

Actividad anti-*Helicobacter pylori* de *Plantago major*, *Clinopodium bolivianum*, *Caléndula officinalis* y *Piper angustifolium* por el método de difusión de disco

CLAROS P. Maysa,^{1,2}
BILBAO R. Pablo,¹
DAMIANI M. Esther,¹
GONZALES D. Eduardo,²
ESTENSORO C. Miguel,²
ALVAREZ A. María T.²

1 Ministerio de Salud y Deportes de Bolivia, Instituto Nacional de Laboratorios en Salud, Laboratorio Nacional de Referencia en Bacteriología Clínica, C. Rafael Zubietta N°1889 La Paz Bolivia, e-mail maysa_cp15@yahoo.es

2 Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Av. Saavedra N°2224, La Paz, Bolivia.

Palabras Clave:

Actividad Anti-*Helicobacter pylori*; *Plantago major*, *Clinopodium bolivianum*, *Caléndula officinalis*, *Piper angustifolium*.

Key words:

Activity anti-*Helicobacter pylori*; *Plantago major*, *Clinopodium bolivianum*, *Caléndula officinalis*, *Piper angustifolium*.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a bacteria associated with gastric pathologies such gastritis, ulcers, cancer and MALT lymphoma. According to previous studies in La Paz - Bolivia, approximately 50 % of the population is infected with this bacterium.

Bolivia is considered one of the most important countries due to its extensive medicinal plants. The present study evaluates the antibacterial activity of organic and aqueous extracts of *Plantago major* (Llantén), *Clinopodium bolivianum* (Khoa), *Caléndula officinalis* (Caléndula) and *Piper angustifolium* (Matico) against *Helicobacter pylori*.

Dichloromethane-, Hydroalcoholic- and aqueous extracts were tested using the Disk diffusion method with 4 wild-type strains of *Helicobacter pylori* isolated from biopsies of patients with gastric pathologies. The activity of the extracts was determined according to the diameter of the halo of inhibition.

Dichloromethane, Hydroalcoholic and aqueous extracts of *Clinopodium bolivianum*, *Caléndula officinalis* and *Piper angustifolium* were found active anti-*Helicobacter pylori*. Similarly, the hydroalcoholic extract of *Plantago major*.

RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria asociada a patologías gástricas como gastritis, úlceras, cáncer y linfoma de MALT. De acuerdo a estudios realizados en la ciudad de La Paz - Bolivia, aproximadamente el 50% de la población esta infectada por esta bacteria.

Al ser Bolivia un país que posee una extensa flora medicinal, en el presente trabajo se seleccionaron plantas con actividad antiulcerosa y antibacteriana reportadas: *Plantago major* (Llantén), *Clinopodium bolivianum* (Khoa), *Caléndula officinalis* (Caléndula) y *Piper angustifolium* (Matico), con el propósito de evaluar la actividad anti-*Helicobacter pylori* de extractos orgánicos y acuosos de estas plantas.

Se utilizaron extractos diclorometánico, hidroalcohólico y acuoso de las plantas en estudio para determinar su actividad inhibitoria por el método de difusión de discos en cultivo bacteriológico de cuatro cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de biopsias de pacientes con patologías gástricas. La actividad de los extractos fue determinada según el diámetro del halo de inhibición.

Se determinó que los extractos diclorometánico, hidroalcohólico y acuoso de *Clinopodium bolivianum*, *Caléndula officinalis* y *Piper angustifolium*, tienen actividad anti-*Helicobacter pylori*. De igual manera, el extracto hidroalcohólico de *Plantago major*.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es una bacteria gram negativa de morfología curvada y espiral, es el agente etiológico que se asocia a patologías gástricas como la gastritis, úlceras, cáncer y linfoma de MALT^{1, 2, 3, 4}. Se conoce que el modo de transmisión de esta bacteria puede ocurrir de persona a persona, por vía oral-oral y/o fecal-oral. Estudios realizados en la ciudad de La Paz, Bolivia, demuestran que aproximadamente el 50% de la población presenta infección por *Helicobacter pylori*^{1, 5}.

Existen muchas publicaciones en el mundo de estudios sobre la actividad anti-*Helicobacter pylori* de plantas medicinales tanto *in vitro* como *in vivo*^{6, 7, 8, 9, 10} en busca de una terapia alternativa natural, debido a que las terapias con fármacos sintéticos tienen una eficacia del 92%¹¹.

Bolivia es un país que posee una extensa flora medicinal utilizada por diversas etnias y culturas, para tratar distintas enfermedades. En el presente trabajo se seleccionaron plantas que poseen actividad antiulcerosa y diferentes espectros de acción antibacteriana, reportadas en diferentes artículos científicos^{12, 13, 14, 15, 16, 17}, y libros de medicina tradicional^{18, 19, 20}.

El objetivo de este trabajo fue la determinación de la actividad anti-*Helicobacter pylori*, por el método de difusión de disco de los extractos diclorometánico, hidroalcohólico y acuoso de las plantas seleccionadas: *Plantago major* (Llantén), *Clinopodium bolivianum* (Khoá), *Caléndula officinalis* (Caléndula) y *Piper angustifolium* (Matico).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y extracción

Las plantas fueron recolectadas en octubre de 2005, en la ciudad de La Paz.

Material vegetal	Localidad
<i>Plantago major</i>	Sorata
<i>Clinopodium bolivianum</i>	Carmen Calata
<i>Caléndula officinalis</i>	Mallasa
<i>Piper angustifolium</i>	Inquisivi

Dicho material fue lavado con agua destilada estéril y desecado en estufa a 38°C por el lapso de dos días. Una muestra seca de cada especie vegetal fue autenticada y clasificada por el Herbario Nacional de Bolivia. En todos los casos, las hojas fueron separadas y pulverizadas.

La extracción de compuestos de baja polaridad se realizó por maceración en frío al 20% p/v del material vegetal en diclorometano. La extracción hidroalcohólica (etanol 75%) se realizó a partir del residuo seco resultado de la extracción diclorometánica, adicionando 50 ml de hidroalcohol²¹. Ambos extractos fueron secados por rotaevaporación. El extracto acuoso se realizó por infusión al 10% p/v del material vegetal en agua destilada estéril con la posterior liofilización del mism

Cepas bacterianas

Se estudiaron cuatro cepas de *Helicobacter pylori* denominadas HAIA112, CCPA9, CCPC38 y CCPA62, cedidas en medio de transporte Wang por el Laboratorio Nacional de Referencia en Bacteriología Clínica del Instituto nacional de laboratorios en salud (INLASA). Dichas cepas fueron sembradas en Agar Base Columbia (Oxoid, Inglaterra) con sangre desfibrinada de carnero al 7% suplementado con Isovitalex al 1% (Britania, Argentina). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 3 días en atmósfera microaerofílica en jarra de anaerobiosis Gas Pack de 2.5 L, atmósfera de 85% N₂, 10% CO₂ y 5% O₂ (generadores CampyGen CN 25). Se realizó la identificación macroscópica, microscópica y bioquímica. Estas cepas fueron identificadas en comparación con la cepa *Helicobacter pylori* ATCC 49503.

Determinación de la actividad anti-*Helicobacter pylori* por difusión de disco

A partir de un cultivo en abundancia de 2 días de incubación, se realizó la suspensión bacteriana en 2 mL de solución fisiológica estéril (NaCl 0.9%) hasta alcanzar el patrón de turbidez del tubo 4 de la escala McFarland. Esta suspensión fue sembrada por inundación en placas de Agar Base Columbia con sangre desfibrinada de carnero al 7% suplementado con Isovitalax al 1%. Posteriormente se aplicaron los discos de papel filtro Wattman N°5 de 6 mm de diámetro previamente empapado con: 1) antibiótico (control positivo): solución de 10 µl de tetraciclina 3 µg/µl, 2) solventes de extracción (control negativo), 10 µl de los disolventes utilizados en la extracción de las especies vegetales (diclorometano, etanol al 75% y agua destilada estéril), 3) extracto vegetal: solución de 10 µl de los extractos a concentración de 0,6 µg/µl (los extractos fueron disueltos en el mismo solvente de extracción). Las placas fueron incubadas en jarra de anaerobiosis y con generadores de atmósfera microaerofílica (anteriormente citada) en estufa de 37°C durante tres días, siguiendo la norma CLSI. Transcurrido este tiempo los halos de inhibición fueron medidos con la ayuda de un calibrador.

TABLA No. 1

ACTIVIDAD ANTI-HELICOBACTER PYLORI DE LA TETRACICLINA Y CONTROL NEGATIVO.

	Promedio Halo inhib.(mm)	Actividad
Tetraciclina	50.8 ± 1.1	Sensible
Control (-) a	6.0 ± 0	-
(a) agua destilada		

Halos mayores a 30 mm son considerados como sensibles cuando se utilizan discos de tetraciclina de 30 µg (22)

RESULTADOS

La Tabla No. 1 muestra el promedio de los resultados de la actividad Anti-*Helicobacter pylori* expresado en diámetro de halo de inhibición (mm) de discos impregnados con tetraciclina, además muestra la actividad de la tetraciclina según la clasificación de Boyanova et al 1999 (22). El análisis estadístico se realizó por ANOVA denominándose como estadísticamente significativo para un nivel de

TABLA No. 2

ACTIVIDAD ANTI-HELICOBACTER PYLORI DE LOS EXTRACTOS VEGETALES Y CONTROL NEGATIVO

	Extracto.DC Actividad	Extrac. HA Actividad	Extrac.AC Actividad	Control negativo Actividad
	Halo de inh Extrac.DC (mm)	Halo de inh Extrac. HA (mm)	Halo de inh Extrac.AC (mm)	Halo de inh Control negativo (mm)
<i>Plantago major</i>	6 -	*14,3+/-4,8 ++	6 -	6 -
<i>Clinopodium bolivianum</i>	**20,6+/-4,3 +++++	**18,2+/-3,5 +++	**14,5+/-1,8 ++	6 -
<i>Calendula officinalis</i>	**11,1+/-0,6 ++	**18,0+/-5,5 +++	*12,3+/-2,2 ++	6 -
<i>Piper angustifolium</i>	**10,8+/-0,6 ++	*16,4+/-4,7 +++	**15,3+/-1,1 ++	6 -

DC: extracto diclorometánico; HA: extracto hidroalcohólico; AC: extracto acuoso
 Muy activo (> 20 mm) +++++; Activo (16 -20 mm) +++; Moderadamente activo (11-15 mm) ++; Poco activo (8 -10 mm) +; No activo (6 - 8 mm) -. (10)

confianza del 95%(*) y 99%(**). La columna de control negativo es el promedio del resultado obtenido del antibiograma del solvente de la tetraciclina.

La Tabla No. 2 muestra el promedio de los resultados de la actividad Anti-*Helicobacter pylori* expresado en diámetro de halo de inhibición (mm) de discos impregnados con los diferentes extractos vegetales de las especies estudiadas. Además muestra la actividad de cada extracto según la clasificación realizada por Wang. El análisis estadístico se realizó por ANOVA denominándose como estadísticamente significativo para un nivel de confianza del 95%(*) y 99%(**). La columna de control negativo es el promedio del resultado obtenido del antibiograma de los tres solventes (diclorometano, hidroalcohólico, acuoso).

DISCUSIONES

El uso de la quimioterapia para erradicar a *Helicobacter pylori* es bastante compleja, fastidiosa, y costosa. Bolivia tiene elevados índices de pobreza, por lo que resulta oneroso para algunas familias acceder al tratamiento.

Rescatando los conocimientos de nuestras etnias y culturas, las mismas que sugieren terapias alternativas en base al uso de plantas medicinales, en este trabajo determinamos la actividad anti-*Helicobacter pylori* de las especies *Plántago mayor*, *Clinopodium bolivianum*, *Calendula officinalis*, y *Piper angustifolium*.

Se seleccionó a la Tetraciclina como control negativo debido a que este antimicrobiano es utilizado en la

terapia alternativa para la erradicación de *Helicobacter pylori* cuando fracasa la terapia de primera elección (claritromicina, amoxicilina, omeprazol). Además estudios realizados muestran que la resistencia a este antibiótico de amplio espectro es del 19% siendo el menor entre todos los antibióticos utilizados contra el *Helicobacter pylori*. En todas las cepas, la tetraciclina ejerció una elevada actividad anti-*Helicobacter pylori* que según la clasificación de Boyanova para un disco de 30_g de antibiótico, *Helicobacter* es sensible cuando el halo de inhibición es mayor a 30 mm y el promedio general de halo de inhibición obtenido en este estudio fue de 50,8 mm.

La actividad inhibitoria sobre las cepas de *Helicobacter pylori* del extracto hidroalcohólico de *Plantago mayor* podría deberse a un aglicón de la aucubina denominado aucubigenina liberado por una _glucosidasa. Este compuesto químico según Tedrogen tiene actividad antibacteriana.

Un estudio realizado por Figueroa señala que los aceites esenciales de *Clinopodium bolivianum* (antes *Satureja*



DISEMELAB S.R.L.
IMPORTACIONES REPRESENTACIONES

REACTIVOS, EQUIPOS, E INSUMOS PARA LABORATORIO CLINICO

REPRESENTACION EXCLUSIVA:

REACTIVOS



Teco Diagnostics



QCA QUIMICA CLINICA APLICADA S.A.



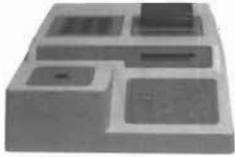
PLASMA TEC
Plasmatec Laboratory Products Ltd.

- QUIMICA CLINICA
- SEROLOGIA
- PRUEBAS ELISA
- PRUEBAS RAPIDAS EN TEST
- MICROBIOLOGIA
- ANTIGENOS FEBRILES
- HEMATOLOGIA
- GRUPO SANGUINEO

EQUIPOS - MATERIALES:



"SAN JOR"



Diatron



Presvac



- CONTADOR HEMATOLOGICO
- ANALIZADOR QUIMICO
- ESTUFAS DE CULTIVO, ESTERILIZACION
- MACRO Y MICROCENTRIFUGAS
- MICROPIPETAS, MICROSCOPIOS
- MATERIAL DE VIDRIO
- BAÑO MARIA, VORTEX, ETC.



DiaSpot
Rapid Diagnostic Test

CERTIFICACIONES: ISO - 9001 - 2000 • ISO 13485



OFICINA CENTRAL: C. Mercado N° 1406 • Edif. Alborada • Piso 2 - Of. 206 • Cel. 720 13902
 Teléfonos: (591) 2 2336179 - 2125930 • Fax: (591) 2 2145300 • E Mail: dismelab@entelnet.bo • La Paz - Bolivia
 SUCURSALES: Santa Cruz: 03 3331470 • Cochabamba: 04 4534096 • Tarija: 04 6650754 • Sucre: 04 6463040

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 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 componentes que le dan la actividad anti-*Helicobacter pylori* en los otros extractos hidroalcohólico y acuoso.

La evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus fecalis* de *Caléndula officinalis* realizada por Vanaclocha reportó que esta especie posee dicha actividad sobre estos cocos gram positivos, no haciendo 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. Correspondería 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.

La evaluación de la actividad bacteriostática *in vitro* de los aceites esenciales de *Piper angustifolium* sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* realizada por Tirillini mostró que esta especie posee dicha actividad sobre estos bacilos gram negativos. En el presente estudio como se ve en la tabla 2, el extracto diclorometánico (donde se extraen los aceites esenciales) mostró actividad sobre cepas de *Helicobacter pylori*, por tanto observando la coincidencia de los espectros de acción, se puede inferir que estos aceites actúan sobre bacilos gram negativos, aunque habría que realizar pruebas sobre otras bacterias.

En conclusión se ha evidenciado que los extractos diclorometánico, hidroalcohólico y acuoso de *Clinopodium bolivianum*, *Caléndula officinalis* y *Piper angustifolium*, tienen actividad anti-*Helicobacter pylori*; de igual manera el extracto hidroalcohólico de *Plantago major*.

RECOMENDACIONES

Realizar estudios *in vitro* sobre *Helicobacter pylori*

de los siguientes compuestos: aucubigenina de *Plantago major*, aceites esenciales de *Clinopodium bolivianum*, kaempferol de *Piper angustifolium*, ya que de acuerdo a otros estudios estos compuestos serian los responsables de la actividad antibacteriana de estas plantas, sin embargo queda probar su actividad anti-*Helicobacter pylori*.

Realizar estudios de toxicidad y pre-clínicos de las especies vegetales mencionadas para probar el efecto anti-*Helicobacter pylori in vivo*.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto "DEVELOPMENT OF NOVEL VACCINATION STRATEGIES AGAINST HELICOBACTER PYLORI IN LATIN AMERICA", global health research initiative (ghri) operational research grants for the canadian international immunization initiative (cii2)/ OPS-OMS., 2004-2006, Dr. Alvaro Cárdenas y Dr. Carlos Ascarrumz (Gastroenterólogos).

laboratorios ILLIMANI

Laboratorio 1 - Calle Juan De la Riva Edif. Alborada
Piso 3 Of. 304 • Fono/Fax: 2317290 - 2141986

Laboratorio 2 - Av. Arce esq. Clavijo N° 2896
Edif. San Patricio - Piso 1 Of. 102
Fono/Fax: 2431257 - 2431398

Laboratorio 3 - Calle 21 Calacoto N° 8350
Edif. Monroy Vélez - Piso 2 • Fono: 2790741

Emergencias 24 horas
715-33302 • 2220303

ANÁLISIS CLÍNICOS EN GENERAL

- Hematología
- Química sanguínea
- Serología
- Orina y heces fecales
- Microbiología
- Hormonas
- Inmunología
- Anatomopatología y citología
- Reproducción humana

**Personal especializado,
Control de calidad**

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Alvarez MT, Estudio Multicentrico del *Helicobacter pylori*, Tesis de grado, FCFB, La Paz- Bolivia. 1997.
2. Koneman E, Diagnostico Microbiológico. 5 ed. Buenos Aires-Argentina, Panamericana ED. 2001.
3. Ramírez A, Chinga E, Mendoza D, Leey J, Segovia M y Otoya C. Variación de la prevalencia del *Helicobacter pylori* en el Perú Período (1985-2002), en una población de nivel socioeconómico medio y alto, *Rev. gastroenterol* 2003; 23: 92-98.
4. Krausse R, Bielenberg J, Blaschek W. y Ullmann U. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of *Extractum liquiritiae, glycyrrhizin* and its metabolitos". *J. Antimicrob. Chemother*, 2004; 54 (1): 243-246
5. Bilbao P. Estudio de la Infección por *Helicobacter pylori* y Evaluación de los Métodos de Diagnostico Laboratorial, en Pacientes que Acuden a Consultas de Gastroenterología en la Clínica "Caja Petrolera de Salud" y el Hospital "Arco Iris" de Junio 2005 a Abril 2006 en la Ciudad de La Paz - Bolivia, Tesis de Grado, FCFB-INLASA, La Paz - Bolivia, 2006.
6. Ye ilada E, Gürbüz L y Shibata H. Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity, *J. Ethnopharmacol*, 1999; 66 (3): 289-293.
7. Ortiz T, Humberto J, Mendoza C, Cadenas P, y Julio E. Actividad antibacteriana de la Sangre de Grado (*Croton lechleri*) frente al *Helicobacter pylori*, *Rev Med Hered*, 2003; 14 (2): 81.
8. Stamatis G, Kyriazopoulos P, Golegou S, Basayiannis A, Skaltsas S, y Skaltsa H. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines, *J. Ethnopharmacol*, 2003; 88 (2-3): 175-179.
9. Li Y, Xu C, Zhang Q, Liu Y. y Xiang T. In vitro anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases, *J. Ethnopharmacol*, 2005; 98 (3): 329-333.
10. Wang Y, Huang T. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Plumbago zeylanica L.*, *J. Ethnopharmacol*, 2005; 43 (3): 407-412
11. Boixeda M, Argila M. Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*, 2000; 24
12. Teedrogen M. *Wissenschaftliche Verlangsgesellschaft*. 1989: 466-469
13. Acosa L, Rodríguez C, Sánchez E. Instructivo técnico de *Calendula officinalis*. *Rev Cubana Plant Med*, 2001; 1: 23-27.
14. Tirillini B, Velásquez ER, Pellegrino R. Chemical composition and antimicrobial activity essential oil of *Piper angustifolium*. *Planta Med*, 1996; 62 (4): 372-373
15. Figueroa N. Determinación de la Actividad Antibacteriana de los Aceites Esenciales de Plantas Medicinales de la Herbolaria Boliviana, Tesis de Grado, UMSA-FCFB-IIFB, La Paz - Bolivia, 1997.
16. Hernández M. *Helicobacter pylori*. La bacteria que mas infecta al ser humano. *Rev. cuba. aliment. nutr*, 2000; 15 (1): 42-54
17. Hetland G, Samuelsen A, Lévik M, Paulsen B, Aaberge I, Michaelsen T. Protective Effect of *Plantago major L. Pectin Polysaccharide* against *Systemic Streptococcus pneumoniae* Infection in Mice, *Journal of Immunology*, 2000; 52: 348-355.
18. Girault L. *Kallawayaya-Curanderos Itinerantes de los Andes*. La Paz-Bolivia, UNICEF-OPS-OMS ED., 1987.
19. Piñeros J, García H. *Plantas Medicinales: Compendio de farmacología vegetal*. Bogotá-Colombia, 1991.
20. Gupta M. *270 Plantas Medicinales Iberoamericanas*. Santa Fè de Bogotá-Colombia, Presencia Ltda. ED. 1995
21. Ankli A, Heinrich M, Bork P, Yucatec Mayan medicinal plantas: Evaluation based on indigenous uses, *J. of Ethnopharmacol*, 2002; 79: 43-52
22. Boyanova L, Stancheva I, Spassova Z, Katzarov N, Mitov I, Koumanova R. Primary and combined resistance to four antimicrobial agents in *Helicobacter pylori* in Sofia, Bulgaria. *J Med Microbiol*, 2000; 49: 415-418.