelo descrito por Barástegui que consiste en el aumento de la temperatura basal inducido con peptona, dando un resultado de 90,9% de actividad frente al Ibuprofeno.

Sin embargo se puede rescatar información a cerca de este género, así se indica en diferentes publicaciones de revistas científicas actividad antimicrobiana, hipoglicemiante y ansiolítica.

Se evaluó la actividad anti-giardiasis del extracto metanólico de *Rubus coriifolius*, en infecciones inducidas por *Giardia lamblia* en ratones, usando metronidazol como control, determinando un resultado positivo si mataba más del 50% de los trofozoitos con dosis de 1,25 a 20 mg de extracto/Kg peso corporal, este estudio muestra que la *Rubus coriifolius* presenta actividad anti-giardiasis comparable con el metronidazol. (Barbosa *et al.* 2006).

F. A. Hamill estudia el extracto de *Rubus apetalus Poir*, estos muestran una actividad **antimicrobiana** contra el *Staphylococcus aureus* (CMI=62 µg/ml), *Streptococo faecalis* (16 µg/ml) y *Cándida albicans* (32 µg/ml). (Hamill 2003).

Los componentes aislados de *Rubus ulmifolius* como el quercetin-3-O-β--glucuronido; kaempferol-3-O-β--glucuronido, ácido gálico, ácido ferúlico, demostraron tener actividad **antibacteriana y antifúngica** (Panizzi *et al.* 2002).

Los taninos de *Rubus fruticosus* tienen actividad **antimicrobiana in vitro** por el método de dilución en agar frente a *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* *Staphylococcus hominis* *Staphylococcus cohnii* y *Staphylococcus warneri* (Djado *et al* 2000).

Se evaluó el extracto acuoso de las hojas de *Rubus fructicosis L.* como posible agente **hipoglicemiante**, en ratas inducidas a la diabetes con estreptozotocina, donde esta especie muestra actividad eficaz disminuyendo los niveles de glucosa en sangre. (Jouad *et al* 2002).

Se estudió que el extracto etanólico de *Rubus brasiliensis Martius* induce el efecto **ansiolítico** en ratas wistar machos y ratones suizos por vía oral, este efecto fue evaluado en la prueba del laberinto de cruz elevada. (Nogueira 1998).



2. DESCRIPCIÓN DE *Helicobacter pylori*



a. **HISTORIA DE *Helicobacter pylori***

Las primeras observaciones de bacterias espiraladas en el estómago humano y de animales se remontan a finales del siglo pasado y comienzos del actual. Bizzozzero en 1893 y Salomón en 1896 informaron la presencia de bacterias espirales en el estomago de gatos y perros.

En 1938, Doenges detecta también microorganismos espirales en estómagos estudiados pos-mortem en 1940 Freedberg y Barron describen su presencia en tejido gástrico de pacientes con enfermedad ulcera péptica o cáncer.

Steer 1975 recobró el interés por las bacterias del estómago y con un microscopio electrónico, observo la presencia de microorganismos asociados a una respuesta inflamatoria en la mucosa gástrica de enfermos con úlcera gástrica.

En paralelo con los primeros estudios sobre las bacterias espirales gástricas, adquiere interés la ureasa de la mucosa gástrica.

Fitzgerald y Murphy en 1950 estudian la mucosa gástrica en estómagos resecados por enfermedad ulceroso péptica y sugieren que la ureasa protege a la mucosa gástrica del ácido por la neutralización de este con amonio.

Al comienzo de 1980, Warren un patólogo y su colega Marshall un gastroenterólogo de Royal Perth Hospital, Wester Australia, observaron microorganismos espirales en las biopsias gástricas, teñidas con plata, de gran cantidad de pacientes con gastritis y úlcera péptica. Posteriormente, estudian 100 pacientes con sintomatología gástrica con el fin de identificar y definir la asociación de estas bacterias con gastritis y úlcera péptica.

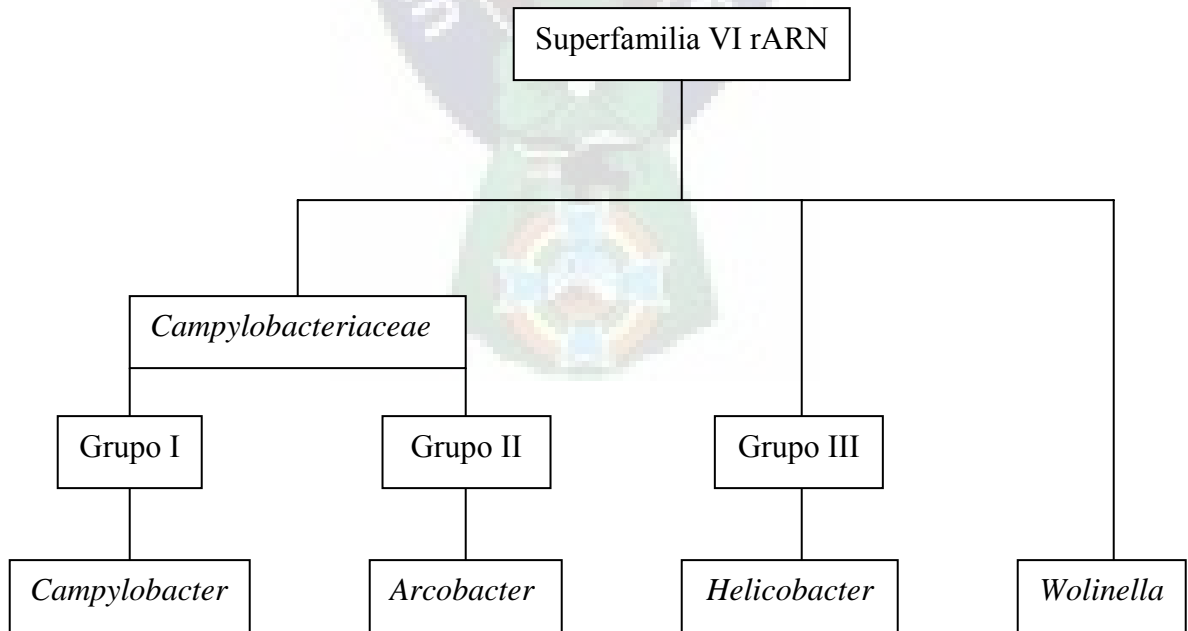
Con la colaboración de Goodwin, microbiólogo de dicho hospital, se realiza el cultivo de las biopsias, en condiciones similares a las utilizadas para el cultivo de *Campylobacter*. Las primeras 34 muestras se incubaron durante 48 horas y los cultivos fueron negativos. Accidentalmente, por coincidir con las vacaciones de Semana Santa, las

siguientes biopsias se incubaron durante 6 días, con lo que se consiguió aislar *Helicobacter pylori*, inicialmente a esta bacteria se la denominó “*Campylobacter – like organism*” por su semejanza con las bacterias de este género, posteriormente, por creer que se trataba de una nueva especie lo denominaron *Campylobacter pyloridis*.

El año 1995, la agencia internacional para la investigación del cáncer declaró al *Helicobacter pylori* como agente carcinógeno numero uno para el adenocarcinoma gástrico.

En el año 2005 el jurado del Instituto Karolinska de Estocolmo Suecia, encargado de conceder el Premio Nobel de Medicina, resalta la tenacidad de los científicos Australianos Barry J. Marshall y J Robin Warren a la hora de cuestionar los dogmas establecidos en torno a la gastritis y la úlcera de estómago o de duodeno. Ambos científicos demostraron que *Helicobacter pylori* era la causa de ambos trastornos. Estos hallazgos trascendentes en el mundo de la gastroenterología dieron como resultado el “Premio Nóbel de Medicina 2005” a los australianos.

b. CLASIFICACIÓN TAXONOMICA



Componentes de la Superfamilia VI de rARN [Vandamme et al., 1991].

Helicobacter pertenece al subgrupo más pequeño de las proteobacterias. Dentro de este subgrupo todas las bacterias son bacilos gram negativo, delgados, y pueden ser rectos, curvados o helicoidales. Las proteobacterias tienen una clase, *Campylobacteres*, un orden, *Campylobacterales* y dos familias, *Campylobacteraceae* y *Helicobacteraceae*. Los dos géneros más importantes son *Campylobacter* y *Helicobacter*, se ubican en la Sección 2 de la primera edición del Manual Bergey, dada su condición morfológica de ser bacilos gramnegativos, microaerófilos, móviles, helicoidales o vibrioides (Prescott *et al.*, 2000).

c. ESPECIES DEL GENERO *Helicobacter*

Se han reportado más de 14 especies pertenecientes al género *Helicobacter* de distinta localización y de diferentes aislamientos, ya sea mucosa gástrica, heces, hígado, etc. de los seres humanos, los perros, los gatos y otros mamíferos.

Especies del genero *Helicobacter* y microorganismos relacionados

Especie	Huésped	Localización del aislamiento
<i>H. acinoyxys</i>	Leopardos cheeteh	Mucosa gástrica
<i>H. bilis</i>	Ratones	Bilis, Hígado, intestino
<i>H. bizozeronii</i>	Perros	Mucosa gástrica
<i>H. canis</i>	Perros, hombres	Heces
<i>H. cinaedi</i>	Hombres, hámster	Sangre, hisopado rectal (hombre),intestino hámster
<i>H. felis</i>	Gatos, perros	Mucosa gástrica
<i>H. fennelliae</i>	Hombre	Sangre, hisopado rectal
<i>H. hepaticus</i>	Ratones	Hígado, intestino
Especie de <i>Helicobacter</i> cepa Mainz	Hombres	Articulación de la rodilla, sangre
<i>H. muridarum</i>	Ratas, ratones	Intestino
<i>H. mustelae</i>	Hurones	Mucosa gástrica
<i>H. nemestrinae</i>	Monos macacos de cola de cerdo	Mucosa gástrica
<i>H. pametensis</i>	Aves silvestres, cerdos golondrinas de mar.	Heces



Especie	Huésped	Localización del aislamiento
<i>H. pylori</i>	Hombres, monos, gatos	Mucosa gástrica
" <i>Flexispira rappini</i> " (" <i>H. rappini</i> ")	Ovejas, perros, hombres	Hígado (ovejas), estomago (perros), heces (hombre)
" <i>Gastrospirillum hominis</i> " (" <i>H. heilmannii</i> ")	Leopardo cheeteh, hombre	Mucosa gástrica
CLO-3	Hombre	Hisopado rectal

"Elmer Koneman. Diagnostico Microbiologico"

d. *Helicobacter pylori*.

1) Generalidades

H. pylori se encuentra en el tejido epitelial gástrico estas células son secretoras de moco. Se ha demostrado que es la principal causa de la gastritis crónica, ulcera péptica, cáncer gástrico y linfoma de MALT, además de otras patologías extragastrointestinales.

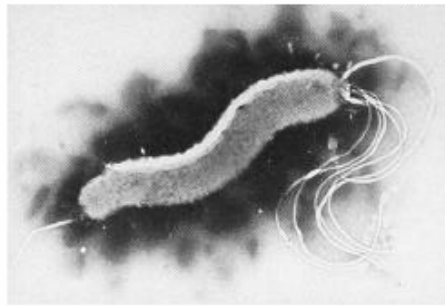
Requiere condiciones especiales para su desarrollo por ser de crecimiento lento, condiciones de microaerofilia (85% de nitrógeno 10% de dióxido de carbono y 5% de oxígeno) y se desarrolla a temperatura de 37°C. El crecimiento en medio líquido se ve favorecido por la agitación.

Es catalasa, oxidasa y ureasa positiva. La morfología de sus colonias se caracteriza por el pequeño tamaño de las mismas y su aspecto brillante. Tras subcultivos prolongados aparecen las denominadas formas cocoides, metabólicamente activas pero inviables para ser cultivadas de nuevo *in vitro*.

2) Morfología Bacteriana

Helicobacter pylori es un microorganismo gram-negativo, estructura morfológica bacilar-espiral (estado viable para el cultivo), en forma de S, U, alas de gaviota o rara vez largos, su tamaño generalmente es de 2,5µm a 5µm de largo y de 0,5µm a 1µm de ancho, no forman esporas, son móviles por que poseen de 3 a 5 flagelos lofotricos en uno de sus

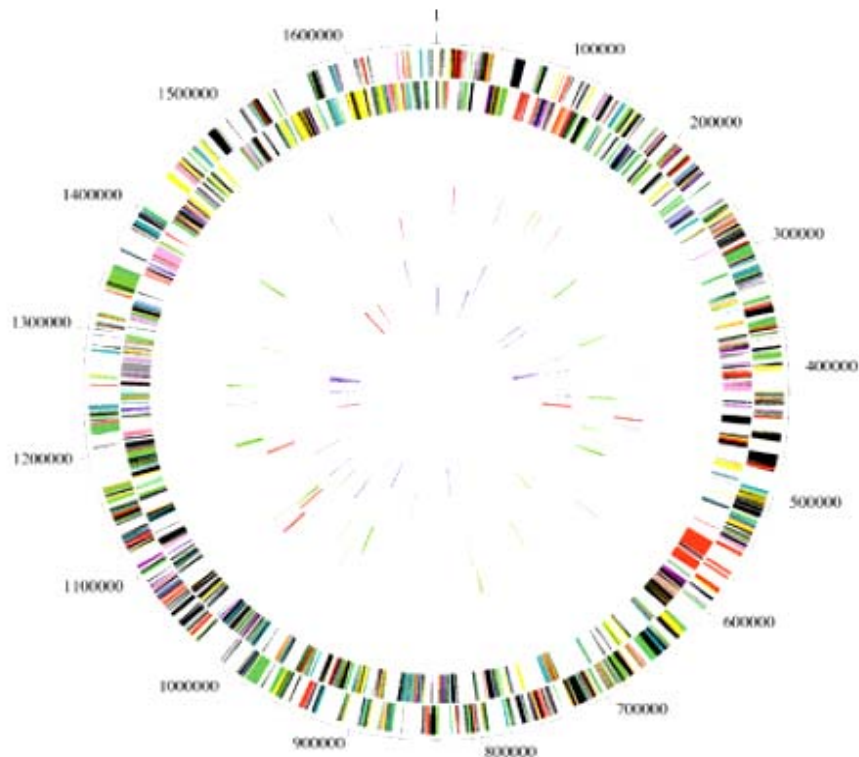
extremos. Es polimórfico ya que posee estructura cocoide que se observa en cultivos viejos (estado no viable para el cultivo).



Vista en microscopio electrónico

3) Genoma.

Tomb *et al.* en 1997 describieron la secuencia completa del genoma de *Helicobacter pylori* en la cepa 26695. La secuencia se obtuvo por métodos de secuenciación randomizada, que previamente se habían utilizado en la obtención del genoma de *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma genitalium* y *Methanococcus jannaschii*.



Representación circular del cromosoma de *Helicobacter pylori* 26695

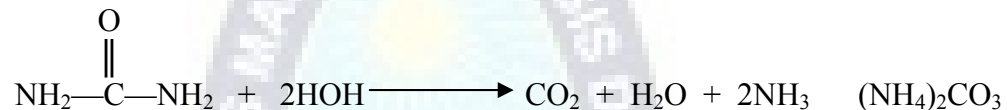
<http://www.tigr.org/tdb/mdb/hpdb/hpdb.html>

Aproximadamente el 40 % de los aislamientos de *H. pylori* presentan plásmidos, con un tamaño que oscila entre de 1,5 a 23,3 kb, pero no contienen ninguno de los factores de virulencia conocidos (Minnis *et al.*, 1995).

4) Identificación bioquímica

a) Prueba de la urea:

Helicobacter pylori es una bacteria que tiene la capacidad de desdoblar a la urea que es una di-amida del ácido carbónico por poseer el enzima Ureasa. El amoniaco reacciona en solución para formar carbonato de amonio, lo que produce alcalinización y aumento del pH del medio.



b) Prueba de la catalasa:

Helicobacter pylori posee la enzima catalasa que descompone el peroxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno, es una hemoproteína de estructura similar a la hemoglobina, excepto por que los cuatro átomos de hierro de su molécula están en el estado oxidado (Fe^{+3}), en lugar del estado reducido (Fe^{+2}).



c) Prueba citocromo oxidasa:

Helicobacter pylori también posee el enzima Citocromo Oxidasa. Los citocromos son proteínas que contienen hierro y actúan como ultimo eslabón de la cadena respiratoria aerobia; transfieren electrones (hidrógeno) al oxígeno, con la formación de agua. El sistema citocromo se encuentra en microorganismos aerobios o microaerofilicos y anaerobios facultativos, de tal forma que la prueba de Oxidasa es importante para identificar microorganismos que carecen de la enzima o son anaerobios obligados.

La prueba de la Citocromo Oxidasa utiliza ciertos colorantes como el que sustituye al oxígeno como aceptante artificial de electrones. En estado reducido el colorante es incoloro;

sin embargo, en presencia de Citocromo Oxidasa y de oxígeno atmosférico la p-fenilendiamina se oxida y forma azul de indofenol.

5) Técnicas para el Diagnóstico de *Helicobacter pylori*.

Se ha descrito diversas técnicas, para la identificación de *Helicobacter pylori*.

- * **Directa:** Que puede ser por cultivo, histología y ureasa
- * **Indirecta:** Que puede ser por serología o carbono marcado y ambos tienen la finalidad de detectar anticuerpos producidos por el huésped contra el *Helicobacter pylori*.

Comparación de los Diferentes Métodos Diagnósticos

	Método	Muestra	Sensibilidad [S] Especificidad [E]	Comentario técnico	Costo (diferente en cada país)
INVASIVOS	Ureasa	Mucosa Gástrica	S: 89,6% E: 100%	Fácil	Bajo
	Histología	Mucosa Gástrica	S: 93,1% E: 99%	Patólogo Experto,	Medio
	Cultivo	Mucosa Gástrica	S: 98,4% E: 100%	Microbiológico experto	Bajo/alto
NO INVASIVOS	Serología	Sangre total	S: 85% E: 78%	Fácil Rápido	Bajo
		Cuantitativa	S: 91,3% E: 91,6%	Mayor Dificultad	Medio
		Saliva	S: 84% E: 70%	Mayor Dificultad	Medio
	¹³ C-Urea	Aliento	S: 90,2% E: 95,8%	Fácil Espectrómetro	Medio
¹⁴ C-Urea	Aliento	S: 97% E: 95%	Láser, infrarrojo Fácil Radiactivo	Medio	

Ninguna de estas técnicas es perfecta y que cada una tiene sus ventajas y desventajas.

La clasificación más aceptada de los métodos diagnósticos para la identificación de *Helicobacter pylori* está dividida de acuerdo al tipo de técnica utilizada, es así que se divide



en técnicas invasivas (método endoscópico: histología, citología, prueba rápida de la ureasa, cultivo microbiológico y reacción en cadena de la polimerasa) y técnicas no invasivas (serología de sangre total técnica cualitativa y de suero técnica cuantitativa).

a) Método Histológico.

El estudio histológico de la biopsia permite conocer las lesiones de la mucosa además de detectar la infección por *H. pylori*. La confirmación histológica de la inflamación de la mucosa es fundamental para el diagnóstico de la gastritis y su clasificación. Además permite detectar zonas de metaplasia intestinal.

La técnica de tinción a partir de biopsia gástrica es una técnica fácil, rápida, de muy bajo costo y alta utilidad en el estudio de la infección por el microorganismo. Se han utilizado diferentes tinciones como la de Gram, Gram modificada o bien el examen en fresco utilizando un microscopio con contraste de fases. Otras tinciones son útiles. Entre ellas destacan las tinciones de giemsa, carbolfuccina, genta, la tinción triple de carbolfuccina/azul de Alcina/hematoxilina-eosina y tinciones de inmunohistoquímica.

Para conseguir una buena sensibilidad se recomienda partir de dos biopsias, una de antro y otra de cuerpo. La sensibilidad varía del 85% al 90%, mientras que la especificidad es casi del 100%, es muy importante resaltar la experiencia del patólogo en este procedimiento.

b) Prueba Rápida de la Ureasa.

En aquellos pacientes en los que se realiza un examen endoscópico, esta prueba es de elección por su sensibilidad, rapidez y bajo costo para confirmar la presencia de *Helicobacter pylori*.

Esta técnica es fundamentada en que el *Helicobacter pylori* es un microorganismo productor de la enzima ureasa en grandes cantidades. Este tipo de reacción alcalina modifica al indicador rojo fenol por la variación de pH el mismo que cambia de color que va de amarillo a rojo fucsia.



La sensibilidad de la prueba de la ureasa depende del número de bacterias presentes en la biopsia, cuando se tienen 2 biopsias de antro y dos de cuerpo, se estima una sensibilidad del 85% al cabo de una hora y hasta del 95% a las 24 horas.

c) **Cultivo.**

La sensibilidad de esta técnica es menor en comparación con otras, que va del 50 al 70%, sin embargo la especificidad es del 100% no obstante varía notablemente en relación con diferentes variables como la recogida, transporte y almacenamiento de la muestra, los medios de cultivo utilizados y las condiciones de incubación (porcentaje de CO₂ y humedad, principalmente). Se puede considerar como un método tedioso e incluso de difícil realización, pero debe efectuarse de rutina si se realiza la endoscopia ya que aporta un gran número de ventajas en el estudio de la bacteria. Entre ellas destaca el conocimiento de la sensibilidad a los diferentes antimicrobianos, la caracterización de factores de virulencia y la posibilidad de tipificación de cepas con fines epidemiológicos.

Los medios de cultivo sólidos base más frecuentes son agar Mueller-Hinton y agar Columbia y los suplementos más comúnmente empleados son la sangre o derivados de ella. Otros suplementos son el suero de caballo, lisado de eritrocitos y hemina, extracto de levadura, peptona, e Isovitalax, si bien los resultados no son mejores que los obtenidos con suero bovino fetal o sangre. Dos aspectos importantes a considerar en relación con la sangre son, en primer lugar la cantidad utilizada, ya que un aumento en la proporción al 7-10% mejora significativamente el crecimiento en comparación con el 5%. En segundo lugar el tipo de sangre utilizada, encontrándose un crecimiento más denso con sangre de caballo al 10% y lisada al 7%.

Con el objeto de evitar el sobrecrecimiento de contaminantes que pueden acompañar a *H. pylori* en la biopsia es necesaria la utilización de inhibidores que no afecten su viabilidad. *H. pylori* es resistente *in vitro* a la vancomicina, sulfametoxazol, trimetoprim, cefsulodina y polimixina B, los cuales pueden utilizarse en los medios selectivos para su aislamiento.

H. pylori es un microorganismo microaerofílico que requiere para su crecimiento una atmósfera con las siguientes características: 5-10% de O₂, 5-10% de CO₂ y 80-90% de N₂ a



35-37°C, una humedad del 95% y una incubación de hasta 7 días antes de considerar negativo el cultivo. Estas condiciones se obtienen bien utilizando cabinas de microaerofilia o con sobres comerciales que proporcionen las características anteriores.

d) Reacción en cadena de la Polimerasa

Con la aparición de las pruebas moleculares se ha podido detectar *H. pylori* en muestras que no son de biopsias gástricas sino de placa dental, aftas bucales, saliva, jugos gástricos y heces ofreciendo una mejor alternativa para el diagnóstico clínico y para estudios de investigación relacionados con su modo de transmisión.

El diagnóstico por PCR de *H. pylori* tiene una sensibilidad y especificidad del 95 % y su principal ventaja es que se puede detectar el microorganismo sin importar la viabilidad por esta razón que en los últimos años se ha diseñado una variedad de pruebas diagnósticas para esta bacteria.

Esta técnica se basa en: Oligonucleótidos provenientes del gen de la ureasa A (*ureA*), genes que codifican el 16s ARN ribosomal (*16s rRNA*), genes codificadores de los antígenos especie específicos (*SSA*, *cagA*), oligonucleótidos provenientes de secuencias al azar (*ramdon sequence*), oligonucleótidos provenientes del gen de la fosfoglucoamin mutasa (*glmM*). Oligonucleótidos que determinan variantes alélicas del gen *vacA*.

e) Serología

Es una técnica no invasiva, de gran beneficio en aquellos pacientes que no toleran la endoscopia, las técnicas serológicas utilizadas varían de una técnica a otra, una prueba serológica se realiza en sangre capilar o venosa en el que se determinan títulos de IgG anti-*Helicobacter pylori* por el método de detección cualitativa de inmunocromatografía. Esta técnica puede resultar un poco confusa ya que los títulos de inmunoglobulinas tardan de 6 a 12 meses en descender un 50 % y ello se considera signo de erradicación, sin embargo a títulos bajos de inmunoglobulinas puede seguir existiendo *Helicobacter pylori*.



f) Prueba del aliento con urea marcada con isótopos.

Es una técnica segura, cómoda, sensible y específica y actualmente utilizan algunos laboratorios para el diagnóstico en niños.

Se realiza mediante la ingestión de una solución de urea marcada con C^{13} o C^{14} , el *Helicobacter pylori* produce secreción de gran cantidad de la enzima ureasa, el mismo que degrada la urea, y después de 30 minutos a 45 minutos el paciente debe espirar el aire en unas bolsas contenedores que se llevan a analizar a un contador de centelleo para examinar el C^{13} o C^{14} de las muestras espiradas.

6) Epidemiología

Se conoce que la infección por *Helicobacter pylori* es elevada en países en vías de desarrollo, donde la mayoría de la población (80% aproximadamente) se infectan con *H. pylori* a una edad promedio de 10 años; fenómeno que al parecer está relacionado con las pobres condiciones sanitarias, observación apoyada por la aparente transmisión fecal-oral de la infección, la alta prevalencia en los niveles socioeconómicos más bajos de la población, y el rol del agua en la propagación de la bacteria. Se ha encontrado a *Helicobacter pylori* en el agua para consumo humano y en aguas servidas, identificándose como factores de riesgo para adquirir la infección el consumo de vegetales crudos irrigados con aguas servidas no tratadas. La mejora en la disposición de excretas, cloración del agua, preparación higiénica de alimentos, disminución del hacinamiento, y educación disminuiría los niveles de infección por *Helicobacter pylori*.

Se ha determinado que aproximadamente la mitad de la población mundial está infectada con esta bacteria. Si bien la mayoría de estos pacientes infectados permanecen prácticamente asintomáticos por el resto de sus vidas, hay evidencias sólidas de que *Helicobacter pylori* tiene un papel patogénico importante en algunas enfermedades digestivas, actualmente es una de las bacterias más estudiadas por ser el principal agente en el desarrollo de la enfermedad ulcero péptica, gastritis crónica activa y el adenocarcinoma gástrico (Zamudio 2001).



En Estados Unidos la incidencia anual de infección se presenta entre el 0.5% y el 1% para menores de 10 años y la infección aumenta hasta en un 50% en adultos, con un promedio de edad de 60 años.

En países de Latinoamérica como Costa Rica y Brasil se reporta una incidencia anual de 45 enfermos de cáncer gástrico asociado a *H. pylori* por cada 100 000 habitantes.

En México se han observado regiones de mayor riesgo, como las zonas altas del Estado de Chiapas donde existen grupos indígenas que presentan una alta incidencia de cáncer gástrico asociado a *H. pylori*. De un estudio de 11,605 sueros procedentes de personas cuya edad fluctuó entre 1 a 90 años. Los resultados mostraron que el 20% de los niños de 1 año de edad presentaban anticuerpos contra *H. pylori* y que la seropositividad aumentó hasta un 50% en los niños de 10 años, lo que indicaba que la infección por el microorganismo se adquiere a edades tempranas y alcanza un 80% en los adultos jóvenes entre los 18 y 20 años de edad.

En Chile, en un estudio reciente determinó la seropositividad para *H. pylori* en 1815 niños y jóvenes de Santiago y Punta Arenas. Los resultados muestran que a los 5 años de edad, el 50% del grupo socioeconómico bajo y el 18% del grupo más alto están ya infectados. Entre los 25 y 35 años, la prevalencia alcanzó al 70% en los grupos socioeconómicos bajo y medio y 40% en el grupo socioeconómico más alto.

Además se ha observado que en el sexo femenino al parecer existe mayor posibilidad de infección que en el sexo masculino.

Helicobacter pylori es el agente etiológico en un 70% a un 80% de la forma más común de inflamación gástrica crónica denominada gastritis atrófica crónica tipo B.

7) Patología y Fisiopatología asociada a *Helicobacter pylori*

Existen una diversidad de patologías que son consecuencia de la infección por *H. pylori*, el lugar conocido como su hábitat natural es el estomago, principalmente el antro pilorico.

La mucosa gastrointestinal es considerada una zona estéril por médicos, patólogos y profesionales en salud, sustentada en base a que está protegida por distintos mecanismos

- La producción por la mucosa de moco y HCO_3 origina un gradiente de bajo pH entre la luz del estómago y la mucosa que mantiene el pH neutro. El moco se comporta como una barrera para la difusión de ácido y pepsina
- Las células epiteliales eliminan el exceso de iones hidrógeno por medio de sistemas de transporte en la membrana y tienen uniones oclusivas, las cuales impiden la retrodifusión de los iones hidrógeno
- El flujo sanguíneo de la mucosa elimina el exceso de ácido que ha difundido a través de la capa epitelial. Las células epiteliales son también un órgano muy noble ya que participa en la reparación constante de la mucosa y el mantenimiento de su integridad, para este cometido se han implicado varios factores de crecimiento y varias prostaglandinas.

a) **Gastritis**

Se define como una inflamación de la mucosa gástrica y se puede clasificar de acuerdo a la patología que presenta, puede ser erosiva y no erosiva, en función de la gravedad de la lesión de la mucosa puede clasificarse según el lugar de afectación en el interior del estómago (es decir, cardias, cuerpo, antro y fondo). También se puede clasificar a la gastritis de acuerdo a la inducción de células inflamatorias en aguda o crónica. Hasta la fecha ningún esquema de clasificación está completamente acordado por los congresos de profesionales, y no concuerdan perfectamente con la fisiopatología; en la mayoría se puede observar solapamientos entre sí.

- Gastritis aguda: Se caracteriza por una infiltración de células polimorfonucleares en la mucosa de antro y de cuerpo.
- Gastritis crónica: Se caracteriza por presentar niveles de atrofia o de metaplasia. Afecta predominantemente al antro con pérdida subsiguiente de células G y disminución de la secreción de gastrina y al cuerpo con pérdida de glándulas oxínticas, lo que conduce a reducción de ácido, pepsina y factor intrínseco.



i. Gastritis erosiva aguda

Son causas principales en esta patología, los fármacos especialmente los AINEs, el alcohol y el estrés agudo, causas menos frecuentes son la radiación, infecciones virales (p. ej., citomegalovirus), lesiones vasculares y traumatismos directos durante la endoscopia.

ii. Gastritis erosiva crónica

Se define por la presencia de múltiples úlceras puntiformes o aftosas, puede ser idiopática o causada por fármacos, la aspirina y los AINEs, la enfermedad de Crohn y la infección por *H. pylori* parece no tener un papel importante en la patogenia de este trastorno.

iii. Gastritis no erosiva

Helicobacter pylori es la causa principal de la gastritis no erosiva. Este microorganismo gram negativo es la causa de casi todos los casos de gastritis no erosiva y sus complicaciones resultantes. La infección conduce invariablemente a inflamación de la mucosa gástrica, la cual a su vez altera la fisiología secretora gástrica, haciendo que la mucosa sea más susceptible a las lesiones por el ácido. Se ha encontrado que las máximas concentraciones de *H. pylori* se detectan en el antro pilórico, donde la infección puede aumentar considerablemente hasta producir riesgo de ulceración prepilórica y duodenal. En algunos pacientes la infección afecta a la totalidad del estómago y se asocia al desarrollo subsiguiente de úlceras gástricas y de adenocarcinoma gástrico.

- **Gastritis superficial.** Las células inflamatorias que predominan en este trastorno son linfocitos, células plasmáticas y neutrófilos, la inflamación superficial puede afectar al antro, al cuerpo y fondo. La mayoría de los pacientes albergan el microorganismo con sólo mínimas alteraciones histológicas y ninguna sintomatología clínica perceptible.
- **Gastritis profunda.** Las células mononucleares y los neutrófilos predominan en la totalidad de la mucosa incluso hasta el nivel de la capa muscular, puede presentar síntomas como la dispepsia, rara vez hay exudados o abscesos en las criptas. Las lesiones se distribuyen de forma irregular, pudiendo coexistir con una gastritis superficial. Puede existir atrofia glandular parcial y metaplasia.



- **Gastritis Atrófica.** En esta patología se atrofia las glándulas gástricas y se puede deber a diversas lesiones, a menudo es secundaria a la gastritis antral (tipo B) prolongada. Algunos pacientes con gastritis atrófica presentan auto-anticuerpos dirigidos contra las células parietales, generalmente en asociación con gastritis del cuerpo (tipo A) y anemia perniciosa. No existen síntomas específicos, en la endoscopia la mucosa puede tener un aspecto normal, hasta que la atrofia está avanzada y el árbol vascular submucoso puede entonces hacerse visible. Cuando la atrofia llega a ser completa, la secreción ácida y péptica disminuye y puede desaparecer el factor intrínseco con resultado de mal absorción de vitamina B₁₂.

b) **Anemia perniciosa**

La anemia perniciosa es una anemia megaloblástica causada por mala absorción de la vitamina B₁₂. En este trastorno, la atrofia de las glándulas gástricas es intensa, con pérdida de células parietales y una incapacidad para secretar factor intrínseco, un cofactor indispensable en la absorción de la vitamina B₁₂. El antro está ileso en un porcentaje mayor 80% de los pacientes (gastritis tipo A).

En la anemia perniciosa, el 90% de los pacientes tienen anticuerpos a las células parietales y sus componentes, incluidos anticuerpos al factor intrínseco y a la bomba de protones, la H⁺, K⁺-ATPasa. De los familiares de pacientes con anemia perniciosa, 10 a 20% presentan una gastritis análoga a la de la anemia perniciosa, un 65% presentan anticuerpos a las células parietales y un 20% anticuerpos al factor intrínseco. Datos recientes indican también que la anemia perniciosa en algunos pacientes puede haber sido una consecuencia de la infección por *H. pylori*. La gastrectomía, la supresión crónica del ácido con bloqueadores H₂ o inhibidores de la bomba de protones y el mixedema causan una deficiente secreción de factor intrínseco similar; rara vez es congénita.

El riesgo relativo de adquirir un adenocarcinoma gástrico en la anemia perniciosa es tres veces mayor que en controles de la misma edad, aunque la cuestión de la vigilancia endoscópica para la detección selectiva del cáncer no se ha formulado. No se necesita tratamiento, salvo la reposición de la vitamina B₁₂.

c) **Úlcera péptica**

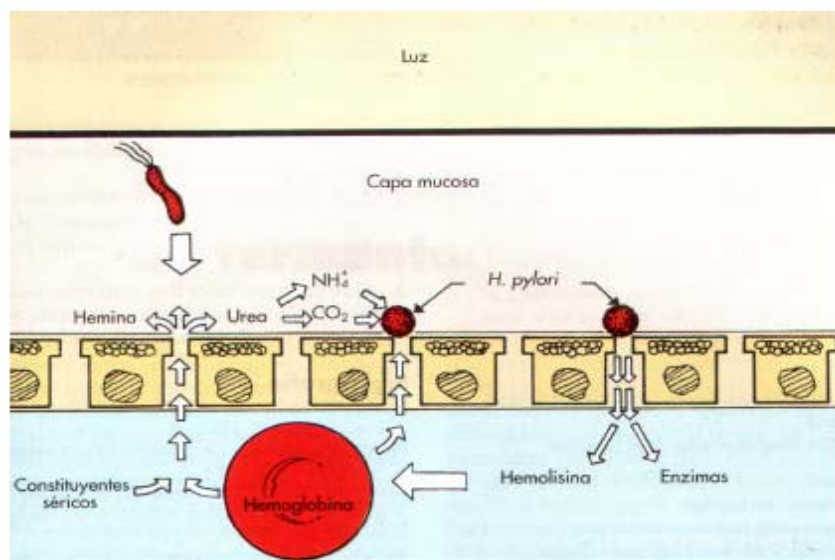
Segmento irritado de la mucosa gastrointestinal, típicamente en el estómago (úlceras gástricas) o en los primeros centímetros del duodeno (úlceras duodenales), que penetra a través de la capa muscular de la mucosa.

Las úlceras pueden oscilar en tamaño desde varios milímetros a varios centímetros. Las úlceras se diferencian de las erosiones por la profundidad de la penetración; las erosiones son más superficiales y no afectan a la capa muscular de la mucosa.

Debido a que el conocimiento del papel central de *Helicobacter pylori* en la patogenia de la enfermedad acidopéptica es cada vez mayor, el diagnóstico y el tratamiento de la úlcera péptica han cambiado de manera espectacular.

i. **Etiología y patogenia**

Aunque las teorías tradicionales acerca de la patogenia de las úlceras pépticas se concentran en la hipersecreción ácida, este hallazgo no es universal, y hoy se sabe que la hipersecreción no es el mecanismo primario por el cual se producen la mayoría de las ulceraciones. Parece ser que ciertos factores, como *Helicobacter pylori* y los AINE, perturban la defensa y la reparación de la mucosa normal haciendo que la mucosa sea más susceptible al ataque ácido.



Representación esquemática de la colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori*



Los mecanismos mediante los cuales *Helicobacter pylori* causa la lesión de la mucosa no están aclarados del todo, pero se han propuesto varias teorías. El organismo móvil avanza con rapidez a través del mucus viscoso hacia los factores de crecimiento quimiotácticos urea y hemina, presentes en las criptas gástricas, la ureasa producida por el microorganismo cataliza la transformación de urea en amoníaco. El amoníaco, al mismo tiempo que permite al microorganismo sobrevivir en el entorno ácido del estómago, puede erosionar la barrera mucosa y producir una lesión epitelial. Las citotoxinas producidas por *Helicobacter pylori* se han implicado también en la lesión epitelial del huésped. Las enzimas mucolíticas (ej., proteasas, lipasas bacterianas) parecen estar involucradas en la degradación de la capa mucosa, haciendo al epitelio más susceptible al daño ácido. Por último, las citocinas producidas en respuesta a la inflamación pueden representar un papel en el daño de la mucosa y la ulcerogénesis subsiguiente. (Murria *et al* 1997)

ii. Síntomas y signos

Los síntomas dependen de la localización de la úlcera y la edad del paciente; muchos pacientes, especialmente los ancianos, tienen pocos síntomas o incluso ninguno. El dolor es el síntoma más frecuente; suele localizarse en el epigastrio y se alivia con alimento o antiácidos. El dolor se describe como quemante, ardiente o como sensación de hambre. El curso es habitualmente crónico o recurrente. Sólo alrededor de la mitad de los pacientes presentan el patrón característico de los síntomas.

d) Cáncer de estómago

En el año 1994 la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer de la Organización Mundial de la Salud (IARC) incluyó a *Helicobacter pylori* como agente biológico carcinógeno para el hombre (categoría 1) basándose en evidencias epidemiológicas que le asocian con cáncer gástrico.

Por otra parte el papel de *Helicobacter pylori* en el cáncer gástrico también se comprende porque la gastritis crónica es un factor de riesgo para el desarrollo de este tipo de cáncer. Además, el 70% de los pacientes con cáncer gástrico son positivos a esta bacteria.



e) **Linfoma de MALT**

Los linfomas gástricos y los linfomas del tejido linfoide asociado con la mucosa también se han vinculado con esta infección. Son poblaciones linfoides de células B malignas restringidas monoclonalmente causadas por *Helicobacter pylori*. Este trastorno se asocia con frecuencia a una úlcera gástrica superficial y se descubrió de pasada en biopsias del borde ulcerado y de la mucosa que lo rodea. La erradicación de *Helicobacter pylori* puede curar algunos casos de linfoma MALT. Por tanto, es adecuada para tratar un linfoma MALT localizado con tratamiento anti-*Helicobacter pylori*, para documentar la cura bacteriana y monitorizar estrictamente la progresión del tumor antes de proceder a la quimioterapia o la cirugía radical. No existen datos que indiquen que la erradicación de *Helicobacter pylori* evite la progresión de la gastritis a cánceres o linfomas del estómago más frecuentes. Por tanto, no existe una razón científica para diagnosticar y tratar *Helicobacter pylori* para prevenir complicaciones malignas, especialmente porque el cáncer de estómago es relativamente infrecuente en Estados Unidos.

8) **Terapia**

Los primeros intentos de tratar la infección de *Helicobacter pylori* con un solo antibiótico tuvieron éxito en la eliminación de la úlcera pero no al prevenir la recurrencia de la infección después del tratamiento. Estos antibióticos por sí solos erradicaban completamente la bacteria *in vitro*, pero *in vivo* solo disminuyen el número de *H. pylori*. Esto se debe a que en los pacientes la bacteria se encuentra dentro de la capa mucosa gástrica o en el lugar de la inflamación, que son de difícil acceso para el antibiótico, y además el medio ácido del estómago puede afectar a la estabilidad de algunos antibióticos y otros principios activos .

Por lo tanto, actualmente, se utiliza la combinación de varios fármacos para luchar contra esta infección. Actualmente tan sólo 3 grupos de fármacos resultan ser realmente eficaces, utilizados en combinación, frente a *Helicobacter pylori*, y son los siguientes:

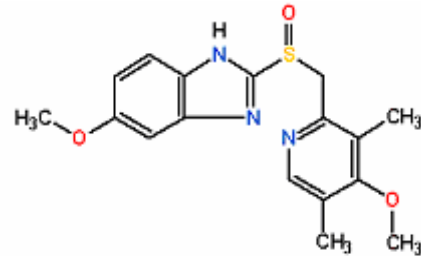
Inhibidores de la bomba de protones

- Omeprazol



- Lansoprazol
- Pantoprazol.

El omeprazol es un profármaco, ya que él mismo no interacciona con la bomba de protones, sino que requiere la conversión posterior de su forma protonizada en un compuesto tetracíclico activo (el derivado sulfonamido) por el medio ácido existente en el canalículo secretor de la célula parietal. Este compuesto reacciona rápidamente formando uniones disulfuro con los residuos cisteína de la cadena del sector luminal de la ATPasa-H⁺/K⁺ y origina el denominado complejo inhibitorio.



Estructura química omeprazol

La monoterapia con omeprazol logra aclarar, pero no erradicar, la bacteria. Se ha visto que el germen no coloniza en medios con hipoacidez, como en pacientes con gastritis crónica atrófica, ya que se dificulta la acción ureasa bacteriana. Sin embargo, el mayor efecto de los inhibidores de la bomba de protones consiste en mejorar la acción de los antibióticos, en especial de la amoxicilina, al mantener valores de pH intragástrico superiores a 5 con los que es máxima la actividad antimicrobiana de estos fármacos.

Compuestos de bismuto:

- Subsalicilato de bismuto
- Ranitidina-citrato de bismuto

Si existe un medio ácido, se quela a los aminoácidos y glucoproteínas del nicho ulceroso. Forma un coágulo blanquecino insoluble que se une tenazmente a la superficie ulcerada, de la cual no puede ser eliminada al mezclarse con el contenido gástrico, o por la peristalsis, y evita la actuación de los distintos agentes agresivos.

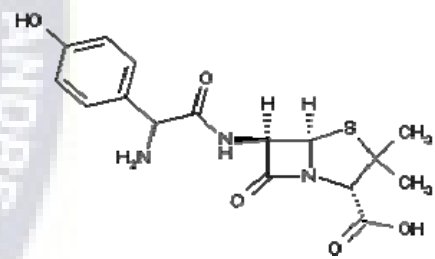
El único grupo de fármacos clásicos que cuentan con propiedades para aclarar el germen a corto plazo, pudiendo erradicarlo hasta en el 10 % de los casos. Tiene acción bactericida

máxima a los 30-60 min de la ingesta y decae a las 4 horas. Es activo tópicamente y produce la degradación bacteriana cerca de la superficie.

Antibióticos:

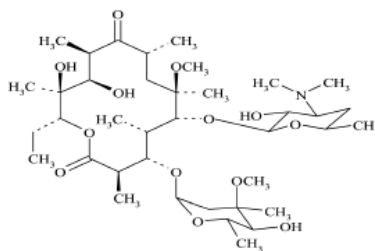
Helicobacter pylori muestra una alta sensibilidad *in vitro* a gran número de antimicrobianos, pero la eficacia *in vivo* de la mayoría de estos agentes es sorprendentemente baja. Esto es consecuencia de que la bacteria vive en la capa de moco que recubre la mucosa gástrica y es relativamente difícil que los antibióticos alcancen allí las concentraciones requeridas para ejercer una correcta acción bactericida. Además, influyen parámetros que no son valorados habitualmente cuando se plantea una terapia antibiótica en otros tejidos, como son el pH y el grosor de la capa de moco, la secreción ácida gástrica o el contenido alimenticio.

- **Amoxicilina:** Su mecanismo de acción se desarrolla mediante la inhibición de las etapas finales de la síntesis del peptidoglucano que es un polímero esencial en la pared de casi todas las bacterias. Es estable en medio ácido, pero ejerce su máxima acción a pH = 7. Tras la ingesta oral, alcanza su máxima concentración en la mucosa antral a los 30 min y mantiene su efecto durante 6 horas. Administrada por vía parenteral no alcanza en el moco una concentración suficiente para erradicar la bacteria.



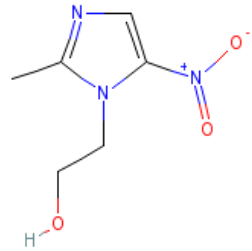
Estructura química de la Amoxicilina

- **Macrólidos (claritromicina):** Este agente bacteriostático es ácido-estable y se absorbe bien, con mayor penetración y menores efectos secundarios que la eritromicina.



Estrutura química de la claritromicina.

- **Nitroimidazoles** (metronidazol y tinidazol): La selectividad por los microorganismos que crecen en condiciones anaerobias se debe a que sólo en estas circunstancias el grupo

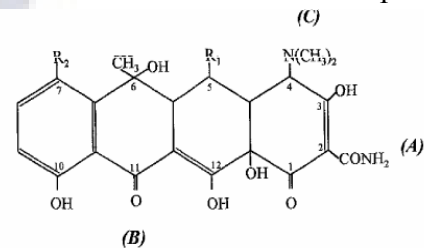


Estructura química metronidazol

5'-nitro sufre reducción, mediante aceptación de electrones donados por las ferredoxinas o similares, propias de dichos organismos. La fuente endógena de electrones puede ser el NADPH o radicales sulfuro. La forma reducida del metronidazol provoca modificaciones en la estructura helicoidal de ADN, con rotura de sus hebras y pérdida de función. Tienen alta actividad frente a *Helicobacter pylori in vitro*.

Su acción no depende del pH gástrico y tienen una vida media de 8-12 horas. El inconveniente es el alto número de resistencias primarias y secundarias que se desarrollan a estos fármacos.

- **Tetraciclina:** La tetraciclina inhiben la síntesis de las proteínas bacterianas por fijarse a la subunidad ribosómica 30 S. Bloquean la fijación del aminoacil ARNt al sitio aceptor del complejo ARNm-ribosoma y, en consecuencia, la adición de nuevos aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento. El *Helicobacter pylori* es muy sensible *in vitro* a la acción de este fármaco y no se han descrito resistencias; sin embargo, su actuación *in vivo* aún es objeto de estudio.



Estructura química tetraciclina

a) Criterios para seleccionar el tratamiento

Hoy día solo se aceptan pautas que cumplan los siguientes criterios:

- Que logren índices de erradicación superiores al 90%.
- Que los efectos secundarios sean inferiores al 5%.
- Que sean de fácil cumplimiento por el paciente.

- Que induzcan bajas tasas de resistencia antibiótica.
- Que sean de corta duración (entre 7-10 días).
- Que sean de bajo coste.

b) Resistencia

Resistencias primarias a los antibióticos empleados, las cuales son muy frecuentes para el metronidazol hasta un 40 % y algo menores para la claritromicina al rededor de 9%, siendo excepcionales las resistencias a la amoxicilina y a la tetraciclina. Con relación a la duración del tratamiento la mayoría de los estudios terapéuticos concluyen que son suficientes 7 días de tratamiento, no obstante en EEUU se ha propuesto prolongar la duración hasta 10-14 días.

c) Terapia erradicadora

i. Triple clásica

Es la basada en la combinación de dos antibióticos **metronidazol** y **tetraciclina**, (puede ser sustituida por amoxicilina) con un compuesto de **bismuto**.

Es una pauta de bajo coste y bien investigada, que sin embargo puede causar efectos secundarios, aunque en general son poco importantes y no son responsables de una falta de seguimiento del tratamiento por parte del paciente. La eficacia de erradicación obtenida con esta pauta es muy alta cuando las cepas son sensibles al metronidazol, pero cuando las cepas son resistentes las tasas de erradicación son más bajas. Esta pauta no debe emplearse como inicial a pesar de su bajo precio, debido a la alta tasa de cepas resistentes al metronidazol; además hay que tener en cuenta sus principales inconvenientes como son el elevado número de comprimidos que el paciente debe ingerir y la duración del tratamiento que debe prolongarse a dos semanas.



ii. Triple

Es la combinación de dos antibióticos **amoxicilina, claritromicina y/o metronidazol** con un **inhibidor de la bomba de protones (IBP)**. Esta pauta tiene la ventaja de una menor duración de tratamiento (7 días) y un bajo nivel de efectos secundarios, pero son poco efectivas en presencia de cepas resistentes a la claritromicina y que cuando fallan, las resistencias secundarias son muy frecuentes. En nuestro país la combinación más recomendada es la de un IBP junto a amoxicilina y claritromicina, que está considerada como la pauta de primera en la erradicación de *H. pylori*.

La asociación de amoxicilina y metronidazol, ya sea dos o tres veces al día, es poco eficaz cuando las cepas son resistentes al metronidazol y la duración de la pauta es de 7 días; por ello en áreas de alta resistencia al metronidazol se recomienda prolongar el tratamiento de esta combinación a 14 días, si bien es preferible en estas zonas evitar esta asociación. Adamsson y col. (1999) han descrito que un tratamiento basado en amoxicilina, metronidazol y omeprazol es preferible a uno basado en claritromicina, metronidazol y omeprazol, desde un punto de vista ecológico, ya que con la amoxicilina se producen cambios menos pronunciados en el surgimiento y duración de cepas resistentes en la microflora gástrica de enfermos infectados por *H. pylori*.

Una nueva variante de pauta triple, que realmente no es una pauta triple en sentido estricto, es la que sustituye el IBP por ranitidina-citrato de bismuto. Esta última pauta obtiene una menor supresión ácida gástrica pero asocia el efecto antimicrobiano del bismuto a los antibióticos. Con esta pauta puede prevenirse la inducción de resistencias bacterianas cuando los tratamientos fracasan y la tasa de curación es algo mayor en los pacientes con cepas resistentes a las obtenidas cuando se utiliza la combinación con IBP. Las tasas de curación con estas pautas en nuestro medio están alrededor del 85%.

La terapia triple, la cual incluye dos antibióticos y un inhibidor de la bomba de protones, es la que más se utiliza actualmente para el tratamiento de *Helicobacter pylori*.



Recientemente, se ha descrito que los inhibidores de la bomba de protones aumentan la concentración local de los antibióticos en el estómago, lo que puede contribuir a una acción sinérgica corroborada en la terapia erradicadora de *H. pylori* (Kees y col., 2000)

iii. Cuadruple

Consiste en la asociación de un **IBP con la triple clásica** (tetraciclina, metronidazol y un compuesto de bismuto). La duración de esta pauta es de 7 a 14 días. Los antibióticos suelen ser sustituidos por amoxicilina y claritromicina respectivamente. Con esta pauta se logran tasas de curación muy elevadas (superiores al 90%).

iv. Recomendaciones

Tratamiento de primera elección: La duración del tratamiento es de 7 días

- *IBP (omeprazol 20 mg, lansoprazol 30 mg, pantoprazol 40 mg)/12 h + amoxicilina 1 g/ 12 h + claritromicina 500 mg/12 h.*
- *Ranitidina citrato de bismuto 400 mg/12 h + amoxicilina 1 g/12 h + claritromicina 500 mg/12 h.*
- *En caso de alergia a la penicilina la amoxicilina será sustituida por metronidazol 500 mg/12 h.*

En caso de fracaso del de primera elección (tratamiento de rescate)

- *IBP (20 mg omeprazol, 30 mg lansoprazol, 40 mg pantoprazol) / 12 h + Subcitrato de bismuto 120 mg / 6 h + tetraciclina 500 mg /6 h + metronidazol 500 mg/8 h.*

La duración de este tratamiento será de siete días.

9) Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos

La determinación de la sensibilidad *in vitro* de *H. pylori* a los agentes antimicrobianos es importante ya que la resistencia primaria o adquirida a varios antibióticos se asocia con la ausencia de erradicación de la bacteria en el estómago.

Actualmente existe una recomendación del *Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) que aconseja el método de dilución en agar y establece puntos de corte para claritromicina. Sin embargo, la *British Society for Antimicrobial Chemotherapy*

(BSAC) recomienda difusión con E-test. Por último, la difusión con disco también se ha utilizado por diferentes autores.

a) **Dilución en agar**

Es el método de referencia pero no aplicable de forma rutinaria para cada cepa aunque es válido para confirmar los resultados obtenidos por otros métodos y realizar estudios con el objeto de conocer la tasa global de resistencia en un área determinada. La metodología que recomienda el CLSI es la siguiente:

Medio	Mueller-Hinton agar suplementado con 5% de sangre de carnero (de más de 2 semanas).
Inóculo	Preparar un 2 de MacFarland (1×10^7 a 1×10^8 ufc/mL) en solución salina a partir de un subcultivo de 72 horas de <i>H. pylori</i> en agar sangre.
Incubación	3 días en atmósfera microaerofílica producida con sobre generador de gas válido para <i>Campylobacter</i> .

Se debe utilizar la cepa control *H. pylori* ATCC 43504 para la que existen límites aceptables de valor de CMI de: amoxicilina (0,016-0,12 mg/L), claritromicina (0,016-0,12 mg/L), metronidazol (64-256 mg/L), telitromicina (0,06-0,5 mg/L) y tetraciclina (0,12-1,0 mg/L).

b) Difusión con E-TEST

Es un método cuantitativo para realizar las pruebas de sensibilidad *in vitro* basado en la difusión. El método del epsilómetro está especialmente recomendado en organismos exigentes y cuando se deben probar pocos microorganismos o pocos antibióticos. Tiene diferentes ventajas sobre los métodos tradicionales de dilución en agar, dilución en caldo o difusión en agar. La correlación de este método con la dilución en agar no es buena cuando

se estudia metronidazol. La British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) recomienda:

Medio de cultivo Mueller-Hinton o Wilkins-Chalgren suplementado con 5-10% de sangre de caballo

Inóculo Resuspender colonias de un cultivo de 2 a 3 días de incubación en agua destilada estéril y ajustar a escala 3 de McFarland, e inocular sobre la superficie de una placa con una torunda esteril empapada en esta suspensión. Aplicar la tira de E-test después de dejar que se seque el inóculo aplicado.

Incubación A 35°C en microaerofilia durante 3 a 5 días y leer la CMI como el punto en el que existe una inhibición completa del microorganismo.

Puntos de corte recomendados por la CLSI o por la BSAC.

	CLSI			BSAC	
Metodo	Dilución en agar			E-Test	
	Punto de corte mg/L			Punto de corte mg/L	
	S	I	R	S	R
Amoxicilina				≤1	≥2
Claritromicina	≤0.25	0.5	≥1	≤1	≥2
Tetraciclina				≤2	≥4
Metronidazol				≤4	≥8

S: sensible; I: intermedio; R: resistente

c) Difusión con discos

Este método de susceptibilidad de antimicrobianos, se basa en el uso de una cantidad constante del antimicrobiano, que está impregnado en un reservorio de papel filtro, el cual al ser aplicado sobre la superficie del medio en el que previamente se ha sembrado el microorganismo en cuestión, forma por difusión un gradiente de concentración del

antimicrobiano, cuya sensibilidad está indicada por el tamaño de halo de inhibición de crecimiento alrededor del disco.

Es el método más fácil y barato para determinar la sensibilidad *in vitro*, pero no hay muchos estudios de correlación entre los valores de CMI y los diámetros de inhibición en el caso de *H. pylori*. Teniendo en cuenta que el método de dilución en agar no es aplicable de rutina y el método del E-test es caro y que también se observan discrepancias con metronidazol, McNulty ; Boyanova *et al.*; y Soo *et al.* realizaron una revisión de los estudios en los que se había utilizado difusión con disco, recomendando:

Medio de cultivo	Mueller-Hinton o Columbia suplementado con 5 a 10% de sangre (de caballo o carnero).
Inóculo	Preparar un inóculo a partir de un cultivo mayor a cuatro días de incubación y ajustar a la escala 4 de McFarland (10^{12} ufc/mL).
Concentración de discos y puntos de corte	Para metronidazol recomienda utilizar un disco de 5 μ g y considera resistente si el halo es <16 mm, intermedio si 16-21 mm y sensible si >21 mm. Para claritromicina es preferible la utilización de un disco de 2 μ g considerando resistente cuando no existe halo de inhibición. También se puede utilizar un disco de 15 μ g de claritromicina y considerar resistente si el halo es de <30mm. Para un disco de 15 μ g de eritromicina considerar resistente si el halo es de <30mm. Para la un disco de 15 μ g de ciprofloxacina se considera resistente si el halo es de <30mm; Para la un disco de 30 μ g de tetraciclina considerar resistente si el halo es de <30mm.

d) Técnicas moleculares

Se han desarrollado diversas técnicas moleculares para detectar esta resistencia, que se han utilizado en cepas cultivadas *in vitro* pero también directamente en muestras de biopsia gástrica.

Por ejemplo la detección de las mutaciones que confieren resistencia a claritromicina en *H. pylori* se ha realizado mediante PCR. Se amplifica un fragmento de 1,4 Kpb correspondiente al dominio V de la región 23S del ARNr y se detecta la mutación en A2142G y A2143G tras digestión con las enzimas *MboII* y *BsaI*, respectivamente.

La ventaja de las técnicas moleculares es la rapidez en obtener resultados y la excelente correlación con la sensibilidad obtenida por métodos fenotípicos. La principal desventaja es que sólo sirve para detectar resistencia a macrólidos y que se requiere disponibilidad de este tipo de técnicas en el laboratorio.





V. MATERIALES, MÉTODOS Y PROCEDIMIENTO



A. DISEÑO METODOLOGICO.

1. AJUSTE PRELIMINAR.

Procedimiento que se realizó para determinar la cantidad de inóculo que el disco de papel filtro de 6mm de diámetro podía contener.

a. Evaluación del antibiograma por impregnación de disco.

La evaluación de la técnica Bauer Kirby modificada por impregnación de disco, se realizó con cloranfenicol p.a. sobre Ceba *Echerichia coli* 25922.

1) Preparación del antibiótico.

Se preparó una solución de cloranfenicol p.a. disuelta en etanol al 95% a una concentración de 0,025 g/mL.

2) Preparación de la suspensión bacteriana

A partir de un cultivo de *E coli* cepa 25922 de 18 horas de incubación a 37°C, se selecciono 3 a 5 colonias bien aisladas, las cuales se transfirieron a un tubo que contenía 3ml de solución fisiológica estéril, se homogenizó la suspensión hasta alcanzar una turbidez 0,5 Mac Farland.

3) Inoculación en las placas de agar

Se utilizó placas de agar Muller Hinton previamente atemperadas. Utilizando un hisopo estéril empapado con la suspensión bacteriana, se sembró en tres direcciones con ángulo de 65° para garantizar la distribución homogénea del cultivo.

4) Aplicación de disco empapado con antibiótico.

Después de 10 minutos de realizada la siembra, se aplicó los discos de papel filtro Wattman N°5 previamente empapados con una solución de cloranfenicol, a volúmenes distintos de 1, 5, 10, 15 y 20 µL; además se puso un disco control negativo empapado con solución de etanol al 95 %.

5) Incubación de las placas de agar

Antes de la incubación, se dejó durante 5 minutos sobre una superficie plana para permitir la difusión de la solución sobre el agar. Las placas se incubaron de forma invertida en estufa de 35°C a 37°C durante 18 horas siguiendo las normas establecidas por la CLSI.

6) Lectura de resultados.

Con el calibrador, se midió el halo de inhibición (diámetro en milímetros), para lo que se sostuvo la caja petri de forma invertida, sobre fondo oscuro y con luz refleja.

7) Interpretación de resultados.

Limites de control de calidad de discos de cloranfenicol en *E. coli* cepa 25922.

Antimicrobiano	Disco	Halo de Inhibición
Cloranfenicol	30 ug	21 - 27

CLSI, 2005

2. DISEÑO EXPERIMENTAL

a. Material vegetal.

1) Recolección, desecado, pulverización y conservación.

Las especies vegetales *Plantago major* (hojas), *Verbena officinalis* (planta entera), *Clinopodium boliviensis* (hojas), *Calendula officinalis* (hojas), *Piper angustifolium* (hojas) y *Rubus boliviensis* (hojas) fueron recolectadas en el mes de Octubre del año 2005 coincidiendo con la época de floración.

Se lavó con agua destilada estéril y se deseco en una estufa a 40°C de temperatura. Una muestra seca de cada una de las especies fue llevada al Herbario Nacional de Bolivia para se autenticación y clasificación.

En todos los casos se separaron las hojas, a excepción de la *Verbena* que se utilizó la planta entera, se pulverizaron hasta alcanzar un tamaño de partícula adecuado. Este material fue conservado en recipientes herméticos y depositados en el IIFB área de Farmacología de

la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés.

2) Preparación de los extractos.

a) Extracto diclorometánico.

La extracción de los compuestos orgánicos se realizó por maceración en frío cumpliendo el siguiente protocolo. En un Erlenmeyer se colocó 10 g del material vegetal seco y pulverizado, se adicionó 50 ml de diclorometano, tapamos, y se dejó macerar durante 24 horas a temperatura ambiente y privados de luz. Pasado este tiempo se filtro el macerado para eliminar el residuo utilizando papel filtro. Con el marco (residuo que queda en el papel filtro). Se repitió este procedimiento hasta agotar el compuesto orgánico del material vegetal (2 veces).

El conjunto de los líquidos extraídos se concentraron en condiciones ambientales, hasta obtener un extracto seco por evaporación del disolvente (González, 1998; Ankli A. *et al.* 2002).

b) Extracto hidroalcohólico.

La extracción hidroalcohólica (etanol 75 : agua 25) se realizó a partir del residuo seco que quedó en el papel filtro de la extracción con diclorometano. En un matraz Erlenmeyer se colocó este residuo y se adicionó 50 ml de hidroalcohol, se tapó y se dejó macerar durante 24 horas a temperatura ambiente privada de luz, pasado este tiempo se filtró el macerado para eliminar el residuo utilizando papel filtro. Se repitió este procedimiento hasta agotar el material vegetal (2 a 3 veces).

El conjunto de los líquidos extraídos fueron concentrados en rotaevaporador a presión de 175 mmHg y 40°C de temperatura, hasta obtener un extracto de consistencia altamente densa, finalmente se trasvaso a una caja petri, donde se dejó secar en condiciones ambientales. (Gonzales, 1998; Ankli *et al.* 2002).

c) Extracto acuoso.

Este extracto se obtuvo siguiendo las recomendaciones del Cytel (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo), mediante la preparación de infusión con agua destilada al 10% (p/v). Para lo cual el volumen calculado de agua a temperatura de ebullición, se vertió sobre un recipiente que contiene la planta pulverizada, se tapo y se mantuvo así por el espacio de 30 minutos, posteriormente se filtro y se liofilizo.(Ankli et al. 2002).

b. Determinación de la actividad anti *Helicobacter pylori*.**1) Recuperación de cepas de *H. pylori*.**

Se obtuvieron cuatro cepas salvajes de *Helicobacter pylori*: HAIA112, CCPA9, CCPC38 y CCPA62, cedidas en medio de transporte Wang por el Laboratorio Nacional de Referencia en Bacteriología Clínica del INLASA. Estas cepas fueron identificadas en comparación con la cepa ATCC 49503.

Se sembró con un hisopo por inundación en agar base Columbia con Sangre desfibrinada de cordero al 7% más isovitalex al 1%, el cultivo fue a 37°C durante 3 o 4 días en microaerofilia. Se realizó la identificación macroscópica, microscópica y bioquímica.

a) Identificación macroscópica.

Se observaron colonias muy pequeñas de 0.5 mm de diámetro aproximadamente, translucidas, transparentes y brillantes que asemejaban a gotas de rocío de agua, a veces se presentó como una alfombra que tapizaba el medio de cultivo.

b) Identificación microscópica.

Se realizó la tinción gram, observando en el microscopio bacilos curvados en forma de u, alas de gaviota o helicoidales, gram negativos.



c) Identificación de las características bioquímicas.

i. Prueba de la ureasa rápida

Se sembró las colonias sospechosas de *Helicobacter pylori* en medio de Agar Urea de Christensen en tubo en pico de flauta, con aguja por pinchado del agar y finalmente se realizan estrías. En caso de un resultado positivo luego de unos minutos dió coloración rosada intensa.

ii. Prueba de la citocromo oxidasa

En papel filtro empapado con tetrametil-p-fenilendiamina dihidroclorhidro al 1% sobre una placa de vidrio se inoculó con un aplicador de plástico colonias sospechosas de *Helicobacter pylori*. En caso de un resultado positivo se observó cambio de coloración del papel filtro a azul.

iii. Prueba de la catalasa

Se inoculó con el asa de platino colonias sospechosas de *Helicobacter pylori* sobre una placa de vidrio, sobre este adicionamos una gota de peroxido de hidrogeno. En caso de resultado positivo se observo burbujas blanca.

2) Prueba de susceptibilidad por difusión de disco. (esta prueba se realizó por triplicado)

a) Preparación de la suspensión bacteriana.

A partir de un cultivo en abundancia de 2 días de incubación, se realizó la suspensión en 2 mL de solución fisiológica, se homogenizó la suspensión en vortex y se ajustó a la escala 4 (10^{12} ufc/ml) del patrón de turbidez de Mac Farland.

i. Inoculación en las placas de agar

Antes de realizar la siembra, se atemperó las placas de agar base Columbia suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 7% y isovitalax al 1%, preparado minimamente 2 días antes de la prueba. Se empapó un hisopo estéril en la suspensión bacteriana, y se sembró en tres direcciones con ángulo de 65° para garantizar la distribución homogénea del cultivo.



ii. Aplicación de disco empapado con antibiótico (control positivo).

Después de 10 minutos de realizada la siembra, se aplicó el disco de papel filtro Wattman N°5 previamente empapado con una solución de 10 μ l de tetraciclina [3 μ g/ μ l]. El disco fue puesto sobre la superficie del agar 1 por caja debido a su amplio halo de inhibición.

iii. Aplicación de discos empapados con extractos vegetales.

Después de 10 minutos de realizada la siembra, se aplicó discos de papel filtro Wattman N°5. Los discos fueron puestos sobre la superficie del agar (máximo seis por caja), previamente empapados con una solución de 10 μ l de los extractos a concentración de [0,6 μ g/ μ L]. Los extractos fueron disueltos en el mismo solvente de extracción. Los discos fueron aplicados a una distancia mínima de 2 cm de distancia entre ellos y del borde de la caja petri, siguiendo normas del LNRBC.

iv. Aplicación de discos control negativos.

Después de 10 minutos de realizada la siembra, se aplicó discos de papel filtro Wattman N°5. Los discos fueron puestos sobre la superficie del agar previamente empapados con 10 μ l de los disolventes utilizados en la extracción de las especies vegetales (diclorometano, etanol al 75% y agua destilada esteril). Los discos fueron aplicados a una distancia mínima de 2 cm de distancia entre ellos y del borde de la caja petri, siguiendo normas del LNRBC.

v. Incubación de las placas de agar

Las placas se incubaron de forma invertida en jarra de anaerobiosis de 2,5L “BBL” y “Oxoid” con sobres de CampyGen (CN 25: 85% N₂, 10% CO₂ y 5% O₂) en estufa de 35°C a 37°C durante tres días, siguiendo la norma CLSI.

vi. Lectura de resultados

Para medir los halos de inhibición se utilizó calibrador, primero se retiró la tapa de la caja petri y se midió el diámetro del halo tanto horizontal como vertical, el resultado se expresó en milímetros.

vii. Interpretación de resultados.**Tabla 1. INHIBICIÓN DE LA TETRACICLINA (disco de 30 μ g)**

	Sensible	Resistente
Diámetro del halo	mayor a 30 mm	menor a 30 mm

Ludmila Boyanova et al 1999

Tabla 2. INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS

	Diámetro de halo de inhibición (mm)	Actividad
++++	> 20 mm	Muy activo
+++	16-20 mm	Activo
++	11 – 15 mm	Moderadamente activo
+	8 – 10 mm	Poco activo
-	6 – 8 mm	No activo

Yuan-Chuen Wang et al 2005

viii. Análisis de resultados

Cálculo de ANOVA (Programa Microsoft Excel 2000®).

3. DESCRIPCIÓN DEL TIPO DE ESTUDIO.

Este estudio está basado en diseños experimentales, debido a que hay un análisis de variables y niveles de variables implicados en la sensibilidad y resistencia del *Helicobacter pylori* hacia diferentes extractos vegetales.



4. DESCRIPCIÓN DEL AMBITO DE ESTUDIO

a. Descripción de la Unidad de Análisis

La recolección de las especies vegetales se realizó en el mes de octubre de año 2005 de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 3. LUGARES DE RECOLECCIÓN DE LAS ESPECIES VEGETALES EN ESTUDIO

Espece vegetal	Organo de la planta	Lugar de recolección
<i>Plántago major</i>	Hojas	Localidad: Cala Cala Provincia: Cercado Departamento: Cochabamba
<i>Verbena officinalis</i>	Planta entera	Localidad: Carmen calata Provincia: Manco Cápac Departamento: La Paz
<i>Clinopodium bolivianum</i>	Hojas	Localidad: Carmen calata Provincia: Manco Cápac Departamento: La Paz
<i>Calendula officinalis</i>	Hojas	Localidad: Mallasa Provincia: Murillo Departamento: La Paz
<i>Piper angustifolium</i>	Hojas	Localidad: Inquisivi Provincia: Inquisivi Departamento: La Paz
<i>Rubus boliviensis</i>	Hojas	Localidad: Unduavi Provincia: Nor Yungas Departamento: La Paz

b. Descripción del ambiente de Trabajo

El presente trabajo fue realizado en dos etapas; 1) extracción de las especies vegetales: en el Laboratorio del Área de Farmacología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés ubicada en la zona de

Miraflores, Av. Saavedra N°2224 y 2) Antibiograma: en la Unidad de Investigación (LA) del Laboratorio Nacional de Referencia en Bacteriología Clínica dependiente del Instituto Nacional de Laboratorios en Salud. (INLASA)

c. Descripción de la unidad Biológica

Para el desarrollo del trabajo se emplearon cepas salvajes de *Helicobacter pylori* aisladas de biopsias de pacientes que acuden a consulta gastroenterología al Hospital Arco Iris y Clínica “Caja Petrolera”, proporcionadas por el Laboratorio Nacional de Referencia en Bacteriología Clínica.





VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES.



A. AJUSTE PRELIMINAR.

La etapa de ajuste preliminar ha sido realizada con el objetivo evaluar la técnica de antibiograma por difusión de disco impregnado con solución de antibiótico. Para este propósito utilizamos *E. coli* cepa ATCC25922, debido a que sus características de sensibilidad y resistencia a los antimicrobianos están estandarizadas y además se conocen los puntos de corte a una amplia gama de antimicrobianos.

Tabla 4. ANTIBIOGRAMA REALIZADO POR IMPREGNACIÓN DE DISCO CON SOLUCIÓN DE CLORANFENICOL [3 µg/µL] SOBRE CEPA *E. coli* 25922.

VOLUMEN	DIÁMETRO DE HALO DE INHIBICIÓN
1µL	20 mm
5µL	24 mm
10µL	27 mm
15µL	No soporta el disco
20µL	No soporta el disco
control	6 mm

Como se puede observar en los resultados obtenidos en el ajuste preliminar, expresados en la tabla 4, el volumen máximo que soporta el disco de papel filtro Watmann N° 5 de 6 mm de diámetro es de 10 µL, ya que si se excede de esta cantidad se desconocería la carga de antimicrobiano por que al exceder el volumen perdemos soluto en la solución.

Según la CLSI 2005 un disco de 30 µg de cloranfenicol aplicado sobre un cultivo confluyente de *E. coli* cepa 25922 debe observarse un halo de inhibición de 21 a 27mm de diámetro, este procedimiento se realiza de forma rutinaria para evaluar y controlar la actividad de los discos comerciales o preparados manualmente, para saber si el antibiótico utilizado en la prueba de susceptibilidad conserva sus propiedades.

La impregnación de 10 µL de cloranfenicol equivalente a un disco de 30 µg esta dentro de los limites de inhibición permitidos para *E. coli* 25922. Por lo tanto la técnica de Bauer Kirby (con disco impregnado) es confiable. El resultado de volumen de impregnación es tomado en cuenta para los antibiogramas siguientes.



B. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS

La figura 1. Representa el rendimiento de los extractos de *Plantago major*, el extracto diclorometanico aproximadamente 3%, el extracto hidroalcohólico alrededor de 7% y el acuoso alrededor de 27% este elevado porcentaje puede atribuirse a la elevada cantidad de mucílagos presentes en las hoja de *Plantago major* (Alonso 1998) que se extraen con agua.

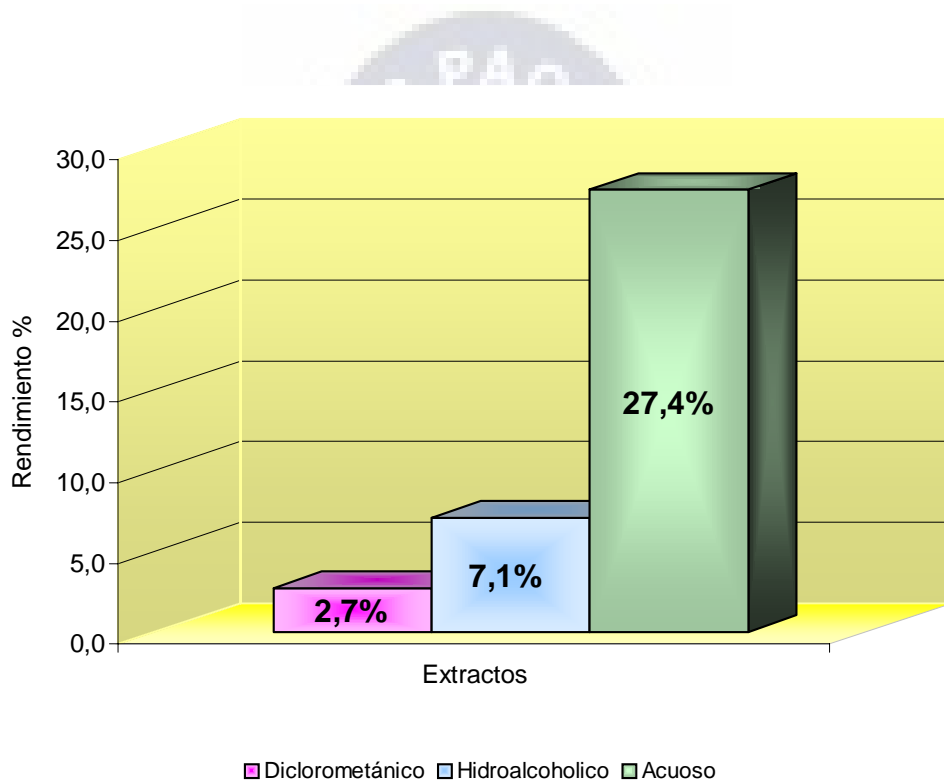


Figura 1. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE *Plantago major*

La figura 2. Representa el rendimiento de los extractos de *Verbena officinalis*, el extracto acuoso aproximadamente del 14%, el extracto hidroalcohólico aproximadamente el 9% y el extracto diclorometánico alrededor del 2%.

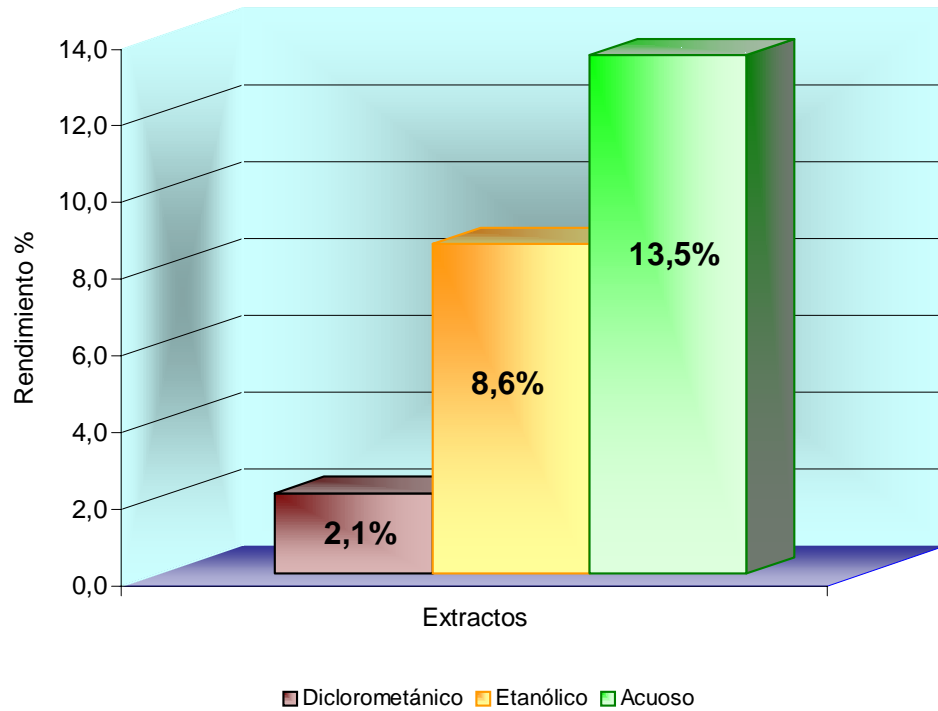


Figura 2. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTO DE *Verbena officinalis*

La *Verbena officinalis* posee en su composición mucilagos, saponinas, flavonoides, fenilpropanoides, heterósidos y aceites esenciales (Tian *et al*, 2005), siendo estos compuestos que posiblemente hayan sido extraídos con los diferentes solventes.

La figura 3, muestra el rendimiento en porcentaje de *Clinopodium bolivianum*, el extracto acuoso alrededor del 22%, el extracto hidroalcohólico alrededor del 1% y el extracto diclorometánico aproximadamente al 3%.

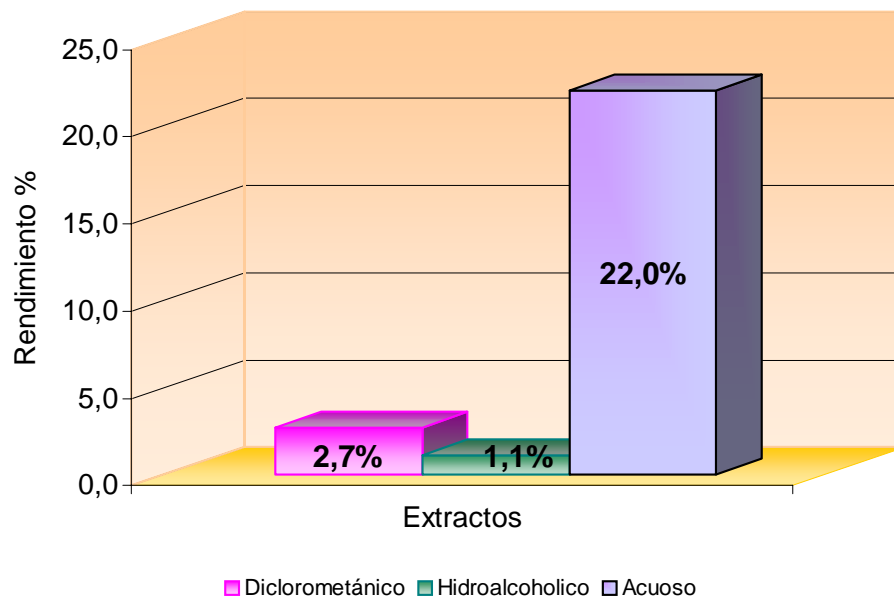


Figura 3. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE *Clinopodium bolivianum*.

Clinopodium bolivianum, es un especie que ha sido muy poco estudiada en lo que refiere a su composición fitoquímica, por tanto solo se conoce algunos aceites esenciales que contiene la planta (Figuroa *et al*, 1997), se debe destacar que a diferencia de los anteriores extractos en este se puede observar que la extracción con diclorometano tiene mayor rendimiento que la hidroalcohólica.

Un estudio realizado por Gonzales 1998 con la misma especie obtuvo un rendimiento de 15% correspondiente al extracto acuoso por el método de infusión y un rendimiento alrededor del 3% con la extracción diclorometánica realizada por agotamiento y diferencia de polaridad. Podemos observar que la extracción con diclorometano en nuestro estudio es similar al reportado por Gonzales, sin embargo la extracción acuosa varía notablemente, esto podría deberse a la época y lugar de recolección.

La figura 4 muestra el rendimiento en porcentaje de *Caléndula officinalis*, el extracto acuoso alrededor del 32%, el extracto hidroalcohólico alrededor del 5% y el extracto diclorometánico aproximadamente 2%.

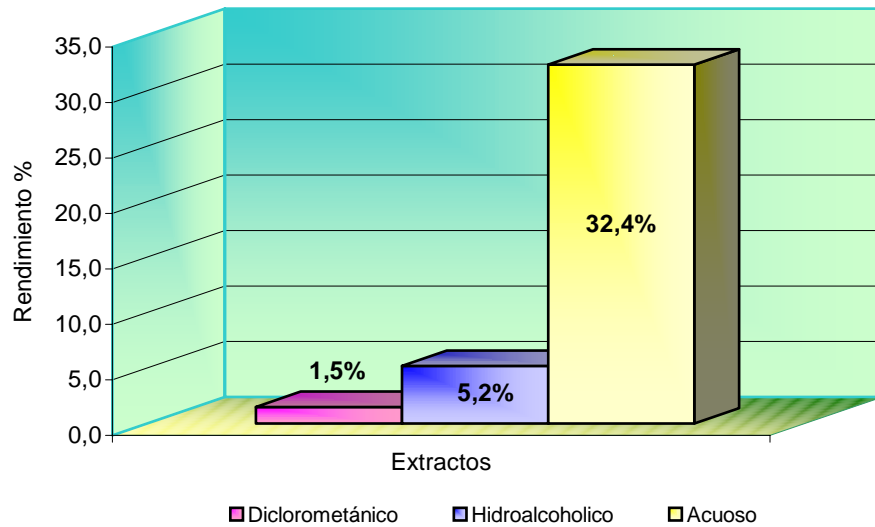


Figura 4. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE *Caléndula officinalis*

Podemos resaltar que el extracto acuoso de *Caléndula officinalis* es el que presenta el mayor en comparación a las otras especies utilizadas en este trabajo.

La *Caléndula officinalis* posee en su composición aceites esenciales en muy baja proporción ha esto puede deberse el bajo rendimiento del extracto diclorometánico (Acosta 2001), saponinas, mucílagos, flavonoides, alcaloides, polisacáridos y en gran cantidad carotenoides (Kishimoto *et al*, 2005) que pueden haber sido extraídos en la fracción hidroalcohólica y acuosa.

La figura 5, representa el rendimiento en porcentaje de *Piper angustifolium*, el extracto acuoso es aproximadamente del 15%, el extracto hidroalcohólico aproximadamente 3% y el extracto diclorometánico poco mas del 7%.

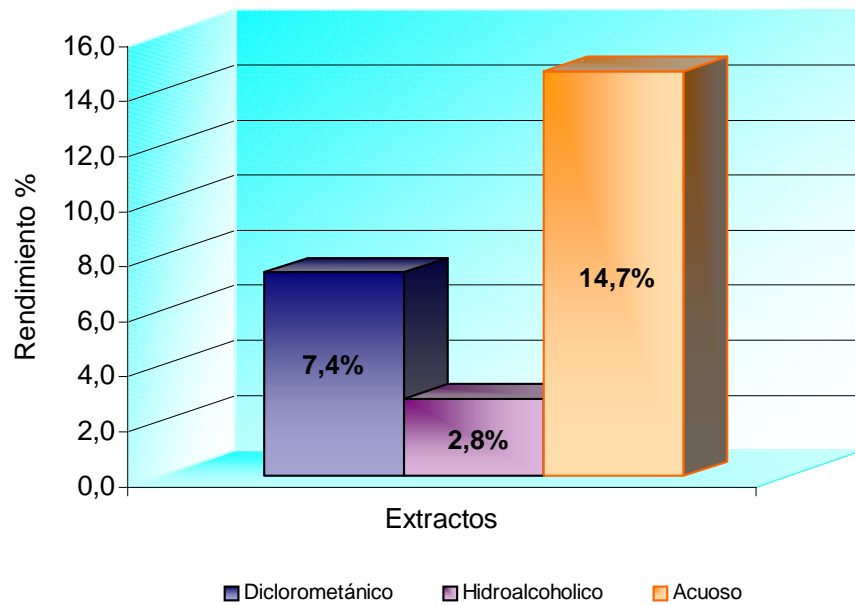


Figura 5. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE *Piper angustifolium*

Existe poca información reportada en la bibliografía, sin embargo se describe entre su composición fitoquímica, sustancias volátiles, triterpenos, y flavonoides (Alonso, 1998)

La figura 6, representa el rendimiento en porcentaje de *Rubus boliviensis*, el extracto acuoso alrededor del 25%, el extracto hidroalcohólico alrededor del 9% y el extracto diclorometánico alrededor del 3%.

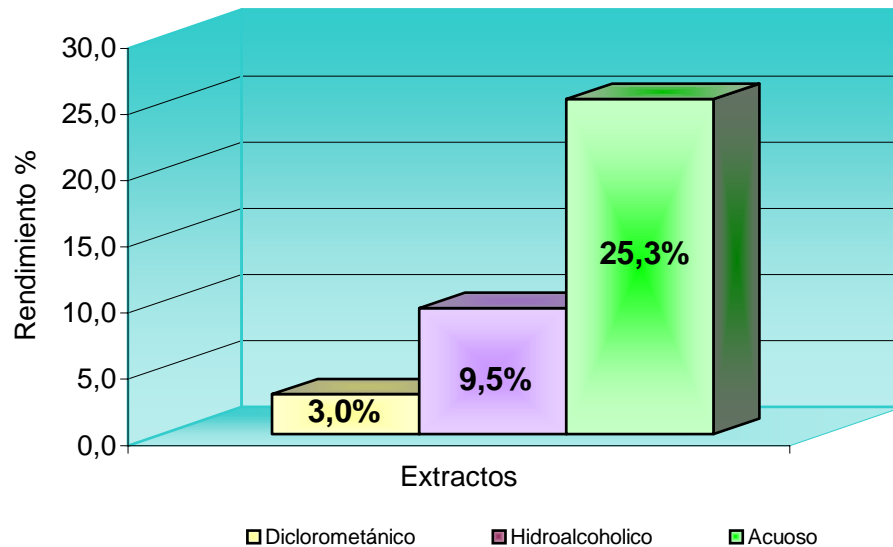


Figura 6. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE *Rubus boliviensis*.

No existe mucha información bibliográfica acerca de esta especie en lo que refiere a su composición fitoquímica, por lo que rescatamos en su composición mucílagos, azúcares, que posiblemente se hayan extraído con agua, taninos posiblemente extraídos en la fracción acuosa e hidroalcohólica, y algunos Ácidos (Quer, 1993). Destacamos que la extracción hidroalcohólica de esta especie es la de mayor rendimiento en comparación a las otras que se utilizaron.

En un estudio realizado con la misma especie (Rocabado 2004) se obtuvo un rendimiento del 7% en la extracción acuosa, y un rendimiento menor al 4% con la extracción diclorometánica ambos extractos siguieron el mismo protocolo que este estudio; destacamos que el rendimiento de la extracción acuosa se ve altamente disminuida en comparación con los resultados obtenidos en este estudio, sin embargo la extracción con diclorometano muestra un rendimiento similar.



C. Actividad Anti-*Helicobacter pylori*

Tabla 5. ACTIVIDAD ANTI-*Helicobacter pylori* DE LA TETRACICLINA

Nº de cepa	Tetraciclina (30 µg)	Control negativo
HAIA112	50,0 mm	6,0 mm
CCPA9	51,6 mm	6,0 mm
CCPC38	51,9 mm	6,0 mm
CCPA62	49,7 mm	6,0 mm
Promedio	50,8 mm**	6,0 mm
Desv. Est.	1,1 mm	—
Actividad	S	—
Variación entre cepas	No existe variación estadística entre cepas	

Promedio: Diferencia significativa frente al control: **P<0,01; *P<0,05

Actividad: S: sensible halo de inhibición mayor a 30 mm; R: halo de inhibición menor a 30 mm.

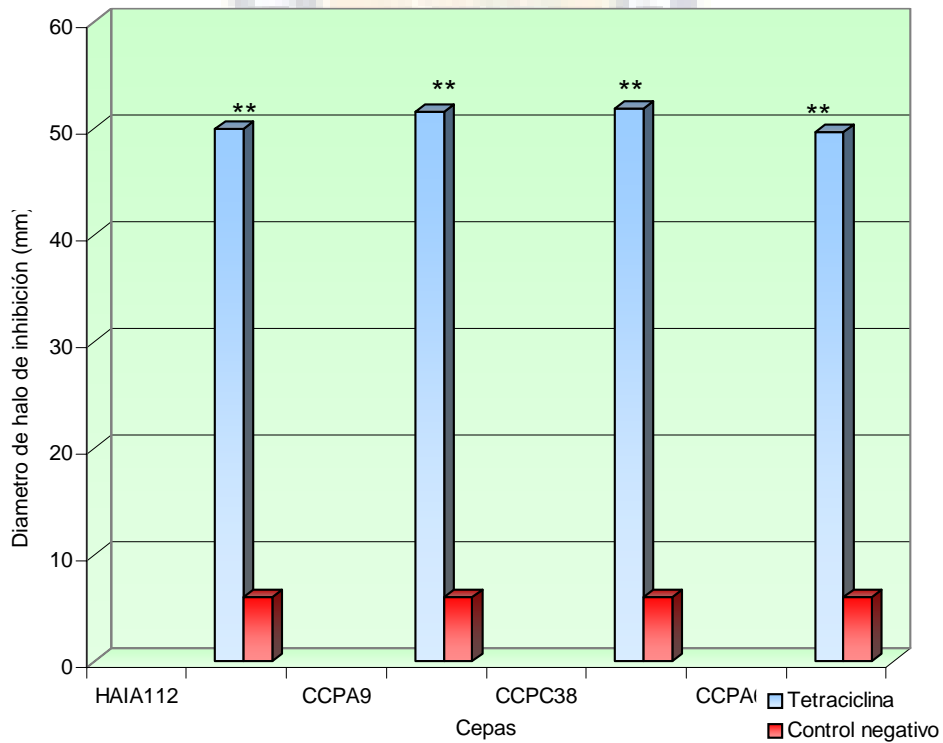


Figura 7. ACTIVIDAD ANTI-*Helicobacter pylori* DE LA TETRACICLINA



La tabla 5 y figura 7 muestran los halos de inhibición de la tetraciclina sobre cuatro cepas salvajes de *Helicobacter pylori*, el diámetro es expresado en milímetros, también se observan los resultados del control negativo (etanol 96%).

La tetraciclina tiene un promedio de diámetro de halo de inhibición de 50,8 mm, siendo que en la cepa CCPA62 se obtuvo el menor halo de inhibición (49,7 mm) y en la cepa CCPC38 se observó el mayor halo de inhibición (51,9 mm). Las pruebas de susceptibilidad se realizaron por triplicado, siendo los resultados el promedio (ver anexo 1).

Hemos seleccionado a la tetraciclina como control positivo debido a que es utilizada en la terapia alternativa para la erradicación de *Helicobacter pylori* cuando fracasa la terapia de primera elección (debido a resistencia bacteriana), además estudios realizados muestran que la resistencia a este antibiótico de amplio espectro es del 19% siendo el menor entre todos los antibiótico utilizados contra el *Helicobacter pylori*. Un estudio realizado por Soo *et al* el año 2006, con *Helicobacter pylori* cepa ATCC 43504, indica que la tetraciclina posee potente actividad, muestra que los halos de inhibición para un disco de 100 µg es de 63 mm, para 50 µg el halo es de 45 mm y para 10 µg el halo es de 35 mm,. en nuestro estudio se observa un halo de inhibición promedio de 50,8 mm con discos impregnados con 10 µL a concentración de [3 µg/µL], realizando extrapolación de los resultados de ambos estudios, las diferencias no son significativas pero visiblemente difieren una de la otra. Sin embargo en ambos casos las concentraciones reportan sensibilidad a la tetraciclina, según Bedoya. (ver tabla 1).

El control negativo (etanol 96%) no mostró halo de inhibición en ninguno de los casos, tampoco se observó desarrollo sobre el disco ni por debajo de él, por lo que se reporta el diámetro del disco que es de 6 mm.

Estadísticamente la actividad de la tetraciclina frente al control negativo es significativa para un nivel de confianza del 99% ($p < 0,01$), (ver anexo 3).

Como se puede observar en la tabla 5 y el análisis estadístico (ver anexo 3), no existe diferencias significativas de la actividad de la tetraciclina entre las cuatro cepas utilizadas, para un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$), por tanto las cepas responden de forma similar frente a la acción anti-*Helicobacter pylori* de este antibacteriano.



Tabla 6. ACTIVIDAD ANTI-*Helicobacter pylori* DE LOS EXTRACTOS DE *Plantago major* FRENTE A SUS CONTROLES NEGATIVOS

Nº de cepa	Diclorometánico	hidroalcohólico	Acuoso	Control negativo
HAIA112	6,0 mm	17,6 mm	6,0 mm	6,0 mm
CCPA9	6,0 mm	17,0 mm	6,0 mm	6,0 mm
CCPC38	6,0 mm	16,4 mm	6,0 mm	6,0 mm
CCPA62	6,0 mm	6,0 mm	6,0 mm	6,0 mm
Promedio	6,0 mm	14,3 mm	6,0 mm	6,0 mm
Desv. Est.	—	4,8 mm	—	—
Actividad	-	++	-	-
Variación entre cepas	No existe variación estadística entre cepas			

Promedio: Diferencia significativa frente al control: **P<0,01; *P<0,05

Actividad: +++++ Muy activo; +++ Activo; ++ Moderadamente activo; + Poco activo; - No activo

Control negativo: Promedio del control negativo de los 3 extractos (diclorometano, etanol 75%, agua destilada esteril)

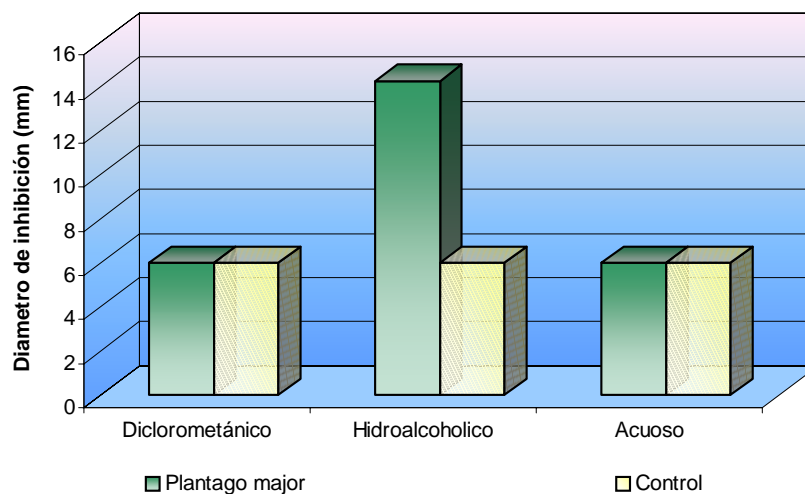


Figura 8. ACTIVIDAD ANTI-*Helicobacter pylori* DE LOS EXTRACTOS DE *Plantago major* FRENTE A SUS CONTROLES NEGATIVOS.



La tabla 6 y figura 8 representa los resultados de la actividad anti-*Helicobacter pylori* expresada en diámetro de halo de inhibición (mm) de discos impregnados con 10 μL [0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$] de extracto diclorometánico, hidroalcohólico y acuoso de *Plantago major* sobre cuatro cepas salvajes.

Los extractos diclorometánico y acuoso no produjeron inhibición en ninguna de las cepas; el extracto hidroalcohólico presentó inhibición en tres de las cuatro cepas, produciendo halo de inhibición considerado activo (ver Tabla 1); como se puede observar en la tabla 6, en la cepa CCPA62 este extracto no produjo inhibición en ninguna de las tres repeticiones de la prueba, este resultado podría deberse posiblemente a algún tipo de resistencia natural que *Helicobacter pylori* habría adquirido a alguno de sus fitoconstituyentes que le otorguen la acción antibacteriana, sin embargo como se vé en la tabla 5 es en esta cepa en la que la tetraciclina (control positivo) produce el menor halo de inhibición, aunque la diferencia con las otras cepas sea mínima.

El promedio de inhibición de las cuatro cepas tratadas con el extracto hidroalcohólico, es de 14,3 mm, con una desviación estándar de 4,8 (esta elevada desviación se debe a la cepa CCPA62), el promedio de las cuatro cepas clasifica al extracto con moderada actividad según Wang *et al*, 2005. Sin embargo, el análisis estadístico por ANOVA de la variación entre el promedio del extracto hidroalcohólico y promedio del control negativo (etanol 75%) con un nivel de confianza de 95% ($p \leq 0,05$) no muestra diferencia de actividad significativa, este resultado atribuimos a la elevada varianza (ver anexo 5). Aunque como se puede observar en la figura 8, se evidencia a simple vista variación de actividad con respecto a su grupo control.

En relación al calculo de ANOVA para evaluar la variación entre cepas para el extracto diclorometánico y acuoso la probabilidad no puede ser calculada ya que no existe varianza (ver anexo 4 y 6), y para el extracto hidroalcohólico no muestra diferencia estadísticamente significativa (ver anexo 5), aunque claramente se puede observar que la cepa CCPA62 difiere en su actividad en comparación con las otras cepas utilizadas.

Tedrogen el año 1989 demostró la actividad antibacteriana de un aglicón de la aucubina denominado aucubigenina liberado por una β -glucosidasa. La actividad inhibitoria sobre las cepas de *Helicobacter pylori* del extracto hidroalcohólico podría deberse a este compuesto químico.



Tabla 7. ACTIVIDAD ANTI-*Helicobacter pylori* DE LOS EXTRACTOS DE *Verbena officinalis* FRENTE A SUS CONTROLES NEGATIVOS

Nº de cepa	Diclorometánico	Hidroalcohólico	Acuoso	Control negativo
HAIA112	11,8 mm	22,5 mm	6,0 mm	6,0 mm
CCPA9	12,6 mm	16,9 mm	6,0 mm	6,0 mm
CCPC38	11,8 mm	21,8 mm	6,0 mm	6,0 mm
CCPA62	10,8 mm	6,0 mm	6,0 mm	6,0 mm
Promedio	** 11,8 mm	16,8 mm	6,0 mm	6,0 mm
Desv. Est.	0,7	7,6	—	—
Actividad	++	+++	-	-
Variación entre Cepas	No existe variación estadística entre cepas			

Diferencia significativa frente al control: **P<0,01; *P<0,05

Actividad: +++++ Muy activo; +++ Activo; ++ Moderadamente activo; + Poco activo; - No activo

Control negativo: Promedio del control negativo de los 3 extractos (diclorometano, etanol 75%, agua destilada esteril)

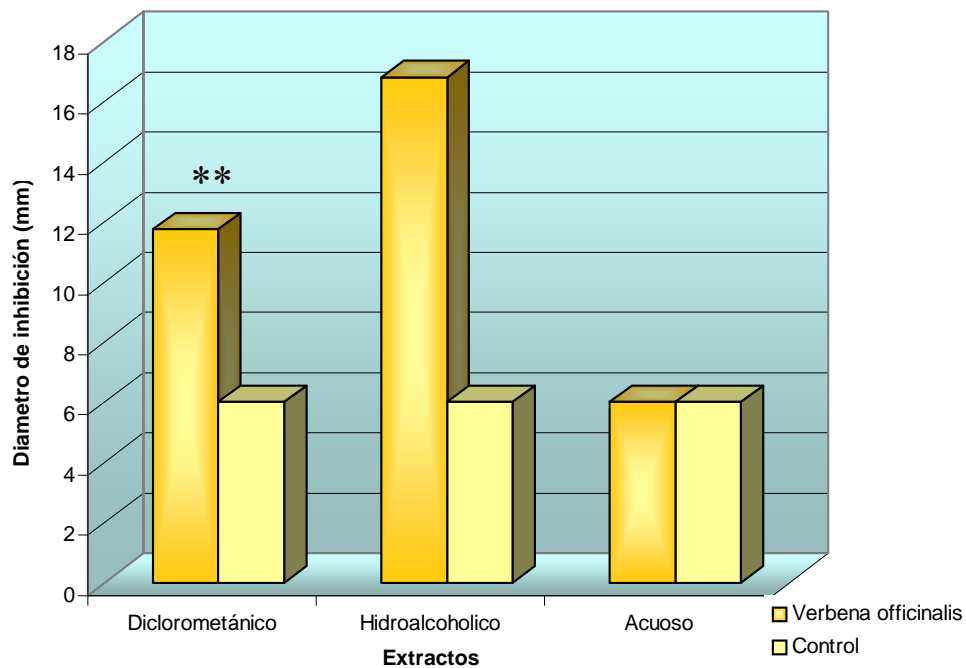


Figura 9. ACTIVIDAD ANTI-*Helicobacter pylori* DE LOS EXTRACTOS DE *Verbena officinalis* FRENTE A SUS CONTROLES NEGATIVOS.



La tabla 7 y figura 9 representa los resultados de la actividad anti-*Helicobacter pylori* expresada en diámetro de halo de inhibición (mm) de discos impregnados con 10 μ L [0,6 μ g/ μ L] del extracto diclorometánico, hidroalcohólico y acuoso de *Verbena officinalis* sobre cuatro cepas salvajes.

El extracto acuoso no produjo inhibición en ninguna de las cepas. La actividad del extracto hidroalcohólico es similar en las cepas HAIA112 y CCPC38 considerando a este extracto muy activo, en la cepa CCPA9 el halo de inhibición muestra a este extracto como activo y sobre la cepa CCPA62 no se observa actividad (en ninguna de las tres repeticiones de la prueba), por tanto el promedio de inhibición del extracto hidroalcohólico es de 16.8 mm considerado activo según Wang *et al*, 2005 (ver Tabla 1) aunque la desviación estándar es alta; el extracto diclorometánico produjo un promedio de halo de inhibición de 11,8 mm, considerado moderadamente activo, con una mínima desviación estándar.

El análisis estadístico por ANOVA de la variación entre el promedio del extracto acuoso no se puede calcular ya no existe variaciones, como se puede evidenciar en la tabla 7 (ver anexo 9); el extracto hidroalcohólico no muestra diferencia estadísticamente significativa en relación a su control negativo para un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$), la actividad promedio del extracto hidroalcohólico es visiblemente elevada en relación al control negativo y en comparación con los otros dos extractos es el que más actividad inhibitoria produjo, sin embargo existe mucha varianza de la actividad de este extracto en las diferentes cepas, es por esto que según cálculos estadísticos no hay diferencia; el promedio de la actividad del extracto diclorometánico es altamente significativa en relación a su control negativo para un nivel de confianza del 99% ($p \leq 0,01$), este resultado se debe a que la variación de la actividad de este extracto entre cepas es mínima, (ver anexo 7).

En relación al calculo de ANOVA para evaluar la variación entre cepas, para el extracto acuoso la probabilidad no puede ser calculada ya que no existe varianza; para el extracto hidroalcohólico y diclorometánico no se observa diferencia estadísticamente significativa (ver anexo 7 y 8), este resultado tiene un bajo nivel de confianza, ya que la

probabilidad es menor o igual a 50%, aunque claramente se puede observar que la cepa CCPA62 difiere en su actividad en comparación con las otras cepas utilizadas.

Un estudio realizado por Hernández *et al* el año 2000, sobre algunas bacterias gram positivas y gram negativas señala a los flavonoides mono y dihidroxilados de esta especie como responsables de la actividad antibacteriana, estos flavonoides podrían ser extraídos con hidroalcohol o diclorometano, por lo tanto se sugiere que para estudios posteriores se considere la extracción de estos flavonoides para probar su actividad sobre cepas de *Helicobacter pylori*.



Tabla 8. ACTIVIDAD ANTI-*Helicobacter pylori* DE LOS EXTRACTOS DE *Clinopodium bolivianum* FRENTE A SUS CONTROLES NEGATIVOS

Nº de cepa	Diclorometánico	Hidroalcohólico	Acuoso	Control negativo
HAIA112	23,4 mm	20,8 mm	14,5 mm	6,0 mm
CCPA9	14,2 mm	18,2 mm	15,7 mm	6,0 mm
CCPC38	23,3 mm	20,5 mm	15,7 mm	6,0 mm
CCPA62	21,4 mm	13,3 mm	11,9 mm	6,0 mm
Promedio	**20,6 mm	**18,2 mm	**14,5 mm	6,0 mm
Desv. Est.	4,3	3,5	1,8	—
Actividad	++++	+++	++	-
Variación entre Cepas	No existe variación estadística entre cepas			

Diferencia significativa frente al control: **P<0,01; *P<0,05
 Actividad: +++++ Muy activo; +++ Activo; ++ Moderadamente activo; + Poco activo; - No activo
 Control negativo: Promedio del control negativo de los 3 extractos (diclorometano, etanol 75%, agua destilada esteril)

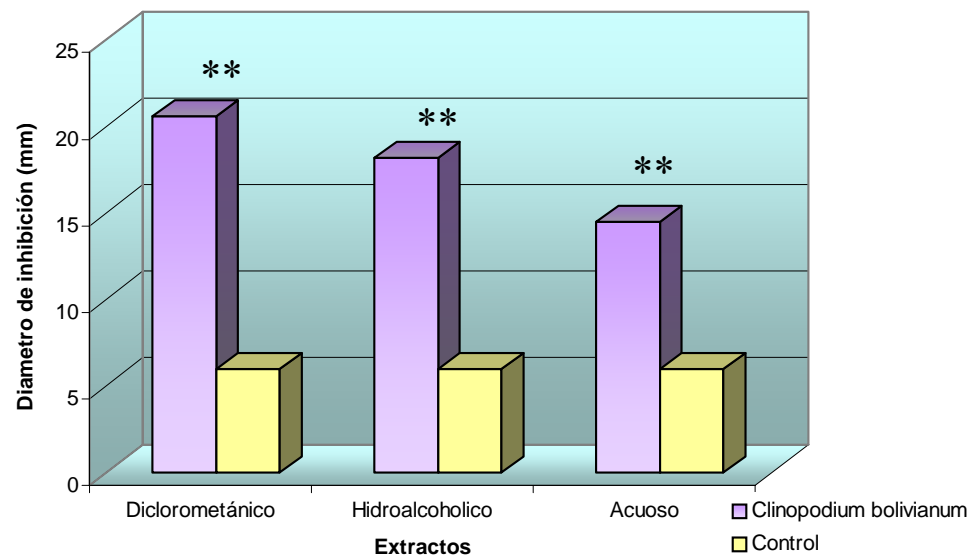


Figura 10. DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS DE *Clinopodium bolivianum* SOBRE CEPAS DE *Helicobacter pylori* CON SUS CONTROLES NEGATIVOS

La tabla 8 y figura 10 muestra los resultados de la actividad anti-*Helicobacter pylori* expresada en diámetro de halo de inhibición (mm) de discos impregnados con 10 μ L [0,6 μ g/ μ L] del extracto diclorometánico, hidroalcohólico y acuoso de *Clinopodium bolivianum* sobre cuatro cepas salvajes

El promedio del diámetro del halo de inhibición del extracto acuoso es de 14,5 mm, siendo considerado moderadamente activo (ver tabla 1) la actividad de este extracto difiere en la cepa CCPA62 ya que el tamaño del halo es menor a las otras tres cepas, esta es la causa por la que el promedio se ve disminuido. La actividad del extracto hidroalcohólico es similar en las cepas HAIA112 y CCPC38 considerándose a este muy activo, en la cepa CCPA9 el halo de inhibición es considerado activo y en la cepa CCPA62 el halo se clasifica como moderadamente activo, por tanto el promedio de inhibición del extracto hidroalcohólico es de 18,2 mm clasificado como activo según Wang *et al*, 2005, con una desviación estandar de 3,5 que se dá por la variación entre los resultados de la cepa ya expuestos. La actividad del extracto diclorometánico muestra un promedio de 20,6 mm que se lo considera como muy activo frente a cepas de *Helicobacter pylori*, aunque existe variación en los resultados obtenidos en las cuatro cepas, donde el que menor diámetro de inhibición dio fue la cepa CCPA9 (14,2 mm), y las cepas HAIA112 Y CCPC38 mostraron el mayor tamaño de halo (23,4 mm y 23,3 mm).

El análisis estadístico por ANOVA de la variación entre el promedio del extracto acuoso al igual que el extracto hidroalcohólico y diclorometánico en relación a sus controles negativo muestra una diferencia altamente significativa para un nivel de confianza del 99 % ($p \leq 0,01$) (ver anexo 10, 11 y 12), Aunque como se puede observar en la tabla 8, existe variación evidente en el resultado de la cepa CCPA62 del extracto acuoso e hidroalcohólico sin embargo como las otras cepas responden de manera similar, la varianza no es considerable y esto hace que no interfiera en la significancia que muestra el resultado, lo mismo sucede en el extracto diclorometánico pero con la cepa CCPA9, donde tampoco se ve alterada la significancia.



El calculo de ANOVA para evaluar la variación entre cepas para los tres extractos no expresa diferencia estadísticamente significativa (ver anexo 10, 11 y 12), este resultado tiene un bajo nivel de confianza, ya que la probabilidad es menor o igual a 50%.

Un estudio realizado por Figueroa, 1997 señala que los aceites esenciales de *Clinopodium bolivianum* (antes *Satureja boliviana*) poseen actividad antibacteriana in vitro sobre *Staphylococcus aureus* (coco gram positivo), *Bacillus subtilis*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis* (bacilos gram negativo); en este estudio también se observó que el extracto diclorometánico que contiene los aceites de esta especie tiene elevada actividad contra *Helicobacter pylori* que es un bacilo gram negativo por lo tanto se recomienda que para estudios posteriores se aislen estos aceites esenciales y se pruebe nuevamente sobre esta bacteria. Como existe poca información sobre los fitoconstituyentes de esta especie queda la incógnita de saber cuales son los constituyentes que le dan la actividad anti-*Helicobacter pylori* en los otros extractos hidroalcohólico y acuoso.

Tabla 9. ACTIVIDAD ANTI-*Helicobacter pylori* DE LOS EXTRACTOS DE *Calendula officinalis* FRENTE A SUS CONTROLES NEGATIVOS

Nº de cepa	Diclorometánico	Hidroalcohólico	Acuoso	Control negativo
HAIA112	11,2 mm	19,8 mm	13,5 mm	6,0 mm
CCPA9	10,4 mm	20,0 mm	13,1 mm	6,0 mm
CCPC38	11,8 mm	21,0 mm	13,5 mm	6,0 mm
CCPA62	11,0 mm	11,0 mm	8,9 mm	6,0 mm
Promedio	**11,1 mm	*18,0 mm	*12,3 mm	6,0 mm
Desv. Est.	0,6	5,5	2,2	—
Actividad	++	+++	++	-
Variación entre Cepas	No existe variación estadística entre cepas			

Diferencia significativa frente al control: **P<0,01; *P<0,05

Actividad: ++++ Muy activo; +++ Activo; ++ Moderadamente activo; + Poco activo; - No activo

Control negativo: Promedio del control negativo de los 3 extractos (diclorometano, etanol 75%, agua destilada esteril)

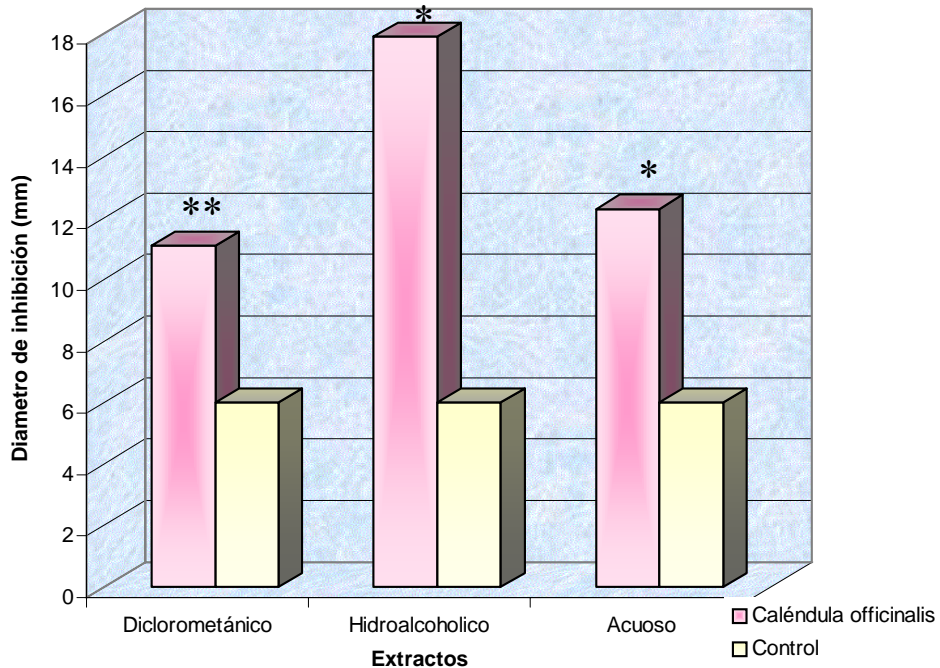


Figura 11. DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS DE *Calendula officinalis* SOBRE CEPAS DE *Helicobacter pylori* CON SUS CONTROLES NEGATIVOS

La tabla 9 y figura 11 muestra los resultados de la actividad anti-*Helicobacter pylori* expresada en diámetro de halo de inhibición (mm) de discos impregnados con 10 μL [0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$] del extracto diclorometánico, hidroalcohólico y acuoso de *Calendula officinalis* sobre cuatro cepas salvajes.

El promedio del diámetro del halo de inhibición del extracto acuoso es de 12,3 mm, siendo considerado moderadamente activo (ver tabla 1), la actividad de este extracto difiere en la cepa CCPA62 ya que el tamaño del halo es menor a las otras tres cepas (8,9 mm). La actividad del extracto hidroalcohólico es similar en las cepas HAIA112, CCPA9 y CCPC38 considerándose a este muy activo sobre estas cepas, y en la cepa CCPA62 el extracto baja su actividad dando un halo que lo clasifica como moderadamente activo, por tanto el promedio de inhibición del extracto hidroalcohólico es de 18,0 mm clasificado como activo según Wang *et al*, 2005, con una desviación relativamente elevada. La actividad del extracto diclorometánico muestra un promedio de halo de inhibición de 11,1 mm que hace que se considere al este extracto como moderadamente activo frente a cepas de *Helicobacter pylori*, la actividad de este extracto en las cuatro cepas es muy similar, por lo tanto la varianza es mínima.

El análisis estadístico por ANOVA de la variación entre el promedio del extracto acuoso al igual que el extracto hidroalcohólico en relación a sus controles negativo muestra una diferencia altamente significativa para un nivel de confianza del 95 % ($p \leq 0,05$) (ver anexo 14 y 15), Aunque como se puede observar en la tabla 9, existe variación evidente en el resultado de la cepa CCPA62 para ambos casos, sin embargo como las otras cepas responden de manera similar la varianza no es considerable y esto hace que no interfiera en la significancia que muestra el resultado, el extracto diclorometánico muestra diferencia estadísticamente significativa en relación a su control negativo para un nivel de confianza del 99% ($p \leq 0,01$), este resultado se debe a que la variación de la actividad de este extracto entre cepas es mínima (ver anexo 13).

El calculo de ANOVA para evaluar la variación entre cepas para los tres extractos no expresa diferencia estadísticamente significativa (ver anexo 13, 14 y 15), este resultado tiene un bajo nivel de confianza, ya que la probabilidad es menor o igual a 50%.

La evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus fecalis* de *Caléndula officinalis* realizada por Vanaclocha *et al.* el año 2003 reportó que esta especie poseen dicha actividad sobre estos cocos gram positivos, no hace referencia a los compuestos responsables de este efecto. En el presente estudio se evaluó la actividad antibacteriana de la *Calendula* sobre una bacteria gram negativa como es el *Helicobacter pylori* y como se puede observar en los resultados los tres extractos fueron activos, valdría la pena indagar si esta especie vegetal puede responder como antibacteriano sobre otras bacterias gram negativas ya sean cocos o bacilos, esto para determinar el espectro antibacteriano.



Tabla 10. ACTIVIDAD ANTI-*Helicobacter pylori* DE LOS EXTRACTOS DE *Piper angustifolium* FRENTE A SUS CONTROLES NEGATIVOS

Nº de cepa	Diclorometánico	Hidroalcohólico	Acuoso	Control negativo
HAIA112	11,5 mm	18,0 mm	15,6 mm	6,0 mm
CCPA9	10,1 mm	12,2 mm	14,1 mm	6,0 mm
CCPC38	10,9 mm	21,5 mm	16,7 mm	6,0 mm
CCPA62	10,6 mm	15,4 mm	14,9 mm	6,0 mm
Promedio	**10,8 mm	*16,4 mm	**15,3 mm	6,0 mm
Desv. Est.	0,6	4,7	1,1	—
Actividad	++	+++	++	-
Variación entre Cepas	No existe variación estadística entre cepas			

Diferencia significativa frente al control: **P<0,01; *P<0,05

Actividad: ++++ Muy activo; +++ Activo; ++ Moderadamente activo; + Poco activo; - No activo

Control negativo: Promedio del control negativo de los 3 extractos (diclorometano, etanol 75%, agua destilada esteril)

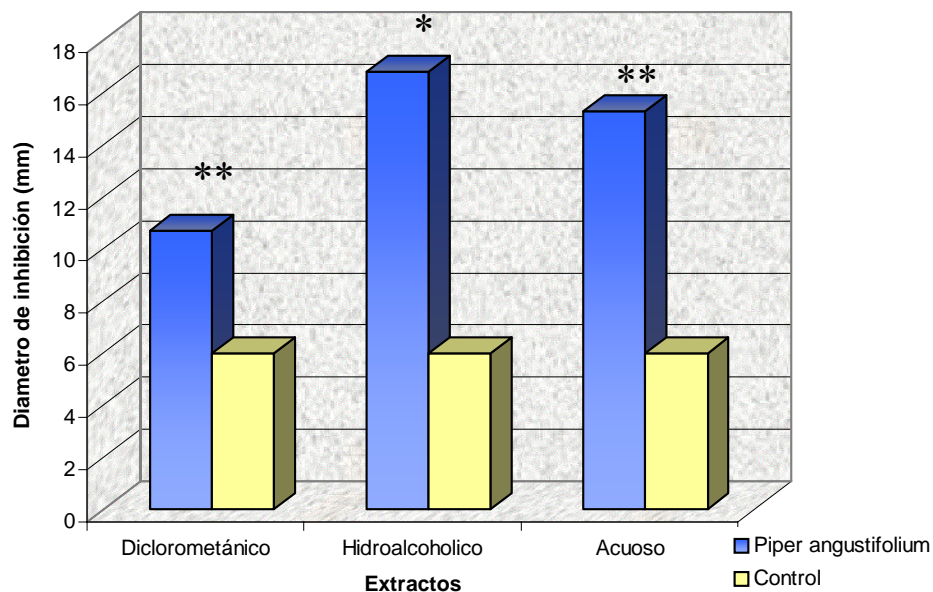


Figura 12. DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS DE *Piper angustifolium* SOBRE CEPAS DE *Helicobacter pylori* CON SUS CONTROLES NEGATIVOS



La tabla 10 y figura 12 presenta los resultados de la actividad anti-*Helicobacter pylori* expresada en diámetro de halo de inhibición (mm) de discos impregnados con 10 μ L [0,6 μ g/ μ L] del extracto diclorometánico, hidroalcohólico y acuoso de *Piper angustifolium* sobre cuatro cepas salvajes.

La actividad del extracto acuoso es similar en las cuatro cepas estudiadas, disminuyendo un poco en la cepa CCPA9 (14,1 mm), sin embargo el promedio obtenido del halo de diámetro de inhibición de este extracto sobre cepas de *Helicobacter pylori* es de 15,3 mm, esta respuesta según la tabla 1 es considerada como activa sobre esta bacteria. La actividad del extracto hidroalcohólico difiere en las cuatro cepas, el mínimo halo fue de 12,2 mm correspondiente a la cepa CCPA9 y el mayor promedio de halo fue de 15,4 mm correspondiente a la cepa CCPC38, el cálculo del promedio de inhibición de estas cuatro cepas dá como resultado un diámetro de 16,4 mm clasificado como activo según Wang *et al.* 2005. El resultado del promedio de inhibición del extracto diclorometánico es de 10,8 mm, variando en una de las tres cepas que se vé ligeramente incrementado en relación a las otras tres cepas, sin embargo la variación es insignificante, el promedio de la actividad de este extracto es clasificado según la tabla 1 como poco activo frente a cepas de *Helicobacter pylori*.

El análisis estadístico por ANOVA de la variación entre el promedio del extracto acuoso al igual que el extracto diclorometánico en comparación a sus controles negativos muestra una diferencia altamente significativa para un nivel de confianza de 99 % ($p \leq 0,01$) (ver anexo 17 y 19). Como se puede observar en la tabla 10, existe una evidente variación en el resultado de la cepa CCPA9 en el extracto acuoso y en la cepa HAIA112 en el extracto diclorometánico, sin embargo como las otras cepas responden de manera similar la varianza no es considerable y esto hace que no interfiera en la significancia del resultado. El extracto hidroalcohólico muestra diferencia estadísticamente significativa en relación a su control negativo para un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$) (ver anexo 18), sin embargo es evidente que este extracto es el que mayor actividad dió pero disminuye en su significancia debido a las diferencias que existe entre cepa y cepa.



El calculo de ANOVA para evaluar la variación entre cepas para los tres extractos no expresa diferencia estadísticamente significativa (ver anexo 17, 18 y 19), este resultado tiene un bajo nivel de confianza, ya que la probabilidad es menor o igual a 50%.

Kawase *et al.* 2004 muestran una recolección de información realizada por científicos del mundo que estudiaron productos naturales fraccionándolos para tratar de encontrar un compuesto activo sobre el *Helicobacter pylori*, es de esta información que rescatamos al flavonoide kaempferol entonces aislado de alguna especie de Mongolia. El *Piper angustifolium* posee entre uno de sus fitoconstituyente a este flavonoide (Alonso 1999), entonces la actividad anti-*Helicobacter* de alguno de los extractos de esta especie vegetal mostrada en el presente estudio podría atribuirse a este compuesto.

La evaluación de la actividad bacteriostática *in vitro* de los aceites esenciales de *Piper angustifolium* sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* realizada por Tirillini *et al.* mostró que esta especie posee dicha actividad sobre estos bacilos gram negativos. En el presente estudio como se vé en la tabla 10 el extracto diclorometánico (donde se extraen los aceites esenciales) mostró actividad sobre cepas de *Helicobacter pylori* (bacilo gran negativo), por tanto observando la coincidencia de los espectros de acción, se puede inferir que estos aceites actuan sobre bacilos gram negativos, aunque habria que realizar pruebas sobre otras bacterias.

Tabla 11. ACTIVIDAD ANTI-*Helicobacter pylori* DE LOS EXTRACTOS *Rubus boliviensis* FRENTE A SUS CONTROLES NEGATIVOS

Nºde cepa	Diclorometánico	Hidroalcohólico	Acuoso	Control negativo
HAIA112	6,0 mm	6,0 mm	6,3 mm	6,0 mm
CCPA9	6,0 mm	6,0 mm	7,0 mm	6,0 mm
CCPC38	6,0 mm	6,0 mm	6,0 mm	6,0 mm
CCPA62	6,0 mm	6,0 mm	6,0 mm	6,0 mm
Promedio	6,0 mm	6,0 mm	6,3 mm	6,0 mm
Desv. Est.	—	—	0,5	—
Actividad	-	-	-	-
Variación entre Cepas	No existe variación estadística entre cepas			

Diferencia significativa frente al control: **P<0,01; *P<0,05
 Actividad: ++++ Muy activo; +++ Activo; ++ Moderadamente activo; + Poco activo; - No activo
 Control negativo: Promedio del control negativo de los 3 extractos (diclorometano, etanol 75%, agua destilada esteril)

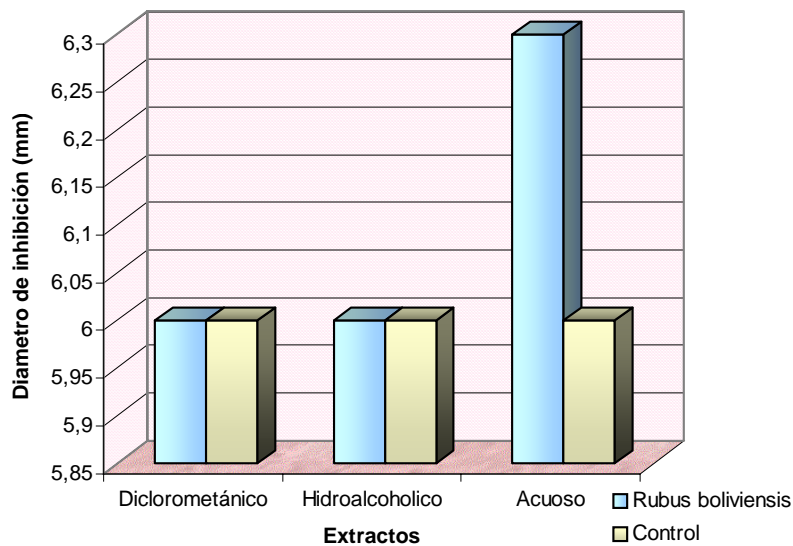


Gráfico 13. DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS DE *Rubus boliviensis* SOBRE CEPAS DE *Helicobacter pylori* CON SUS CONTROLES NEGATIVOS



La tabla 11 y figura 13 muestra la actividad anti-*Helicobacter pylori* expresada en diámetro de halo de inhibición (mm) de discos impregnados con 6 µg de extracto diclorometánico, hidroalcohólico y acuoso de *Rubus boliviensis* sobre cuatro cepas salvajes

El extracto diclorometánico e hidroalcohólico no produjeron inhibición en ninguna de las cepas (en ninguna de las tres repeticiones de la prueba), por lo tanto según la CLSI el halo que se registra es de 6 mm que corresponde al tamaño del disco. El extracto acuoso tampoco produce actividad en las cepas HAIA112, CCPC38 y CCPA62, aunque sobre la cepa CCPA9 produce un halo de inhibición de 7 mm que sin embargo es considerado como no activo (ver tabla 1).

No se puede realizar el cálculo de la variación existente entre el extracto diclorometánico y hidroalcohólico con sus respectivos controles negativos ya que no existe variación. La variación entre el promedio del extracto acuoso y su control negativo no es significativamente estadística, el resultado obtenido se encuentra dentro de los valores esperados los mismos que no se hallan lejos de el control negativo por tanto no hay efecto de actividad con un nivel de confianza de 95% ($p \leq 0,05$).

El calculo de ANOVA para evaluar la variación entre cepas para los tres extractos no expresa diferencia estadísticamente significativa (ver anexo 17, 18 y 19), este resultado tiene un bajo nivel de confianza, ya que la probabilidad es menor o igual a 50%.



VII. CONCLUSIONES



El estudio de la actividad anti-*Helicobacter pylori* de *Plantago major*, *Verbena officinalis*, *Clinopodium bolivianum*, *Caléndula officinalis*, *Piper angustifolium* y *Rubus boliviensis* por el método de difusión de disco, muestra que ha excepción de *Plantago major* y *Rubus boliviensis*, por lo menos un extracto de cada especie vegetal mostró actividad sobre la bacteria estudiada.

1. La extracción acuosa de las seis especies estudiadas resultó ser la de mayor rendimiento, destacándose la *Caléndula officinalis* que generó un rendimiento del 32,4%; el extracto diclorometánico de las seis especies fue el que menor rendimiento mostró, siendo el mínimo valor 1,5% correspondiente a las hojas de la misma especie.
2. En los extractos diclorometánico, hidroalcohólico y acuoso de *Clinopodium bolivianum*, *Caléndula officinalis* y *Piper angustifolium*, se evidencia actividad anti-*Helicobacter pylori*; de igual manera el extracto diclorometánico de la *Verbena officinalis*. *Plantago major* y *Rubus boliviensis* no presenta actividad anti-*Helicobacter pylori*. La tetraciclina como un antimicrobiano de amplio espectro ejerció su acción inhibitoria sobre las cepas salvajes utilizadas en este estudio.
3. Después del análisis estadístico de la variación existente entre el extracto de la planta y su control negativo para un nivel de confianza del 99%, podemos concluir que la actividad anti-*Helicobacter pylori* es significativa en todos los extractos de *Clinopodium bolivianum*, en el extracto diclorometánico de *Verbena officinalis* y *Caléndula officinalis* y en el extracto diclorometánico y acuoso de *Piper angustifolium*; y el análisis estadístico para un nivel de confianza del 95%, concluye que la actividad anti-*Helicobacter pylori* es significativa en el extracto hidroalcohólico de *Piper angustifolium*, extracto hidroalcohólico y acuoso de *Caléndula officinalis*. Los otros extractos de las especies vegetales no presenta variación significativa respecto al control negativo.

4. El cálculo estadístico realizado en base a la actividad de los extractos sobre de la variación entre las cuatro cepas estudiadas no muestra diferencias significativas, por lo que podemos inferir que las cepas responden a la actividad de las plantas de forma similar.





VIII. BIBLIOGRAFIA



ABAD, MJ.; BERMEJO, P.; GONZALES, E.; IGLESIAS, I.; IRURZUN, A.; CARRASCO, L. Antiviral activity of Bolivian plant extracts. *Gen Pharmacol*, 1999, vol. 32, no. 4, p. 499-503.

ACOSA, Lerida; RODRÍGUEZ, Carlos y SÁNCHEZ, Esther. Instructivo técnico de *Calendula officinalis*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2001, no. 1, p. 23-27.

AKIHISA, Toshihiro; YASUKAWA, Ken; OINUMA, Hirotoshi; KASAHARA, Yoshimasa; YAMANOUCHI, Sakae; TAKIDO, Michio; KUMAKI, Kunio y TAMURA, Toshitake. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochem.*, 1996, vol 43, no. 6, p. 1255-1260

ALARCON, Teresa; DOMINGO, Diego y LOPEZ, Manuel. Antibiotic resistance problems with *Helicobacter pylori*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 1999, vol. 12, no. 1, p. 19-26

ALVAREZ, Teresa. Estudio Multicentrico del *Helicobacter pylori*, Tesis de grado, FCFB, La Paz- Bolivia. 1997.

ANKLI, A.; HEINRICH, M.; BORK, P. *et al.*, Yucatec Mayan medicinal plantas: Evaluation based on indigenous uses, *Journal of Ethnopharmacology*, 2002, vol 79, p. 43-52

ARGENTO, A.; TIRAFERRI, E. y MARZALONI, M., Oral anticoagulants and medicinal plants. *Annali italiani di medicina interna* , 2000, vol. 15, no. 2, p. 139-143

ARTECHE, Alejandro; La fitoterapia en medicina, Cuba, VANACLOTXA, 1992

BAE, E.; HAN, M. y KIM, D. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of some flavonoids and their metabolites, *Planta medica*, 1999, vol. 65, p. 442-443

BARBOSA, Elizabeth; CALZADA, Fernando y CAMPOS Rafael, Antigiardial activity of methanolic extracts from *Helianthemum glomeratum* Lag. and *Rubus coriifolius* Focke in suckling mice CD-1, *Journal of Ethnopharmacology*, June 2006.

BATISTA, L.; CASTRAL, T.; DA SILVA, M.; AMARAL, R.; FERNANDES, J.; VIEIRA, P.; DA SILVA, M. y CORREA, A., Insecticidal activity of synthetic amides on *Spodoptera frugiperda*, *Zeitschrift für Naturforschung*, 2006, vol. 61, no. 3-4, p. 196-202

BERTI, Marisol; WILCKENS, Rosemarie; HEVIA, Felicitas y MONTECINOS, Alejandro, Influence of sowing date and seed origin on the yield of capitula of *Calendula officinalis* L. during two growing seasons in Chillán, *Agricultura Técnica*, 2003, vol. 3, no. 1, p. 3-9

BERIT, ANNE. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L., *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, vol. 71, p. 1-21.



BOYANOVA, Ludmila; STANCHEVA, Irina; SPASSOVA, Zoya; KATZAROV, Nikolai; MITOV, Ivan y KOUMANOVA, Radka. Primary and combined resistance to four antimicrobial agents in *Helicobacter pylori* in Sofia, Bulgaria. *Journal of medical microbiology*, 2000, vol. 49, p. 415-418.

BUJANDA, L.; SÁNCHEZ, A.; IRIONDO, C.; SANTOS, A.; COSME, A. y MUÑOZ, C. Estudio comparativo en la erradicación del *Helicobacter pylori* ranitidina-citrato bismuto frente omeprazol más dos antibióticos durante 7 días, *An. Medicina Interna*, 2001, vol 18, no. 7.

CÁCERES, A.; GIRON, L. y MARTINEZ, A. Diuretic activity of plants used for the treatment of urinary ailments in Guatemala, *Journal Ethnopharmacology*, 1987a, vol. 19, p. 223-245

CÁCERES, A.; GIRON, L.; ALVARADO, S. y TORRES, M. Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases, *Journal of Ethnopharmacology*, 1987b, vol. 20, p. 223-237.

CÁCERES, A.; CANO, O.; SAMAYOA, B. y AGUILAR, L. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. A. Screening of 84 plants against enterobacteria, *Journal of Ethnopharmacology*, 1990, vol. 30, p. 55-73.

CALVO, M. Anti-inflammatory and analgesic activity of the topical preparation of *Verbena officinalis* L., *Journal of Ethnopharmacology*, Oct 2006; vol. 107, no. 3, p. 380-382.

CAÑIZARES, Pablo; GRACIA, Ignacio; GOMEZ, Luis; ARGILA, Martín; RAFAEL, Luis y GARCIA, Antonio. Optimization of *Allium sativum* solvent extraction for the inhibition of in vitro growth of *Helicobacter pylori*, *Biotechnology*, 2002, vol. 18, p. 1227-1232

CARNAT, A.; CARNAT, A.; WYLDE, R. y LAMAISON, J., Luteolin 7-diglucuronide, the major flavonoid compound from *Aloysia triphylla* and *Verbena officinalis*, *Planta medica*, 1995, vol. 61, no. 5, p. 490.

CHAITHONG, U.; CHOOCHOTE, W.; KAMSUK, K.; JITPAKDI, A.; TIPPAWANGKOSOL, P.; CHAIYASIT, D.; CHAMPAKAEW, D.; TUETUN, B. y PITASAWAT, B. Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), *Journal of vector ecology*, 2006, vol. 31, no. 1, p. 138-44

DEEPAK, M. y HANDA, S. Antiinflammatory activity and chemical composition of extracts of *Verbena officinalis*, *Phytotherapy research*, 2000, vol. 14, no. 6, p. 463-465.

DJADJO, Corine; DELMÉE, Michel; y QUETIN, Joëlle, Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae), *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, vol. 71, no. 1-2, p. 307-313.



EGLSEER, Ziterl; SOSA, S.; JURENITSCH, J. *et al.*, Anti-oedematous activities of the main triterpendiol esters of *C. officinalis* (marigol), *Journal of Ethnopharmacology*, 1997, vol. 57, p. 139-44.

FABRY, W; OKEMO, P. y ANSORG, R., Activity of East African medicinal plants against *Helicobacter pylori*, *Microbiology*, 1996, vol. 42, p. 315-317.

FARAHNAZ, Noriman; FERESHTEH, Eftekar; ZOHREH, Habibi y TAHEREH, Falsafi, Anti-*Helicobacter pylori* Activities of Six Iranian Plants, *Helicobacter*, 2004, vol. 9, no.2.

GARAVITO, G.; RINCON, J.; ARTEAGA, L.; HATA, Y.; BOURDY, G; GIMENEZ, A.; PINZON, R.y DEHARO, E., Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants, *Journal of Ethnopharmacology*, Oct 2006, vol. 107, no. 3, p. 460-462.

GARCIA, Mildred; COTO, Teresita; SOTO, Gerardo y PAZOS, Liliana. Toxicidad sub crónica y prueba de la irritabilidad ocular del extracto acuoso de las hojas de *Plantago major* (Plantaginaceae), *Revista de Biología Tropical*, 2003, vol. 51, no. 3-4.

GERMANÓ, M.; SANOGO, R.; GUGLIELMO, M.; DE PASCUALE, R.; CRISAFI, G.; BISIGNANO, G.; Effect of *Ptelipsis suberosa* extracts on experimental gastric ulcers and *Helicobacter pylori* growth, *Journal of Ethnopharmacology*, 1998, vol. 59, p. 167-172.

GIRAULT, Louis. Kallawaya-Curanderos Itinerantes de los Andes. La Paz-Bolivia, UNICEF-OPS-OMS ED., 1987.

GLUPCZYNSKI, Youri; WILLY, MAX; CROKAERT, Françoise y YOURASSOWSKY, Eugène, Evaluation of the E. test for Quantitative Antimicrobial Susceptibility Testing of *Helicobacter pylori*, *Journal of Clinical Microbiology*, 1991, p. 2072-2075.

GONZALES, Eduardo. Especies antiinflamatorias de la flora Boliviana, Tesis para optar al grado de Doctor en Farmacia, Madrid-España. 1998.

GONZALES, Eduardo. Evaluación de la Actividad gastroprotectora y ulcerogénica de plantas medicinales bolivianas, *Revista Boliviana de Química*, 2001, vol. 18, no. 1, p. 195-198.

GUARRERA, P.; FORTI, G. y MARIGNOLI, S., Ethnobotanical and ethnomedicinal uses of plants in the district of Acquapendente (Latium, Central Italy), *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, vol. 96, no. 3, p. 429-444..

GUI, CH., Antitussive constituents of *Verbena officinalis*, *Zhog Yao Tong Bao*, 1985, vol. 10, no. 10, p. 35.

GUILLEN, M.; EMIM, J.; SOUCCAR, C. y LAPA, A., Analgesic and antiinflammatory activities of the aqueous extract of *Plantago major* L., *Journal Pharmacognosy*, 1997, vol. 35, p. 99-104.



GUPTA, M. P. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Santa Fé de Bogotá-Colombia, Presencia Ltda. ED. 1995

HAMILL, F.; APIO, S.; MUBIRU, N.; MOSANGO, M.; BUKENYA, R.; MAGANYI, O. y SOEJARTO, D., Traditional herbal drugs of southern Uganda: Part III: Isolation and methods for physical characterization of bioactive alkanols from *Rubus apetalus*, *Journal of Ethnopharmacology*, Jul. 2003, vol.87, no.1, , p. 15-19.

HASSAN, Jouad; MHAMED, Maghrani y MOHAMED Eddouks, Hypoglycaemic effect of *Rubus fruticosus* L. and *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats, *Journal of Ethnopharmacology*, August 2002, vol. 81, no.3, p. 351-356.

HERNANDEZ, N.; TERESCHUK, M. y ABDALA, L., Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi del Valle (Tucuman, Argentina), *Journal of Ethnopharmacology*, Nov 2000, vol. 73, no. 1-2, p. 317-322

HERNÁNDEZ, Manuel. *Helicobacter pylori*. La bacteria que mas infecta al ser humano Revista Cubana de Alimentación y nutrición , 2000; vol. 15, no. 1, p. 42-54

HETLAND G.; SAMUELSEN A.; LÉVIK, M.; PAULSEN, B; AABERGE, I.; GROENG, E. y MICHAELSEN, T., Protective Effect of *Plantago major* L. Pectin Polysaccharide against Systemic *Streptococcus pneumoniae* Infection in Mice, *Journal of Immunology*, 2000, vol. 52, p. 348±355.

KARPILOVSKAYA, E.; GORBAN, G.; PLISS, M.; ZAKHARENKO, L. Y GULICH, M., Inhibitory action of the polyphenolic complex from *P. major* – plastastine on the carcinogenic effect of endogenously synthesized nitrosodimethylamine, *Farmacologia y Toxicología*, 1989, vol 4, no. 52, p. 64-67

KAWASE, Masami y MOTOHASHI, Noboru. Plant-Derived Leading Compounds for Eradication of *Helicobacter pylori*, *Medical chemistry*, 2004, vol. 3. p. 89-100.

KISHIMOTO, S.; MAOKA, T.; SUMITOMO, K. y OHMIYA, A., Analysis of carotenoid composition in petals of calendula (*Calendula officinalis* L.), *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2005, vol. 69, no. 11, p. 2122-2128.

KLOUCHEK, E.; POPOV, A.; POVLOVA, N., Influence of the physiological regeneration and epithelization using fractions isolates from *Calendula officinalis*, *Acta Pharmacologica de Bulgaria*. 1982, vol.8, no. 4, p. 63.

KONEMAN, Elmer. Diagnostico Microbiológico. 5 ed. Buenos Aires-Argentina, Panamericana ED. 2001.

KRAUSSE, Rea; BIELENBERG, Jens; BLASCHEK, Wolfgang y ULLMANN, Uwe. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of Extractum *liquiritiae*, *glycyrrhizin* and its metabolitos". *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 2004, vol. 54, no. 1, p. 243-246



LAI, SW.; YU, MS.; YUEN, WH. y CHANG, RC. Novel neuroprotective effects of the aqueous extracts from *Verbena officinalis* Linn, *Neuropharmacology*, May 2006, vol. 50, no. 6, p. 641-650

LASTRA, Humberto y PIQUET, Rosario. *Caléndula officinalis*, *Revista Cubana Farmacia*, 1999, vol. 33, no.3.

LI, Yang; XU, Chen; ZHANG, Qiang; LIU, Yan y XIANG, Tan. In vitro anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases, *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, vol. 98, no. 3, p. 329-333.

LITHANDER, A., Intracellular fluid of waybread (*Plantago major*) as a prophylactic for mammary cancer in mice. *Tumor Biology*, 1992, vol. 13, p. 138-141.

Los Amigos del Libro. Flora Medicinal Boliviana. La Paz, Cochabamba-Bolivia, 1992..

MCCUTCHEON, A.; ELLIS, S.; HANCOCK, R.; TOWERS, G., Antibiotic screening of medicinal plants of the British Colombian native peoples, *Journal of Ethnopharmacology*, 1992, vol. 37, p. 213-223.

MCCUTCHEON, A.; ELLIS, S.; HANCOCK, R.; TOWERS, G., Antifungal screening of medicinal plants of British Columbian native peoples, *Journal of Ethnopharmacology*, 1994, vol. 44, p.157-169.

MOSKALENKO, S., Preliminary screening of far-eastern ethnomedicinal plants for antibacterial activity, *Journal of Ethnopharmacology*, 1986, vol. 15, p. 231-259.

NALINI, N.; MANJU, V. y MENON, V.; Effect of spices on lipid metabolism in 1,2 dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis, *Journal of medicinal food*, 2006, vol. 9, no. 2, p. 237-45.

NOGUEIRA, E.; ROSA, G.; HARAGUCHI, M. y VASSILIEFF, V., Anxiolytic effect of *Rubus brasiliensis* in rats and mice, *Journal of Ethnopharmacology*, June 1998, vol. 61, no.2, p. 111-117.

OBLITAS, Enrique. Plantas Medicinales en Bolivia. La Paz-Bolivia., 1992.

ORTIZ, Tamariz; HUMBERTO, Jesús; MENDOZA, Capcha; CADENAS, Palomino y JULIO, Edwin. Actividad antibacteriana de la Sangre de Grado (*Croton lechleri*) frente al *Helicobacter pylori*, *Revista Medica Heredia*, 2003, vol. 14, no. 2, p. 81.

PANIZZI, L.; CAPONI, C.; CATALANO, S.; CIONI, P. y MORELLI, I., In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*, *Journal of Ethnopharmacology*, February 2002, vol. 79, no. 2, p. 165-168.



PATRICK, K.; KUMAR, S.; EDWARDSON, P. y HUTCHINSON, J., Induction of vascularization by an aqueous extract of the flowers of *Calendula officinalis* L., the European Marigold, *Phytomedicine*, 1996, vol. 3, no.1, p. 11-18.

PIÑEROS, Jorge y GARCÍA, Hernando. Plantas Medicinales: Compendio de farmacología vegetal. Bogotá-Colombia, 1991.

PLACENCIA, M.; RAMOS, H.; RIMACHI, M.; AVILA, J. y ALARCÓN, E. Estudio comparativo del efecto gastroprotector del *Piper angustifolium* y *Buddleia globosa* en ratas, Facultad de medicina. Univ. Nacional Mayor San Marcos, Lima, Perú. WOCMAP II, Mendoza, Argentina. 1997.

PONCE, M.; NAVARRO, I.; MATINEZ, M.; ALVAREZ, R. *In vitro* anti-giardiasis activity of plant extracts. *Revista de Investigación Clínica*, 1994, vol 46, p. 343-347.

RAMÍREZ, Alberto y GILMAN, Robert. *Helicobacter pylori* en el Perú. 1ed. Lima-Perú ; 2003.

RAMÍREZ, Alberto; CHINGA, Erick; MENDOZA, Daniel; LEEY, Julio; SEGOVIA, María y OTOYA, César. Variación de la prevalencia del *Helicobacter pylori* en el Perú Período (1985-2002), en una población de nivel socioeconómico medio y alto, *Revista gastroenterologica*, 2003, vol. 23, p. 92-98.

ROCABADO, Guillermo. Estudio sobre la actividad antiinflamatoria, ulcerogénica y gastroprotectora de las especies medicinales: *Rubus boliviensis* (Khari-Khari), *Xanthium spinosum* (Amor seco), *Smilax aspera* (Zarzaparrilla), mediante modelos experimentales in vivo. Tesis para optar el grado de licenciatura en Química Farmacéutica, La Paz-Bolivia; 2004.

ROLLÁN, Antonio. *Helicobacter pylori* y ulcera péptica, *Boletín Escuela de Medicina, Universidad Católica de Chile*, 1994, vol. 23, p. 130-135.

SHAHAMAT, M.; MAI, U.; PASZKO, C.; YAMAMOTO, H. y COLWELL, R. , Evaluation of Liquid Media for Growth of *Helicobacter pylori*, *Journal of Clinical Microbiology*, 1991, vol. 29, no. 12, p. 2835-2837.

SOO, Byeoung; HYUN, Lee; SUNG, Lee; XIANG, Piao; GARY, Y.; Wong, Ahna; Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Tahebo) against *Helicobacter pylori*, *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, vol. 105, p. 255-262.

STAMATIS, George; KYRIAZOPOULOS, Panayiotis; GOLEGOU, Stamatina; BASAYIANNIS, Aris; SKALTSAS, Spyros y SKAL TSA, Helen. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines, *Journal of Ethnopharmacology*, 2003, vol. 88, no. 2-3, p. 175-179.

TAGBOTO, S; TOWNSON, S. Antiparasitic properties of medicinal plants and other natural occurring products, *Advances in parasitology*, 2001, vol. 50, p. 199-295.



TAKASHIMA, J; CHIBA, N; YONEDA, K y OHSAKI, A. Derrisin, a new rotenoid from *Derris malaccensis* plain and anti-*Helicobacter pylori* activity of its related constituents, *Journal of natural products*, 2002, vol. 65, p. 611-613.

TEEDROGEN, Max. *Wissenschaftliche Verlangsgesellschaft*. 1989, p. 466-469.

TIAN, J.; ZHAO, YM. y LUAN, XH. Studies on the chemical constituents in herb of *Verbena officinalis*, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2005, vol. 30, no. 4, p. 268-269.

TIRILLINI B.; VELÁSQUEZ, ER.; PELLEGRINO, R.. Chemical composition and antimicrobial activity essential oil of *Piper angustifolium*. *Planta Medica*, Aug 1996, vol. 62, no. 4, p.372-373

VALENZUELA, Jorge. *Helicobacter pylori*. *Rev Méd Chile*, 2004, vol. 132, p. 1339-1344

WANG, Yuan-Chuen y HUANG, Tung-Liang. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Plumbago zeylanica* L., *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, vol. 43, no. 3, p. 407-412.

WANG, Yuan-Chuen y HUANG, Tung-Liang. Screening of anti-*Helicobacter pylori* herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants, *Immunology and Medical Microbiology*, 2005, vol. 43, no. 2, p. 295-300.

YAM, TS.; Shah, S. y HAMILTON, KMT. Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea components. *Microbiology lett*, 1997, vol. 152, p. 169-174.

YAREMENKO, K.V.; Adaptogens of the natural origin in prophylactic oncology, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1990, vol. 116, p. 82.

YEE, YK.; KOO, MW. y SZETO, ML. Chinese tea consumption and lower risk of *Helicobacter* infection, *Journal of gastroenterology and hepatology*, 2002; vol. 17, p. 552-555.

YEŞİlada, Erdem; GÜRBÜZ, İhan y SHIBATA, Hirofumi. Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity, *Journal of Ethnopharmacology*, 1999, vol. 66, no. 3, p. 289-293.

YOUNG, SC.; WANG, CJ.; LIN, JJ.; PENG, PL.; HSU, JL. y CHOU, FP. Protection effect of piper betel leaf extract against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats, *Archives of toxicology*, 2006 May 5.

ZAIDAN, MR.; NOOR, A.; BADRUL, AR.; ADLIN, A.; NORAZAH, A. y ZAKIAH, I. *In vitro* screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method, *Tropical biomedicine*, Dec 2005, vol. 22, no. 2, p.165-170.

ZHANG, T.; RUAN, JL. y LU, ZM. Studies on chemical constituents of aerial parts of *Verbena officinalis* L. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*.2000, vol. 25, no. 11, p. 676-678.

ZITTERL, K.; SOSA, S.; JURENITSCH, J.; SCHUBERT, M.; DELLA, R.; TUBARO, A.; BERTOLDI, M. y FRANZ, C. Anti-oedematous activities of the main triterpenoid esters of marigold (*Calendula officinalis* L.), *Journal of Ethnopharmacology*, July 1997, vol. 57, no. 2, p. 139-144.



Anexo 1
Resultados de la tetraciclina de las tres repeticiones por cepa

Nº cepa	1	2	3	Promedio
HAIA112	50	50	50	50
CCPA9	52	51	51,8	51,6
CCPC38	52,3	51,4	52	51,9
CCPA62	49,5	49,7	50	49,7

Anexo 2
Resultado de los halos de inhibición de los tres extractos tres repeticiones por cepa
Cepa 11,2A Hospital Arco Iris Extracto diclorometano

Disco	Halo inhibición 1	Halo inhibición 2	Halo inhibición 3	Promedio
<i>Plantago major</i>	6	6	6	6,0
<i>Verbena officinalis</i>	11,6	10,8	12,9	11,8
<i>Satureja boliviana</i>	24,6	23,2	22,4	23,4
<i>Calendula officinalis</i>	12	10,2	11,5	11,2
<i>Piper angustifolium</i>	10,8	12	10,7	11,2
<i>Rubus boliviensis</i>	6	6	6	6,0
<i>Control</i>	6			6,0

Cepa 11,2A Hospital Arco Iris Extracto etanólico

Disco	Halo inhibición 1	Halo inhibición 2	Halo inhibición 3	Promedio
<i>Plantago major</i>	18,3	16,6	17,9	17,6
<i>Verbena officinalis</i>	22,2	22,8	22,5	22,5
<i>Satureja boliviana</i>	20,4	22	20,1	20,8
<i>Calendula officinalis</i>	21,8	15,6	21,9	19,8
<i>Piper angustifolium</i>	18	17,5	18,4	18,0
<i>Rubus boliviensis</i>	6	6	6	6,0
<i>Control</i>	6			6,0

Cepa 11,2A Hospital Arco Iris Extracto acuoso

Disco	Halo inhibición 1	Halo inhibición 2	Halo inhibición 3	Promedio
<i>Plantago major</i>	6	6	6	6,0
<i>Verbena officinalis</i>	6	6	6	6,0
<i>Satureja boliviana</i>	14	15,2	14,3	14,5
<i>Calendula officinalis</i>	13,6	13,7	13,3	13,5
<i>Piper angustifolium</i>	15,5	16,3	15	15,6
<i>Rubus boliviensis</i>	6,7	6,1	6	6,3
<i>Control</i>	6			6,0

Cepa 9A Clinica caja petrolera Extracto diclorometano

Disco	Halo inhibición 1	Halo inhibición 2	Halo inhibición 3	Promedio
<i>Plantago major</i>	6	6		6,0
<i>Verbena officinalis</i>	12,5	12,6		12,6
<i>Satureja boliviana</i>	14,2	14,2		14,2
<i>Calendula officinalis</i>	10,5	10,2		10,4
<i>Piper angustifolium</i>	10,6	9,6		10,1
<i>Rubus boliviensis</i>	6	6		6,0
control	6			6,0

Cepa 9A Clinica caja petrolera Extracto etanólico

Disco	Halon inhibición 1	Halon inhibición 2	Halon inhibición 3	Promedio
<i>Plantago major</i>	17,2	16,7		17,0
<i>Verbena officinalis</i>	17,3	16,5		16,9
<i>Satureja boliviana</i>	17,9	18,5		18,2
<i>Calendula officinalis</i>	19,7	20,3		20,0
<i>Piper angustifolium</i>	12	12,3		12,2
<i>Rubus boliviensis</i>	6	6		6,0
control	6			6,0

Cepa 9A Clinica caja petrolera Extracto acuoso

Disco	Halon inhibición 1	Halon inhibición 2	Halon inhibición 3	Promedio
<i>Plantago major</i>	6	6		6,0
<i>Verbena officinalis</i>	6	6		6,0
<i>Satureja boliviana</i>	16	15,4		15,7
<i>Calendula officinalis</i>	12,9	13,3		13,1
<i>Piper angustifolium</i>	15	13,2		14,1
<i>Rubus boliviensis</i>	6	8		7,0
control	6			6,0

Cepa 38C Clinica caja petrolera Extracto diclorometano

Disco	Halo inhibición 1	Halo inhibición 2	Halo inhibición 3	Promedio
<i>Plantago major</i>	6	6	6	6,0
<i>Verbena officinalis</i>	12,3	12,1	11	11,8
<i>Satureja boliviana</i>	23,2	23,7	22,9	23,3
<i>Calendula officinalis</i>	11,5	12,1		11,8
<i>Piper angustifolium</i>	11,3	10,8	10,6	10,9
<i>Rubus boliviensis</i>	6	6	6	6,0



<i>control</i>	6		6,0
----------------	---	--	-----

Cepa 38C Clinica caja petrolera Extracto etanólico

Disco	Halo inhibición 1	Halo inhibición 2	Halo inhibición 3	Promedio
<i>Plantago major</i>	16	16,5	16,8	16,4
<i>Verbena officinalis</i>	22,3	22,1	21	21,8
<i>Satureja boliviana</i>	20,6	20,9	20,1	20,5
<i>Calendula officinalis</i>	21,7	21,3	20,1	21,0
<i>Piper angustifolium</i>	21,7	23	19,9	21,5
<i>Rubus boliviensis</i>	6	6	6	6,0
<i>control</i>	6			6,0

Cepa 38C Clinica caja petrolera Extracto acuoso

Disco	Halo inhibición 1	Halo inhibición 2	Halo inhibición 3	Promedio
<i>Plantago major</i>	6	6	6	6,0
<i>Verbena officinalis</i>	6	6	6	6,0
<i>Satureja boliviana</i>	15,2	16	15,9	15,7
<i>Calendula officinalis</i>	13	13,9	13,7	13,5
<i>Piper angustifolium</i>	16	17,5	16,5	16,7
<i>Rubus boliviensis</i>	6	6	6	6,0
<i>control</i>	6			6,0

Cepa 6.2A Clinica caja petrolera Extracto diclorometano

Disco	Halo inhibición 1	Halo inhibición 2	Halo inhibición 3	Promedio
<i>Plantago major</i>	6	6	6	6,0
<i>Verbena officinalis</i>	11,8	9,2	11,5	10,8
<i>Satureja boliviana</i>	20	24,5	19,6	21,4
<i>Calendula officinalis</i>	11,4	10	11,5	11,0
<i>Piper angustifolium</i>	10,9	9,5	11,3	10,6
<i>Rubus boliviensis</i>	6	6	6	6,0
<i>control</i>	6			6,0

Cepa 6.2A Clinica caja petrolera Extracto etanólico

Disco	Halo inhibición 1	Halo inhibición 2	Halo inhibición 3	Promedio
<i>Plantago major</i>	6	6	6	6,0
<i>Verbena officinalis</i>	6	6	6	6,0
<i>Satureja boliviana</i>	13,1	13,6	13,2	13,3
<i>Calendula officinalis</i>	12	10,2	10,8	11,0



<i>Piper angustifolium</i>	14,7		16	15,4
<i>Rubus boliviensis</i>	6	6	6	6,0
control	6			6,0

Cepa 6,2A Clinica caja petrolera Extracto acuoso

Disco	Halo inhibición 1	Halo inhibición 2	Halo inhibición 3	Promedio
<i>Plantago major</i>	6	6	6	6,0
<i>Verbena officinalis</i>	6	6	6	6,0
<i>Satureja boliviana</i>	12	12,5	11,2	11,9
<i>Calendula officinalis</i>	9,1	8	9,6	8,9
<i>Piper angustifolium</i>	15	14,6	15	14,9
<i>Rubus boliviensis</i>	6	6	6	6,0
control	6			6,0

Anexo 3

Análisis estadístico de la tetraciclina vs control negativo

Análisis estadístico de la variación entre cepas

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Tetraciclina	4	203,2	50,8	1,23333333
Contro negativo	4	24	6	0
HAIA112	2	56	28	968
CCPA9	2	57,6	28,8	1039,68
CCPC38	2	57,9	28,95	1053,405
CCPA62	2	55,7	27,85	954,845

Análisis de varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	4014,08	1	4014,08	6509,31892	4,1969E-06	10,1279625
Columnas	1,85	3	0,61666667	1	0,5	9,27661858
Error	1,85	3	0,61666667			
Total	4017,78	7				

Anexo 4

Análisis estadístico del extracto diclorometánico *Plantago major* vs control negativo

Análisis estadístico de la variación entre cepas

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
<i>Plantago major</i>	4	24	6	0
control	4	24	6	0
HAIA112	2	12	6	0
CCPA9	2	12	6	0



CCPC38	2	12	6	0
CCPA62	2	12	6	0

Análisis de varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	0	1	0	65535	#¡NUM!	10,1279625
Columnas	0	3	0	65535	#¡NUM!	9,27661858
Error	0	3	0			
Total	0	7				

Anexo 5

Análisis estadístico del extracto hidroalcohólico del
Plantago major vs el control negativo
Análisis estadístico de la variación entre cepas

	HAIA112	CCPA9	CCPC38	CCPA62
<i>Plantago major</i>	17,6	17	16,4	6
<i>control</i>	6	6	6	6

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Plantago major	4	57	14,25	30,49
control	4	24	6	0
HAIA112	2	23,6	11,8	67,28
CCPA9	2	23	11,5	60,5
CCPC38	2	22,4	11,2	54,08
CCPA62	2	12	6	0

Análisis de varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	136,125	1	136,125	8,9291571	0,0582157	10,127962
Columnas	45,735	3	15,245	1	0,5	9,2766186
Error	45,735	3	15,245			
Total	227,595	7				

Anexo 6

Análisis estadístico del extracto acuoso de *Plantago major* vs el control negativo
 Análisis estadístico de la variación entre cepas

	HAIA112	CCPA9	CCPC38	CCPA62
<i>Plantago major</i>	6	6	6	6
Control	6	6	6	6

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Plantago major	4	24	6	0
Control	4	24	6	0
HAIA112	2	12	6	0
CCPA9	2	12	6	0
CCPC38	2	12	6	0
CCPA62	2	12	6	0

Análisis de varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	0	1	0	65535	#¡NUM!	10,127962
Columnas	0	3	0	65535	#¡NUM!	9,2766186
Error	0	3	0			
Total	0	7				



Anexo 7

Análisis estadístico del extracto diclorometánico *Verbena officinalis* vs control negativo
Análisis estadístico de la variación entre cepas

	HAIA112	CCPA9	CCPC38	CCPA62
<i>Verbena officinalis</i>	11,8	12,6	11,8	10,8
<i>control</i>	6	6	6	6

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Verbena officinalis	4	47	11,75	0,5433333
Control	4	24	6	0
HAIA112	2	17,8	8,9	16,82
CCPA9	2	18,6	9,3	21,78
CCPC38	2	17,8	8,9	16,82
CCPA62	2	16,8	8,4	11,52

Análisis de varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	66,125	1	66,125	243,40491	0,0005723	10,127962
Columnas	0,815	3	0,2716667	1	0,5	9,2766186
Error	0,815	3	0,2716667			
Total	67,755	7				

Anexo 8

Análisis estadístico del extracto hidroalcohólico del

Verbena officinalis vs el control negativo

Análisis estadístico de la variación entre cepas

	HAIA112	CCPA9	CCPC38	CCPA62
<i>Verbena officinalis</i>	22,5	16,9	21,8	6
<i>control</i>	6	6	6	6

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Verbena officinalis	4	67,2	16,8	58,046667
control	4	24	6	0
HAIA112	2	28,5	14,25	136,125
CCPA9	2	22,9	11,45	59,405
CCPC38	2	27,8	13,9	124,82
CCPA62	2	12	6	0

Análisis de varianza

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	233,28	1	233,28	8,0376708	0,0659132	10,127962
Columnas	87,07	3	29,023333	1	0,5	9,2766186
Error	87,07	3	29,023333			
Total	407,42	7				



Anexo 9

Análisis estadístico del extracto acuoso de *Verbena officinalis* vs el control negativo

Análisis estadístico de la variación entre cepas

	HAIA112	CCPA9	CCPC38	CCPA62
<i>Verbena officinalis</i>	6	6	6	6
Control	6	6	6	6

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Verbena officinalis	4	24	6	0
Control	4	24	6	0
HAIA112	2	12	6	0
CCPA9	2	12	6	0
CCPC38	2	12	6	0
CCPA62	2	12	6	0

Análisis de varianza

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	0	1	0	65535	#¡NUM!	10,127962
Columnas	0	3	0	65535	#¡NUM!	9,2766186
Error	0	3	0			
Total	0	7				

Anexo 10
 Análisis estadístico del extracto diclorometánico
Clinopodium bolivianum vs control negativo
 Análisis estadístico de la variación entre cepas

	HAIA112	CCPA9	CCPC38	CCPA62
<i>Clinopodium bolivianum</i>	23,4	14,2	23,3	21,4
<i>Control</i>	6	6	6	6

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Clinopodium bolivianum	4	82,3	20,575	18,909167
control	4	24	6	0
HAIA112	2	29,4	14,7	151,38
CCPA9	2	20,2	10,1	33,62
CCPC38	2	29,3	14,65	149,645
CCPA62	2	27,4	13,7	118,58

Análisis de varianza

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	424,86125	1	424,86125	44,937068	0,0067736	10,127962
Columns	28,36375	3	9,4545833	1	0,5	9,2766186
Error	28,36375	3	9,4545833			
Total	481,58875	7				

Anexo 11

Análisis estadístico del extracto hidroalcohólico del
Clinopodium bolivianum vs el control negativo
 Análisis estadístico de la variación entre cepas

	HAIA112	CCPA9	CCPC38	CCPA62
<i>Clinopodium bolivianum</i>	20,8	18,2	20,5	13,3
<i>control</i>	6	6	6	6

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Clinopodium bolivianum	4	72,8	18,2	12,02
control	4	24	6	0
HAIA112	2	26,8	13,4	109,52
CCPA9	2	24,2	12,1	74,42
CCPC38	2	26,5	13,25	105,125
CCPA62	2	19,3	9,65	26,645

Análisis de varianza

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	297,68	1	297,68	49,530782	0,0058947	10,127962
Columnas	18,03	3	6,01	1	0,5	9,2766186
Error	18,03	3	6,01			
Total	333,74	7				

Anexo 12

Análisis estadístico del extracto acuoso de *Clinopodium boliviana* vs el control negativo
 Análisis estadístico de la variación entre cepas

	HAIA112	CCPA9	CCPC38	CCPA62
<i>Clinopodium boliviana</i>	14,5	14,5	15,7	11,9
Control	6	6	6	6

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Clinopodium boliviana	4	56,6	14,15	2,57
Control	4	24	6	0
HAIA112	2	20,5	10,25	36,125
CCPA9	2	20,5	10,25	36,125
CCPC38	2	21,7	10,85	47,045
CCPA62	2	17,9	8,95	17,405

Análisis de varianza

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	132,845	1	132,845	103,38132	0,0020272	10,127962
Columnas	3,855	3	1,285	1	0,5	9,2766186
Error	3,855	3	1,285			
Total	140,555	7				

Anexo 13
 Análisis estadístico del extracto diclorometánico
Caléndula officinalis vs control negativo
 Análisis estadístico de la variación entre cepas

	HAIA112	CCPA9	CCPC38	CCPA62
<i>Caléndula officinalis</i>	11,2	10,4	11,8	11
<i>control</i>	6	6	6	6

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Caléndula officinalis	4	44,4	11,1	0,3333333
control	4	24	6	0
HAIA112	2	17,2	8,6	13,52
CCPA9	2	16,4	8,2	9,68
CCPC38	2	17,8	8,9	16,82
CCPA62	2	17	8,5	12,5

Análisis de varianza

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	52,02	1	52,02	312,12	0,0003954	10,127962
Columnas	0,5	3	0,1666667	1	0,5	9,2766186
Error	0,5	3	0,1666667			
Total	53,02	7				

Anexo 14
 Análisis estadístico del extracto hidroalcohólico del
Caléndula officinalis vs el control negativo
 Análisis estadístico de la variación entre cepas

	HAIA112	CCPA9	CCPC38	CCPA62
<i>Caléndula officinalis</i>	19,8	20	21	11
<i>control</i>	6	6	6	6

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Caléndula officinalis	4	71,8	17,95	21,743333
control	4	24	6	0
HAIA112	2	25,8	12,9	95,22
CCPA9	2	26	13	98
CCPC38	2	27	13,5	112,5
CCPA62	2	17	8,5	12,5

Análisis de varianza

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	285,605	1	285,605	26,270581	0,0143793	10,127962
Columnas	32,615	3	10,871667	1	0,5	9,2766186
Error	32,615	3	10,871667			
Total	350,835	7				

Anexo 15

Análisis estadístico del extracto acuoso de *Caléndula officinalis* vs el control negativo

Análisis estadístico de la variación entre cepas

	HAIA112	CCPA9	CCPC38	CCPA62
<i>Caléndula officinalis</i>	13,5	13,5	13,5	8,9
Control	6	6	6	6

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Caléndula officinalis	4	49,4	12,35	5,29
Control	4	24	6	0
HAIA112	2	19,5	9,75	28,125
CCPA9	2	19,5	9,75	28,125
CCPC38	2	19,5	9,75	28,125
CCPA62	2	14,9	7,45	4,205

Análisis de varianza

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	80,645	1	80,645	30,489603	0,0117004	10,127962
Columnas	7,935	3	2,645	1	0,5	9,2766186
Error	7,935	3	2,645			
Total	96,515	7				

Anexo 16
 Análisis estadístico del extracto diclorometánico
Piper angustifolium vs control negativo
 Análisis estadístico de la variación entre cepas

	HAIA112	CCPA9	CCPC38	CCPA62
<i>Piper angustifolium</i>	11,2	10,1	10,9	10,6
<i>control</i>	6	6	6	6

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Piper angustifolium	4	42,8	10,7	0,22
control	4	24	6	0
HAIA112	2	17,2	8,6	13,52
CCPA9	2	16,1	8,05	8,405
CCPC38	2	16,9	8,45	12,005
CCPA62	2	16,6	8,3	10,58

Análisis de varianza

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	44,18	1	44,18	401,63636	0,0002715	10,127962
Columnas	0,33	3	0,11	1	0,5	9,2766186
Error	0,33	3	0,11			
Total	44,84	7				

Anexo 17
 Análisis estadístico del extracto hidroalcohólico del
Piper angustifolium vs el control negativo
 Análisis estadístico de la variación entre cepas

	HAIA112	CCPA9	CCPC38	CCPA62
<i>Piper angustifolium</i>	18	12,2	21,5	15,4
<i>control</i>	6	6	6	6

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Piper angustifolium	4	67,1	16,775	15,549167
control	4	24	6	0
HAIA112	2	24	12	72
CCPA9	2	18,2	9,1	19,22
CCPC38	2	27,5	13,75	120,125
CCPA62	2	21,4	10,7	44,18

Análisis de varianza

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	232,20125	1	232,20125	29,866713	0,0120412	10,127962
Columnas	23,32375	3	7,7745833	1	0,5	9,2766186
Error	23,32375	3	7,7745833			
Total	278,84875	7				



Anexo 18

Análisis estadístico del extracto acuoso de *Piper angustifolium* vs el control negativo

Análisis estadístico de la variación entre cepas

	HAIA112	CCPA9	CCPC38	CCPA62
<i>Piper angustifolium</i>	15,6	15,6	16,7	14,9
Control	6	6	6	6

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
<i>Piper angustifolium</i>	4	62,8	15,7	0,5533333
Control	4	24	6	0
HAIA112	2	21,6	10,8	46,08
CCPA9	2	21,6	10,8	46,08
CCPC38	2	22,7	11,35	57,245
CCPA62	2	20,9	10,45	39,605

Análisis de varianza

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	188,18	1	188,18	680,16867	0,0001237	10,127962
Columnas	0,83	3	0,2766667	1	0,5	9,2766186
Error	0,83	3	0,2766667			
Total	189,84	7				

Anexo 19
 Análisis estadístico del extracto diclorometánico
Rubus boliviensis vs control negativo
 Análisis estadístico de la variación entre cepas

	HAIA112	CCPA9	CCPC38	CCPA62
<i>Rubus boliviensis</i>	6	6	6	6
<i>control</i>	6	6	6	6

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Rubus boliviensis	4	24	6	0
control	4	24	6	0
HAIA112	2	12	6	0
CCPA9	2	12	6	0
CCPC38	2	12	6	0
CCPA62	2	12	6	0

Análisis de varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	0	1	0	65535	#¡NUM!	10,127962
Columnas	0	3	0	65535	#¡NUM!	9,2766186
Error	0	3	0			
Total	0	7				

Anexo 20
 Análisis estadístico del extracto hidroalcohólico del
Rubus boliviensis vs el control negativo
 Análisis estadístico de la variación entre cepas

	HAIA112	CCPA9	CCPC38	CCPA62
<i>Rubus boliviensis</i>	6	6	6	6
<i>control</i>	6	6	6	6

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Rubus boliviensis	4	24	6	0
control	4	24	6	0
HAIA112	2	12	6	0
CCPA9	2	12	6	0
CCPC38	2	12	6	0
CCPA62	2	12	6	0

Análisis de varianza

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	0	1	0	65535	#¡NUM!	10,127962
Columnas	0	3	0	65535	#¡NUM!	9,2766186
Error	0	3	0			
Total	0	7				

Anexo 21

Análisis estadístico del extracto acuoso de *Rubus boliviensis* vs el control negativo

Análisis estadístico de la variación entre cepas

	HAIA112	CCPA9	CCPC38	CCPA62
<i>Rubus boliviensis</i>	6,3	6,3	6	6
Control	6	6	6	6

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Rubus boliviensis	4	24,6	6,15	0,03
Control	4	24	6	0
HAIA112	2	12,3	6,15	0,045
CCPA9	2	12,3	6,15	0,045
CCPC38	2	12	6	0
CCPA62	2	12	6	0

Análisis de varianza

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	0,045	1	0,045	3	0,1816901	10,127962
Columnas	0,045	3	0,015	1	0,5	9,2766186
Error	0,045	3	0,015			
Total	0,135	7				