

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**EFFECTO ANTIBACTERIANO *in Vitro* DE TRES
DIFERENTES TINTURAS NATURALES SOBRE
Escherichia coli AISLADA DE MUESTRAS
PROVENIENTES DE EXPLOTACIONES AVÍCOLAS DE
GUATEMALA**

OLSON HAROLDO PALALA ENRÍQUEZ

Médico Veterinario

GUATEMALA, MARZO DE 2016

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**EFFECTO ANTIBACTERIANO *in Vitro* DE TRES DIFERENTES
TINTURAS NATURALES SOBRE *Escherichia coli* AISLADA DE
MUESTRAS PROVENIENTES DE EXPLOTACIONES AVÍCOLAS DE
GUATEMALA**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD

POR

OLSON HAROLDO PALALA ENRÍQUEZ

Al conferírsele el título profesional de

Médico Veterinario

En grado de licenciado

GUATEMALA, MARZO DE 2016

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
JUNTA DIRECTIVA

DECANO: M. Sc. Carlos Enrique Saavedra Vélez
SECRETARIA: M.V. Blanca Josefina Zelaya de Romillo
VOCAL I: M. Sc. Juan José Prem González
VOCAL II: Lic. Zoot. Edgar Amílcar García Pimentel
VOCAL III: M.V. Carlos Alberto Sánchez Flamenco
VOCAL IV: Br. Marylin Elisa Reyes Valenzuela
VOCAL V: Br. Javier Augusto Castro Vásquez

ASESORES

M.A. DORA ELENA CHANG DE JO

M. Sc. FRANCISCO ESCOBAR SERRANO

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con lo establecido por los reglamentos y normas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración el trabajo de graduación titulado:

EFFECTO ANTIBACTERIANO *in Vitro* DE TRES DIFERENTES TINTURAS NATURALES SOBRE *Escherichia coli* AISLADA DE MUESTRAS PROVENIENTES DE EXPLOTACIONES AVÍCOLAS DE GUATEMALA

Que fuera aprobado por la Honorable Junta Directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Como requisito previo a optar al título de:

MÉDICO VETERINARIO

ACTO QUE DEDICO A:

- A Jehová Dios:** Porque gracias a Él nos movemos y existimos.
- Mis padres:** Edwin y Enma, por ser un apoyo incondicional en cada etapa de mi vida, por todos sus consejos, ejemplos y regaños que me han hecho ser la persona que soy.
- Mis hermanas:** Sofia, Jackelyn, Paola y Katherin por hacer de mi vida tan aburrida y repetitiva. Gracias por el apoyo incondicional a través de estos años de estudio, gracias totales.
- Mis sobrinos:** Dannela, Mateo, Gerrit y Matías porque son el mejor regalo que mis hermanas pudieron darme.

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad de San Carlos de Guatemala:** Por ser mi casa de estudios.
- A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia:** Por permitir expandir mis conocimientos y formarme como Médico Veterinario.
- A mis asesores:** Dra. Chang y el Dr. Francisco Escobar, por ser más que asesores, amigos y ejemplos a seguir.
- Al departamento de Ciencias Fisiológicas:** A los doctores Mónica Solórzano, Julio Chajón, Carlos de León y Dora Chang, a Marlen López, Jorge Hernández y Brendita, porque fueron, son y serán una inspiración para ser un mejor profesional y mejor persona, por compartir conmigo consejos y enseñanzas, alegrías y tristezas.
- A mis amigos de la Facultad:** Abby, Abel, Ariana, Diana, Dulce, Jandy, Karin, Ligia, Lucy, Paulette, Wicho y Tuní, porque estuvieron conmigo en los momentos más felices de la carrera y también los momentos más difíciles de mi vida, porque compartimos momentos que llevo grabados en mi memoria.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. HIPÓTESIS | 3 |
| III. OBJETIVOS | 4 |
| 3.1 Objetivo General | 4 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 4 |
| IV. REVISIÓN DE LITERATURA | 5 |
| 4.1 Colibacilosis | 5 |
| 4.1.1 Incidencia y distribución | 6 |
| 4.2 <i>Escherichia coli</i> | 6 |
| 4.2.1 Morfología y características principales | 7 |
| 4.2.2 Patogénesis | 7 |
| 4.2.3 Factores de virulencia bacteriana | 8 |
| 4.2.4 Factores de susceptibilidad del huésped | 8 |
| 4.2.5 Implicaciones en Salud Pública | 9 |
| 4.3 Enfermedades en las Aves (Colibacilosis) | 10 |
| 4.3.1 Colisepticemia | 10 |
| 4.3.2 Peritonitis del Huevo | 13 |
| 4.3.3 Infección del Saco Vitelino | 14 |
| 4.3.4 Coligranuloma | 15 |
| 4.3.5 Síndrome de cabezas hinchadas | 15 |
| 4.3.6 Celulitis | 15 |
| 4.4 Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.) | 16 |
| 4.4.1 Antecedentes | 16 |
| 4.4.2 Clasificación | 17 |
| 4.4.3 Descripción Botánica | 17 |
| 4.4.4 Hábitat | 17 |
| 4.4.5 Usos y propiedades medicinales | 18 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 4.4.6 | Constituyentes Químicos..... | 19 |
| 4.4.7 | Efectos adversos..... | 19 |
| 4.5 | Salvia Sija (<i>Lippia alba</i>) | 20 |
| 4.5.1 | Antecedentes | 20 |
| 4.5.2 | Clasificación | 21 |
| 4.5.3 | Descripción Botánica..... | 21 |
| 4.5.4 | Hábitat..... | 21 |
| 4.5.5 | Usos y propiedades medicinales..... | 21 |
| 4.5.6 | Constituyentes químicos | 22 |
| 4.6 | Granada (<i>Punica granatum</i>) | 23 |
| 4.6.1 | Antecedentes | 23 |
| 4.6.2 | Clasificación | 24 |
| 4.6.3 | Descripción Botánica..... | 24 |
| 4.6.4 | Hábitat..... | 24 |
| 4.6.5 | Propiedades y usos medicinales | 25 |
| 4.6.6 | Constituyentes Químicos..... | 25 |
| 4.6.7 | Efectos adversos..... | 26 |
| V. | MATERIALES Y MÉTODOS | 27 |
| 5.1 | Materiales | 27 |
| 5.2 | Metodología | 29 |
| 5.2.1 | Obtención de microorganismos..... | 29 |
| 5.2.2 | Preparación de las tinturas..... | 29 |
| 5.2.3 | Preparación del agar planta | 30 |
| 5.2.4 | Determinación del efecto antibacteriano | 30 |
| 5.2.5 | Preparación del control negativo (a la inhibición) | 31 |
| 5.2.6 | Determinación de la concentración Inhibitoria Mínima | 31 |
| 5.3 | Análisis de Datos | 32 |
| VI. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 33 |
| VII. | CONCLUSIONES | 36 |
| VIII. | RECOMENDACIONES | 37 |

| | |
|--|-----------|
| IX. RESUMEN..... | 38 |
| SUMMARY..... | 39 |
| X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 40 |
| XI. ANEXOS..... | 43 |

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No. 1 Efecto antibacteriano in vitro de tres diferentes Tinturas Naturales sobre *Escherichia coli* a una concentración de 10mg/ml 33

Cuadro No. 2 Evaluación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de la Tintura del fruto de Granada (*Punica granatum*)..... 35

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Hojas e inflorescencia de <i>Lippia alba</i> | 44 |
| Figura 2. Hojas, flores y fruto de <i>Tamarindus indica</i> | 44 |
| Figura 3. Hojas y fruto de <i>Punica granatum</i> | 44 |
| Figura 4. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima | 44 |

I. INTRODUCCIÓN

Una de las misiones de los Médicos Veterinarios es asegurar el bienestar de los pacientes animales pero también velar por la salud humana, tanto desde el punto de vista nutricional como de sanidad. Las aves representan una de las principales explotaciones en el área rural del país, en donde constituyen una fuente de ingresos económicos y un aporte importante de proteína animal para la dieta de las familias.

Las enfermedades bacterianas pueden disminuir la producción al afectar la salud general de las aves reduciendo la cantidad y/o calidad de los huevos y el peso que un ave es capaz de alcanzar y en casos muy graves pueden provocar la muerte. En la mayoría de poblaciones de Guatemala el acceso a medicamentos comerciales para animales se ve afectado por la disponibilidad de los mismos y por la economía de las comunidades, por ello los pobladores buscan en la medicina tradicional o alternativa una opción accesible y económica para el tratamiento de sus animales.

En Guatemala el uso tradicional de plantas medicinales está arraigado en la cultura, debido a la accesibilidad y a la gran variedad de plantas consideradas de uso medicinal, la mayoría de las cuales ya han sido evaluadas contra patógenos que afectan a los seres humanos. Pero las infecciones bacterianas no son exclusivas del hombre, y debido a las malas condiciones de salud en comunidades alejadas de las grandes urbes, las diarreas y otras afecciones de origen bacteriano son causas muy comunes de baja en la producción y hasta la muerte en aves de explotaciones familiares o de traspatio.

Una de las bacterias más comunes y que produce diversas afecciones en las aves es *Escherichia coli*, este microorganismo está presente en el tracto intestinal de las aves pero al atravesar las barreras de defensa de las mismas o al

presentarse en otros órganos y/o sistemas puede afectar la salud y producir la muerte de las aves, además por su capacidad de desarrollar resistencia a los antimicrobianos de uso más común se utiliza como un control para estudiar la resistencia a antibióticos por parte de otros microorganismos.

Por las razones anteriores se propone estudiar el efecto antibiótico *in vitro* de las tinturas de Tamarindo (*Tamarindus indica*) una planta que aunque no es originaria de nuestro país, se ha convertido en una de las más solicitadas como ingrediente para refrescos y otros alimentos, su actividad antimicrobiana se atribuye al lupeol, un ácido orgánico presente en el fruto, hojas y corteza; Granada (*Punica granatum*) planta que crece en muchos hogares guatemaltecos y que es apreciada por su valor nutritivo y propiedades medicinales, se ha descrito como vermífugo, antimicrobiano y desinflamante; y Salvia Santa (*Lippia alba*) cuyo uso medicinal ha sido transmitido de generación en generación en nuestro país, popularmente se utiliza en variadas afecciones intestinales; estas tres plantas crecen en diferentes partes del país por lo que al presentar efecto antibacteriano pudieran ser una opción para el tratamiento de afecciones bacterianas en aves de traspatio, siendo una cepa de *E. coli* aislada de una explotación avícola el sujeto del estudio.

II. HIPÓTESIS

Cada una de las tinturas naturales de *Tamarindus indica*, *Punica granatum* y *Lippia alba*, presentan efecto antibacteriano *in vitro* sobre *Escherichia coli* aislada en el Laboratorio de Referencia Regional de Sanidad Animal –LARRSA– de muestras provenientes de explotaciones avícolas de Guatemala.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General:

Generar información sobre tratamientos alternativos para afecciones bacterianas en aves.

3.2 Objetivos Específicos:

Determinar el efecto antibacteriano *in Vitro* de cada una de las tinturas de *Tamarindus indica*, *Punica granatum* y *Lippia alba*, a una concentración de 10mg/ml, sobre *Escherichia coli* aislada de muestras provenientes de explotaciones avícolas de Guatemala.

Establecer la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) sobre *Escherichia coli* aislada de muestras provenientes de explotaciones avícolas de Guatemala.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Colibacilosis

La colibacilosis se refiere a cualquier infección localizada o sistémica causada por completo o de manera parcial por *Escherichia coli*, incluyendo colisepticemia, coligranuloma o enfermedad de Hjarre, enfermedad de los sacos aéreos o enfermedad respiratoria crónica (ERC), celulitis aviar, síndrome de la cabeza hinchada, peritonitis, salpingitis, osteomielitis/sinovitis, panoftalmitis e infección del saco vitelino. La colibacilosis en mamíferos es, con mayor frecuencia una enfermedad entérica primaria, mientras que la colibacilosis en aves es, de manera típica, un problema secundario localizado o una enfermedad sistémica que se presenta cuando se han alterado o han sido sobrepasadas las defensas del huésped. (Calnek, 2000)

Casi todos los serotipos de *E. coli* aislados de aves resultan patógenos solo para las aves, y no se reconocen como causa importante de infecciones en otros animales, incluyendo a los seres humanos. Los pollos, sin embargo, son susceptibles a la colonización por *E. coli* O157:H7, un importante patógeno enterohemorrágico para humanos. Se ha observado contaminación natural de la carne de los pollos con este microorganismo, y un brote de enfermedad diarreica por alimento se relacionó con pavos contaminados. Las características de *E. coli* virulenta en aves y otros animales se comparten con frecuencia (por ejemplo antígeno K1), y las cepas aviares pueden ser una fuente potencial de genes y plásmidos que se codifican para resistencia antimicrobiana y factores de virulencia. Los serotipos relacionados con enfermedad diarreica en humanos y cepas que producen enterotoxinas termolábiles y termoestables que se han aislado de pollos del sudeste de Asia. (Calnek, 2000)

4.1.1 Incidencia y distribución

Los variados serotipos de *E. coli* son habitantes intestinales de animales, y también de humanos, y tal vez infectan a casi todos los mamíferos y aves; por tanto, tienen una distribución cosmopolita, con mayor frecuencia se informa de enfermedad clínica en pollos, pavos y patos. (Calnek, 2000)

La bacteria *E. coli* es un habitante común en las vías intestinales de los animales, en una concentración de $10^6/g$. se encuentran grandes cantidades en aves jóvenes, aves sin flora normal establecida y en el aparato intestinal inferior. Su presencia en el agua de bebida es indicativa de contaminación fecal. Entre pollos sanos, 10 a 15% de los coliformes intestinales pertenecen a los serotipos potencialmente patógenos. Las cepas intestinales no son necesariamente del mismo serotipo que las que se aíslan del saco pericárdico de la misma ave. Es común la transmisión de *E. coli* por medio del huevo y probar así una alta mortalidad en pollitos. Son más frecuentes los coliformes patógenos en el intestino de pollitos recién nacidos que en los huevos de los cuales nacen, lo cual sugiere una diseminación rápida después del nacimiento. Parece ser que la principal fuente de infección de huevos es la contaminación fecal de la superficie, con una penetración posterior hacia el cascarón y la membrana. Estas bacterias persisten por periodos prolongados, en particular cuando se secan. (Calnek, 2000)

4.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli es conocida como un habitante saprófito del intestino. Sin embargo, otros serotipos se identifican como un frecuente agente causal de diarrea en animales neonatos, adultos y en el hombre. Las diferentes cepas aisladas de estos procesos se clasifican en patotipos: Enteropatógenas (EPEC), Enteroinvasivas (EIEC), Enterotoxigénicas (ETEC), Enteroagregativas (EAEC) y

Verotoxigénicas (VTEC), dependiendo de los factores de virulencia que poseen. (Stanchi, N. 2007)

4.2.1 Morfología y características principales

Escherichia coli es una bacteria gram-negativa, no esporulada de forma y tamaño variable, usualmente 2 -3 x 0.6 µm. un habitante normal del tracto gastrointestinal de aves y mamíferos. Existen numerosas cepas y muchas son especie-específica. La mayoría de cepas son móviles con flagelos peritricos. La bacteria puede crecer en ambientes tanto aerobios como anaerobios, y usa fuentes simples de carbón y nitrógeno. En placas de agar nutritivos, incubadas a 37° C por 24 horas, las colonias son convexas, suaves e incoloras, produce turbidez rápidamente en caldos de cultivo. Fermenta y produce gas en glucosa, maltosa, manitol, glicerol, ramnosa, sorbitol y arabinosa. Produce Indol, y es positivo para la prueba de Rojo de Metilo (MR) y negativo para la reacción de Voges-Proskauer (VP). Posee tres tipos de antígenos; “O” (Somático), “H” (Flagelar) y “K” (Capsular). El antígeno “O” es el que se utiliza para la clasificación de *E. coli* y es una endotoxina resistente al calor que se libera al lisarse la bacteria. El antígeno “K” está relacionado con la virulencia. (Dhama, 2013)

Entre los elementos constitutivos de su estructura, además de la pared bacteriana, se destacan los pili o fimbrias, la cápsula, los flagelos peritricos y la membrana externa. Sin embargo, solo algunas cepas presentan cápsula. Existen cepas sin movilidad y, por consiguiente, sin flagelos. No se han descrito formas esporuladas de *E. coli*. (Stanchi, N. 2007)

4.2.2 Patogénesis

La patogénesis de las infecciones por *E. coli* en aves ha sido muy poco investigada. Las cepas que afectan a los mamíferos producen grandes cantidades

de exotoxinas. Las *E. coli* que afectan a las aves parecen producir pocas exotoxinas. Dichas enterotoxinas producen diarrea al inducir una hipersecreción de fluidos hacia el lumen intestinal, evitando la absorción de nutrientes y la pérdida de agua. Las endotoxinas pueden causar angeítis seguida de septicemia y muerte. (Ritchie, Harrison, & Harrison, 2005)

4.2.3 Factores de virulencia bacteriana

Aparte de la capacidad de originar mortalidad en embriones o pollitos, no se ha determinado algún factor de virulencia aislado, que diferencia a todas las cepas patógenas de aquellos aislamientos no patógenos. La resistencia al complemento, que a menudo puede estar mediada por la presencia del antígeno capsular K1, parece correlacionarse con virulencia en gran parte de las cepas. Las cepas virulentas son capaces de persistir en las vías intestinales por más tiempo y en mayor cantidad que aquellas avirulentas; este hecho puede correlacionarse con la producción de colicina por la *E. coli* intestinal normal. (Calnek, 2000)

Los aislamientos patógenos y no patógenos de *E. coli*, resultan similares en cuanto a las características bioquímicas y sensibilidad a los antibióticos. Por lo general, no se correlacionan con la virulencia las hemolisinas, la termoestabilidad de las toxinas, actividad metabólica, motilidad, plásmidos R y resistencia de fagos. (Calnek, 2000)

4.2.4 Factores de susceptibilidad del huésped

Comparados con los factores de virulencia bacteriana, los factores de susceptibilidad del huésped tal vez sean un determinante más importante de la presentación de la colibacilosis. Las aves sanas y normales, con defensas intactas, son mucho más resistentes a la exposición a *E. coli* que se presenta de manera natural, incluso con cepas virulentas. La infección se desarrolla cuando se

comprometen las barreras de la piel o de las mucosas, con alteraciones del sistema de mononucleares fagocitarios, hay inmunosupresión, la exposición es excesiva, o las aves se exponen a estrés anormal. En pollos la infección por el virus de la bronquitis infecciosa, por el virus de la enteritis hemorrágica en pavos, la exposición de las aves al amoniaco, son los factores más frecuentes que predisponen a la colibacilosis. Las interacciones del virus de la bronquitis infecciosa y *E. coli* se han estudiado mucho y se utilizan para determinar la virulencia de ambos microorganismos además de la eficacia de programas de vacunación (Calnek, 2000).

El estrés moderado aumenta la resistencia, tal vez como resultado de desarrollar la inmunidad después del contacto de microorganismos con el sistema inmunitario, o como resultado de desarrollar o ejercitar mecanismos de defensa y la conservación del mismo en un estado de aptitud. Debido a que casi todos los casos de colibacilosis se presentan de manera secundaria a uno o más factores, se deben identificar las causas predisponentes y corregirse antes para controlar la enfermedad de manera efectiva (Calnek, 2000).

4.2.5 Implicaciones en Salud Pública

Solía creerse que las cepas consideradas como patógenas para las aves (APEC) no producían ninguna afección en el hombre y otros animales y por lo tanto no se consideraban de importancia zoonótica. Pero debido a que comparten serotipos idénticos y también factores de virulencia específicos con patógenos humanos, en años recientes su potencial zoonótico ha sido tomado en consideración en numerosas investigaciones. Además las cepas presentes en las aves pueden transmitir genes de resistencia a antibióticos a cepas que afectan humanos y debido al uso indiscriminado de antibióticos en explotaciones aviares esto pudiera convertirse en un problema grave para el tratamiento de infecciones en humanos. (Dhama, 2013)

Las cepas resistentes presentes en el intestino y otros órganos de las aves contaminan la carcasa durante el faenado, y los huevos se contaminan durante la postura. Por lo que los humanos pueden infectarse vía directa (al contacto con heces) o al consumir productos contaminados con *E. coli*. Los productos de origen aviar siguen siendo la fuente primaria de infección en casos humanos. Aunado a esto ya se han reportado casos en donde las aves pueden infectarse de forma experimental o natural con cepas de *E. coli* O157: H7 un patógeno que afecta al ser humano produciendo afecciones enterohemorragicas. Algunas de las cepas APEC se han reportado actuando como patógenos de vías urinarias (UPEC) en infecciones en humanos. (Dhama, 2013)

4.3 Enfermedades en las Aves (Colibacilosis)

4.3.1 Colisepticemia

Esta es la forma más seria de presentación de la colibacilosis, esta enfermedad surgió con el avance en la tecnología de la producción, debido al gran número de aves y a la poca ventilación en los galpones de engorde, al mejorar estas condiciones la incidencia de la enfermedad disminuyó (Pattison, McMullin, Bradbury, & Alexander, 2008).

4.3.1.1 Epidemiología

4.3.1.2 Hospederos

Los pollos, pavos, patos y faisanes pueden ser afectados por la colisepticemia, aunque los pollos jóvenes son los más afectados. (Pattison, McMullin, Bradbury, & Alexander, 2008)

4.3.1.3 Diseminación

Los coliformes, incluyendo a los serotipos patógenos pueden ser habitantes normales del tracto digestivo de las aves domésticas y silvestres, que las diseminan a través de las heces, algunas veces en grandes cantidades. La *E. coli* puede sobrevivir durante largos periodos en ambientes secos, se ha demostrado que humedecer la cama puede reducir la incidencia de la colisepticemia. Los huevos pueden contaminarse con heces por su paso a través de la cloaca. Durante la eclosión otras aves se pueden contaminar con la bacteria esto resulta en altos rangos de mortalidad o puede provocar infecciones del saco vitelino. (Pattison, McMullin, Bradbury, & Alexander, 2008)

Existen factores coadyuvantes en la presentación de la enfermedad como la presencia de *Mycoplasma gallisepticum*, algunas enfermedades víricas como Marek, New Castle o la deficiencia de minerales pueden exacerbar la enfermedad o predisponer a las aves para que se presente la colisepticemia. (Pattison, McMullin, Bradbury, & Alexander, 2008)

4.3.1.4 Patogénesis

La *E. coli* es un habitante normal del tracto digestivo de las aves domésticas y se encuentran grandes cantidades particularmente en la parte más distal del intestino delgado y en los ciegos. Las serovares que comúnmente causan colisepticemia pueden encontrarse en la parte superior de la tráquea debido a la inhalación de polvo que contenga al microorganismo. Esta *E. coli* patogénica invade el cuerpo de las aves desde el sistema respiratorio siguiendo con infecciones de otros patógenos respiratorio y provocando el cuadro clínico característico de esta condición. Se pueden producir infecciones en la piel al penetrar el organismo por heridas o lesiones, lo que produce infecciones subcutáneas significativas. (Pattison, McMullin, Bradbury, & Alexander, 2008)

4.3.1.5 Signos clínicos

Las aves entre las 2 y 12 semanas de edad son las más afectadas, la mayoría de muertes ocurren en las semanas 4 a 9. El primer signo es una baja en el consumo de alimento, seguida de depresión y plumas erizadas. Las aves afectadas presentan signos respiratorios como disnea, jadeo y un típico estornudo. La mortalidad y la morbilidad son muy variables y usualmente las pérdidas son del 5%, aunque la morbilidad puede alcanzar el 50% de la parvada. Las aves que sobreviven no alcanzan el peso para la venta en el tiempo necesario y constituyen una pérdida para el productor. (Pattison, McMullin, Bradbury, & Alexander, 2008)

4.3.1.6 Lesiones

Las lesiones macroscópicas incluyen: poliserositis generalizada con varias combinaciones de pericarditis, perihepatitis, saculitis y peritonitis. La carcasa se encuentra deshidratada, oscura y septicémica, los órganos (hígado, bazo, pulmones y riñones) presentan congestión. La pericarditis fibrinosa es un hallazgo característico, presentando el pericardio grueso, blanquizco y adherido al corazón. (Pattison, McMullin, Bradbury, & Alexander, 2008)

4.3.1.7 Diagnóstico

El diagnóstico se puede confirmar al aislar al microorganismo de muestras directas de corazón, hígado, sacos aéreos y pulmones. (Pattison, McMullin, Bradbury, & Alexander, 2008)

4.3.1.8 Control

El mejor método de control es mantener la parvada en condiciones asépticas de limpieza, evitar la contaminación de alimento y agua (usar bebederos

de nipple) y obtener pollitos de granjas libres de *E. coli* el emplear dietas bien balanceadas previene la deficiencia de minerales que, como se explicó anteriormente predispone a la presentación de la enfermedad. (Pattison, McMullin, Bradbury, & Alexander, 2008)

Para el tratamiento se recomienda realizar un antibiograma para poder elegir un antibiótico correcto, en las etapas iniciales de un brote se deberá elegir un fármaco en base a experiencias pasadas. Es importante llevar registro de antibióticos utilizados para poder hacer cambios evitando así la resistencia microbiana. (Pattison, McMullin, Bradbury, & Alexander, 2008)

4.3.2 Peritonitis del Huevo

Se denomina peritonitis del huevo a un número de trastornos reproductivos, que incluyen salpingitis, peritonitis e impactación del oviducto. (Pattison, McMullin, Bradbury, & Alexander, 2008)

4.3.2.1 Agente etiológico

Muchas de las serovares patógenos de *E. coli* están involucrados en la enfermedad en todas las aves (gallinas, pollos, patos, gansos, y pavos); aunque se desconoce con certeza el mecanismo para invadir el sistema reproductivo, se cree que podría ser vía hematogena desde los sacos aéreos o de manera ascendente desde la cloaca. (Pattison, McMullin, Bradbury, & Alexander, 2008)

4.3.2.2 Factores predisponentes

El estrés, las enfermedades sistémicas como la pasteurelisis, enfermedades víricas o factores ambientales pueden predisponer a la presentación de esta patogenicia. (Pattison, McMullin, Bradbury, & Alexander, 2008)

4.3.2.3 Signos clínicos

Se presenta mortalidad repentina, las aves pueden dejar de comer y emaciarse. Los huevos puestos durante la infección pueden ser deformes y tener defectos en el cascarón. (Pattison, McMullin, Bradbury, & Alexander, 2008)

4.3.2.4 Lesiones

Salpingitis, deformidades en los ovarios, peritonitis, una masa caseosa con un olor desagradable puede estar presente en el abdomen. Huevos malformados o incompletos pueden estar impactados en el oviducto, este puede romperse debido a estos. (Pattison, McMullin, Bradbury, & Alexander, 2008)

4.3.2.5 Diagnóstico y control

El diagnóstico se realiza aislando al agente de muestras directas del oviducto. El tratamiento es difícil por lo que el control se orienta a disminuir los factores predisponentes. (Pattison, McMullin, Bradbury, & Alexander, 2008)

4.3.3 Infección del Saco Vitelino

Este trastorno es una de las causas más comunes de muerte en la primera semana de vida de los pollitos. *E. coli* puede estar relacionado como un agente primario o secundario. Los pollitos afectados estarán deprimidos, tendrán el abdomen distendido y tienden a agruparse. Las carcasas tendrán un olor pútrido. La necropsia revelara una carcasa septicémica con un saco vitelino no absorbido y presentando un color y consistencia anormal. Su diagnóstico se hace por aislamiento del agente causal en el saco vitelino de los pollitos muertos. (Pattison, McMullin, Bradbury, & Alexander, 2008)

Para el control no se recomienda el uso de antibióticos, la mejor forma de prevenirlo es obteniendo huevos embrionados de fuentes confiables y proveyendo un ambiente limpio en las incubadoras. (Pattison, McMullin, Bradbury, & Alexander, 2008)

4.3.4 Coligranuloma

Esta condición ocurre como causa de muerte esporádica en gallinas adultas. Los signos son inespecíficos, en la necropsia se encuentran granulomas amarillos y duros en el mesenterio y la pared del intestino y de manera particular en los ciegos. El hígado puede estar afectado de igual forma, este padecimiento se presenta como una curiosidad patológica más que como un problema de parvadas. (Pattison, McMullin, Bradbury, & Alexander, 2008)

4.3.5 Síndrome de cabezas hinchadas

Este síndrome se caracteriza por una inflamación edematosa sobre los ojos de reproductores y aves de postura comercial. Las lesiones son, inflamación que involucra a la piel facial y al tejido periorbital *E. coli* ha sido aislada de las lesiones, aunque parece ser que la enfermedad necesita una infección vírica previa. Se puede controlar la afección con tratamientos antibióticos. (Pattison, McMullin, Bradbury, & Alexander, 2008)

4.3.6 Celulitis

Esta afección de los pollos de engorde y ocasionalmente de patos, se trata de una inflamación necrótica de los tejidos adyacentes a la cloaca que causa pérdidas económicas debido a la devaluación de las carcasas. Las aves que sufren enfermedades inmunodepresivas y que reciben daños en la cloaca

(picoteo) pueden presentar luego infecciones en piel por *E. coli*. (Pattison, McMullin, Bradbury, & Alexander, 2008)

Se ha mencionado a *E. coli* como causante de otras afecciones tales como: sinovitis, artritis, saculitis, panoftalmitis y abscesos localizados. (Pattison, McMullin, Bradbury, & Alexander, 2008)

4.4 Tamarindo (*Tamarindus indica* L.)

4.4.1 Antecedentes

Doughari J. en el año 2006, realizó un estudio donde comparó el efecto antimicrobiano de diferentes extractos de las hojas y el fruto de *Tamarindus indica* L. utilizó varios microorganismos, entre estos *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella flexneri*, como microorganismos gram negativos y *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus pyogenes* como microorganismos grampositivos. El efecto antimicrobiano se midió por medio de discos conteniendo el extracto, los mejores resultados se obtuvieron con el extracto de acetona del fruto contra *Proteu smirabilis*, seguido por el extracto etanólico contra *E. coli*, *P. mirabilis* y *Salmonella Typhi*, y luego el extracto acuoso, los resultados de los extractos de las hojas también fueron positivos, el extracto con acetona presente los halos de inhibición de mayor tamaño, aunque todos los resultados fueron menores que los del fruto. (Doughari, 2006)

En 2010, Kothari, V y Seshadri, S, realizaron un estudio donde analizó la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos y de acetona de las semillas de, *Manilkarazapota*, *Anona squamosa*, y *Tamarindus indica* L, en el caso de los extractos con metanol y acetona de *T. indicus* obtuvieron resultados positivos

contra *Staphylococcus epidermidis* y *Salmonella paratyphi* utilizando el método de difusión en discos sobre agra Müller-Hinton. (Kothari & Seshadri, 2010)

Chungsamarnyartl, N y Jansawan, W, en 2001, realizaron un estudio en el que comprobaron la efectividad de extractos acuosos y etanólicos del fruto de *Tamarindus indica* L. contra hembras de *Boophilus microplus* usando el método de inmersión, ambos extractos causaron la muerte de las garrapatas, probando que pueden ser útiles en el control de estos parásitos en el ganado. (Chungsamarnyartl & Jansawan, 2001)

4.4.2 Clasificación

Nombre Común: Tamarindo

Familia: Fabaceae

4.4.3 Descripción Botánica

Árbol de 10-25 metros de alto, copa expandida, tronco grueso, corteza café. Hojas pecioladas, glabras; foliolos 10-18 pares, oblongos, redondeados. Cáliz pequeño, pétalos más largos que el cáliz. Legumbre 5-15 cm de largo, pulpa ácida; semillas lustrosas, cafés, 1 cm de ancho. (Cáceres, 2006)

4.4.4 Hábitat

Nativo de África, naturalizado en zonas secas del trópico hasta 1,200 msnm. Cultivado en Baja Verapaz, Chiquimula, El Progreso, Escuintla, Jutiapa, Retalhuleu, San Marcos, Santa Rosa y Zacapa. (Cáceres, 2006)

4.4.5 Usos y propiedades medicinales

Nativo de sabanas secas de África tropical, introducido por los árabes en Asia donde fue muy aceptado, particularmente en India que es el mayor productor. Introducido en América por los esclavos de África; cultivado en el Caribe y resto de América tropical. (Cáceres, 2006)

Con la pulpa del fruto se hace un refresco popular, todos sus órganos tienen aplicación culinaria, medicinal e industrial. La pulpa se usa por vía oral para tratar amigdalitis, diarrea, resfrío, infección urinaria y tinea. La decocción de hojas y corteza se usa para asma, conjuntivitis, diabetes, fiebre, gripe, ictericia, hipertensión, parásitos, resfrío y sarampión, el jugo para afecciones hepáticas y urinarias. (Cáceres, 2006)

Por vía tópica la pulpa y hojas se aplican en cataplasmas, polvos y ungüentos para tratar artritis, conjuntivitis, torceduras, induraciones, inflamaciones y tumores. La ceniza de la corteza se usa para tratar indigestión y faringitis; la ceniza de la raíz se usa en hepatitis y hemorragia. Las semillas se usan contra la diarrea por ser astringentes; producen un aceite comestible y una goma que tiene uso en la industria alimentaria. (Cáceres, 2006)

A las hojas y fruto se les atribuye propiedad antiinflamatoria, antiescorbútica, astringente, carminativa, digestiva, diurética, emética, febrífuga, laxante, refrescante y tónica. A la corteza se le atribuye propiedad astringente, febrífuga y tónica. (Cáceres, 2006)

Las hojas son alimento humano y animal, producen un colorante amarillo, se usan como mordiente; las flores son melíferas; el polvo de semillas se usa en la industria textil para acabado del algodón, para curtir cueros y estabilizar ladrillos; la madera se usa por el fino pulimento que da en la fabricación de muebles; por

asociación con un insecto (*Kerria laca*), el tallo produce una laca usada en la fabricación de barnices. El fruto es ampliamente usado en la cocina oriental. (Cáceres, 2006)

En la medicina tradicional de Tailandia, el fruto de *T. indica* es considerado como un digestivo, laxante, expectorante y tónico sanguíneo. Un extracto crudo de las semillas inhibe la actividad enzimática del veneno de *Vipera russelli*, en un efecto dosis dependiente. Ratones que fueron inoculados con el extracto diez minutos después de la inyección del veneno, fueron protegidos de los efectos de toxicidad-inducida del veneno. Se ha demostrado *In vitro* que un extracto crudo del fruto suprime la producción de óxido nítrico, sin producir efectos adversos. (Lans, 2007)

4.4.6 Constituyentes Químicos

Las hojas y raíces contienen vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina, ácidos alfa-o-glutárico, glioxílico, oxalacético y oxalsuccínico. La corteza contiene alcaloides (hordenina). El fruto contiene ácidos orgánicos (tartárico (8-18%), acético, cítrico, málico, succínico), azúcares, aminoácidos (ácido pipercolínico, beta-alanina, fenilalanina, leucina, prolina, serina) y pectina (2-4%). Las semillas contienen leucoantocianinas y aceite fijo (compuesto por ácido linoleico, oleico, palmítico, esteárico y lignocérico). (Cáceres, 2006)

La materia médica son frutos maduros y parcialmente secos sin la cáscara externa. El lupeol presente en las hojas, es uno de los responsables de su actividad antimicrobiana. (Cáceres, 2006)

4.4.7 Efectos adversos

No se han reportado efectos adversos. (Cáceres, 2006)

4.5 Salvia Sija (*Lippia alba*)

4.5.1 Antecedentes

Vera, J y col. Realizaron un estudio en 2007, analizando el efecto antimicrobiano *In vitro* de los compuestos volátiles y no volátiles de *Lippia alba*, y extractos de *Justicia pectoralis*, los microorganismos usados fueron *S. aureus*, *E. coli* y *Candida albicans*, los compuestos no volátiles (aceites esenciales) de *L. alba* mostraron actividad contra *C. albicans*, seguido de *S. aureus* y *E. coli*, obteniendo halos de inhibición mayores a los mostrados por los controles positivos (gentamicina, eritromicina y clotrimazol). La Concentración Inhibitoria Mínima fue de 500 µg/ml. (CIM) (Vera, Pastrana, Fernandez, & Viña, 2007)

Filho, J y col. realizaron un estudio en el que se evaluó el efecto antimicrobiano de extractos de la raíz de *Lippia alba*, los microorganismos usados fueron, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* sp y *Pseudomonas aeruginosa*. Los extractos de metanol y etanol mostraron actividad antibiótica contra *S. aureus* (se usaron dos cepas) y *Klebsiella pneumoniae*. La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) fue de 2mg/ml (Filho, Melo, Saraiva, Psiottano, & Xavier, 2006)

Mesa-Arango, A y col. Realizaron un estudio en 2009, en el que se comprobó la actividad antifúngica del carvoneno y del citral, dos aceites esenciales de *Lippia alba*, ambos compuestos analizados mostraron efectividad al inhibir el crecimiento de los hongos evaluados. (Mesa-Arango, Montiel-Ramos, Zapata, & Duran, 2009)

4.5.2 Clasificación

Nombre Común: Salvia Sija, Salvia Santa, Pronto alivio

Familia: Verbenaceae

4.5.3 Descripción Botánica

Arbusto aromático, 1.5 – 2 m. de altura, ramas largas, cayentes. Hojas opuestas, ovadas u oblongas, 2-8 cm. 0.9-2 cm. de ancho, arrugadas, finamente festonadas, cubiertas con pelillos muy finos y cortos en ambas superficies; venas prominentes en la cara externa. Flores lilas o blancas, tubulares, 4-5mm. de largo, cabezas flores redondas u oblongas, 8-12 mm. de largo, generalmente en pares en pequeños tallitos de 1.5 cm. De largo en las hojas axilares. (Standley, Williams, & Gibson, 1974)

4.5.4 Hábitat

Nativa del continente americano; crece en matorrales y a la orilla de caminos, desde México y Centro América hasta partes de Sur América y el Caribe, en alturas de hasta 1,800 m.s.n.m. En Guatemala se ha descrito en: Alta Verapaz, Chiquimula, Escuintla, Guatemala, Chimaltenango, Huehuetenango, Sacatepéquez y Sololá. (Standley, Williams, & Gibson, 1974)

4.5.5 Usos y propiedades medicinales

El uso medicinal de *Lippia alba* ha sido estudiada por numerosos autores, en estudios realizados en Sur América, se reporta el uso de la hojas en infusión, en problemas hipertensión, problemas digestivos, náusea y resfriados, localmente para curar heridas y como brebaje para tratar tos y bronquitis. Una infusión de raíces es utilizada contra resfriados fuertes y tos. En México las hojas son citadas

frecuentemente por médicos tradicionales por su uso contra problemas gastrointestinales. En Colombia es utilizada como un analgésico, contra diarrea, dolor estomacal, resfriados y tos. (Bailleul, Hennebelle, & Joseph, 2009)

En la comunidad afro-caribeña de Livingston (Guatemala), las hojas de la planta son usadas contra la tos (en decocción), problemas de la piel (maceradas, usándose para lavados), flatulencia (como infusión), náusea y vómitos (las hojas son fumadas), dolores de cabeza (se machacan las hojas y se utiliza como emplasto). La ruta de administración oral es la citada más frecuentemente. (Bailleul, Hennebelle, & Joseph, 2009)

4.5.6 Constituyentes químicos

La mayoría de los investigadores estudiaron los aceites esenciales de la planta, por métodos convencionales por ejemplo, cromatografía de gases, en la mayor parte de los casos al mismo tiempo con espectrometría. La composición de los aceites esenciales es muy variable, sugiriendo la existencia de un variado número de quimiotipos. (Bailleul, Hennebelle, & Joseph, 2009)

Recientemente se ha establecido un sistema clasificando los análisis publicados en siete quimiotipos, en base a la composición y de las formas de biosíntesis entre los diferentes aceites. Brevemente, el quimiotipo I, contiene citral, linalool, y cariofileno como constituyentes principales (existen cuatro subtipos); en el caso del quimiotipo II, contiene principalmente tagetoneno; el caso más común para el quimiotipo III fue el limoneno con una cantidad variable de carvona. Existen otros quimiotipos que varían en la presencia de un aceite esencial u otro en diferentes cantidades. (Bailleul, Hennebelle, & Joseph, 2009)

4.6 Granada (*Punica granatum*)

4.6.1 Antecedentes

Dahham, S y col realizaron un estudio en 2010 en el que analizaron los efectos antimicrobianos y antifúngicos de *Punica granatum*, se evaluaron extractos etanólicos del fruto, hojas y semillas de la planta, los extractos del fruto obtuvieron los mejores resultados, contra los microorganismos usados (*B. coagulans*, *B. cereus*, *B. subtilis* y *S. aureus* como grampositivos y *E. coli*, *K. pneumoniae*, y *P. aeruginosa* como gramnegativos). (Dahham, Ali, & Khan, 2010)

Nascimento, G y col en 2000, realizaron un estudio durante el cual evaluaron los efectos de los extractos etánolicos de algunas plantas con reportado efecto antimicrobiano, sobre bacterias que muestran resistencia a los antibacterianos comunes, en el estudio el extracto de *P. granatum*, mostró eficacia el inhibir el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* (Nascimento, 2000)

Braga, L y col en 2005, efectuaron un estudio en el que analizaron el efecto inhibitorio del crecimiento de una baja concentración de un extracto de *P. granatum* (0.01% v/v) sobre *Staphylococcus aureus*, los resultados fueron positivos, a una concentración de 1% v/v el extracto eliminó el crecimiento bacteriano, y una concentración de 0.05% (v/v) inhibió la producción de enterotoxina (SE) por parte de los microorganismos. (Braga, 2005)

Menezes, S y col realizaron un estudio en 2006, donde se evaluó el efecto sobre los microorganismos de la placa bacteriana oral, de un extracto hidroalcohólico de *P. granatum* los resultados fueron muy satisfactorios, ya que inhibió el crecimiento de la placa bacteriana, a niveles iguales que la clorhexidina que fue usada como control positivo. (Menezes, 2006)

McCarrell, M y col en 2008, realizaron un estudio en el que se analizó el potencial antimicrobiano de un extracto acuoso de Granada (*P. granatum*), al adicionar sales de metales y vitamina C. Se compararon los resultado con los obtenidos solamente con el extracto acuoso, los microorganismos utilizados fueron, como gram positivos, *S. aureus*, *B. subtilis* y como gran negativos, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *P. mirabilis*. En los resultados el halo de inhibición para ambos extractos (el simple y el adicionado con sales y vitamina C) fueron muy similares (McCarrel, 2008)

4.6.2 Clasificación

Nombre Común: Granada

Familia: Lithraceae

4.6.3 Descripción Botánica

Arbusto o árbol pequeño de 6 m. de altura, ramificado desde la base, tronco corto, corteza delgada, gris-café. Hojas cortamente pecioladas, elípticas a oblongas, de 2-6 cm. de largo, ápices obtusos, atenuados en la base, glabras. Flores con pétalos obovados de 1.5-2.5 cm. de largo, rojo encendido. Fruto redondo de 5-10 cm. de diámetro, pulpa blanco-rosada, se abre al madurar, cascara gruesa y cueruda; 5-8 compartimientos con sacos conteniendo una semilla triangular, blanquecina, 6 mm. de largo. (Cáceres, 2006)

4.6.4 Hábitat

Nativa del Sudeste de Asia o Este de África, aclimatada a la región Mediterránea; cultivada en la mayoría de las regiones tropicales y subtropicales del mundo. En Guatemala se encuentra plantada en varias alturas, aunque en pequeñas cantidades. (Cáceres, 2006)

4.6.5 Propiedades y usos medicinales

Se menciona en los Papiros de Egipto; era parte de la decoración de los pilares del templo del Rey Salomón; recomendada como vermífugo por Celso, Dioscórides y Plinio; usado desde hace milenios en China como vermífugo con el nombre de *Shiliu pi*. Considerado uno de los frutales de cultivo más antiguo. (Cáceres, 2006)

La decocción de la corteza del tronco se usa para expulsar tenias. La decocción de cáscara del fruto se usa para tratar afecciones gastrointestinales y catarros respiratorios, metrorragia y blenorragia. El jugo del fruto en jarabe se usa para expulsar parásitos, hipertensión, artritis, enfermedades urinarias e ictericia. (Cáceres, 2006)

Tópicamente se usa en lavados vaginales para leucorrea, en gargarismos para amigdalitis, en enema para enteritis y en lavados para hemorroides y conjuntivitis. (Cáceres, 2006)

Al epicarpio se le atribuye propiedad astringente, emenagoga y vermífuga. El fruto se come fresco, se hace vino y se prepara un jarabe refrescante conocido como granadina. A la corteza del tronco y la raíz se les atribuye propiedad astringente, emética y vermífuga (*Taenia spp.*) (Cáceres, 2006)

4.6.6 Constituyentes Químicos

La corteza del tronco y de la raíz contiene alcaloides (peletierina, isopeletierina) y taninos (punicalina). El pericarpio del fruto contiene ácido gálico, isoquercitrina, varios elagitaninos, pectina, taninos y compuestos como inhibidores de la anhidrasa carbónica (punicalina, casuarinina) y cuatro moderadamente activos (ácido gálico, granatina A, corilagina, ácido elágico) (Cáceres, 2006)

La peletierina es un líquido aceitoso muy inestable, derivado de la piperidina, con actividad antihelmíntica (céstodes y nematodos). El tanato de pelletierina es una mezcla de los diferentes alcaloides de la corteza, soluble en 250 partes de agua, debe protegerse de la acción la luz; es la forma estable con mayor actividad ténica. Los taninos son astrigentes (Cáceres, 2006)

4.6.7 Efectos adversos

El extracto etanólico del epicarpio no presenta toxicidad aguda en ratas (5mg/kg) ni es embriotóxico; la DL₅₀ del extracto es 731mg/kg. Sus alcaloides pueden provocar síntomas de intoxicación, (vértigo, disminución de la visión, debilidad, calambres en las piernas y temblores convulsivos); la dosis tóxica produce midriasis, ceguera parcial, cefalea, vómito, diarrea, postración y convulsiones. La DL de la peletierina por vía IV en conejos es de 40mg/kg (Cáceres, 2006)

En humanos se reporta contraindicado en embarazo, lactancia, gastritis y úlcera gastroduodenal (Cáceres, 2006)

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

- Área de trabajo
 - Laboratorio de Referencia Regional de Sanidad Animal – LARRSA-
 - Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

- Recursos humanos
 - Asesores de tesis.
 - Estudiante investigador.

- Recursos biológicos
 - Cepa de *Escherichia coli* aislada en LARRSA de muestras provenientes de explotaciones avícolas.
 - Hojas de Salvia Sija (*Lippia alba*)
 - Hojas de Tamarindo (*Tamarindus indica* L.)
 - Fruto de Granada (*Punica granatum*)

- Materiales de oficina
 - Cuaderno.
 - Hojas papel bond.
 - Computadora.
 - Impresora.
 - Lapiceros.
 - Cámara fotográfica.

- Materiales de laboratorio
 - Gradilla.
 - Guantes de látex.
 - Balones aforados de 50 ml.
 - Campana de flujo laminar.
 - Pipetas estériles graduadas de 1, 5 y 10ml.
 - Asa Bacteriológica.
 - Placas cuadríplates estériles de 90 mm.
 - Agar Müeller-Hinton
 - Discos de Susceptibilidad
 - Placas Petri estériles de 90mm

- Materiales para la preparación de las tinturas
 - Etanol al 35%.
 - Recipientes de vidrio de color ámbar.
 - Papel Whatman No.2.
 - Probetas graduadas.
 - Pesa electrónica.
 - Mezcladores de vidrio.

5.2 Metodología

5.2.1 Obtención de microorganismos

La cepa de *Escherichia coli* que se utilizó se obtuvo del Laboratorio Regional de Referencia para Sanidad Animal –LARSSA-, donde fue aislada de muestras provenientes de explotaciones avícolas.

5.2.2 Preparación de las tinturas

Se utilizó el fruto de *Punica granatum* (Granada) y las hojas de *Tamarindus indica* L (Tamarindo) y *Lippia alba* (Salvia Sija), para realizar las tinturas.

Para poder obtener los principios activos de las plantas e imitando las condiciones de uso y preparación de las tinturas en comunidades, la parte de la planta que se utilizó se desecó al sol en un recipiente usado para tal fin, que consistió en un cajón de madera recubierto de malla mosquitero para evitar la entrada de insectos, pero que permite el paso del aire. Este proceso duró aproximadamente dos días en el caso de las hojas y 3 días en el caso del fruto (epicarpio) de la granada.

Para preparar la tintura de *Tamarindus indica* L al 10%, se pesaron 10 gr de las hojas secas y se mezclaron con la cantidad suficiente de etanol al 35% para 100 ml, la solución resultante se mantuvo en un frasco oscuro durante 20 días a temperatura ambiente, siendo agitado diariamente, luego se filtró en papel Whatman No. 2 y se guardó en un frasco oscuro para su posterior uso.

En el caso de *Punica granatum* al 10%, se pesaron 10 gr del fruto secado al horno que se mezclaron con la cantidad suficiente de etanol al 35% para 100 ml, luego se guardó en un frasco oscuro durante 20 días, siendo agitado

diariamente, luego se filtró en papel Whatman No. 2 y se mantuvo en un frasco oscuro para su posterior uso.

Para la tintura de *Lippia alba* al 10%, se pesaron 10 gr de hojas secas y se mezclaron con la cantidad suficiente de etanol al 35% para 100 ml, esta mezcla se mantuvo en un frasco oscuro, a temperatura ambiente durante 20 días, siendo agitado diariamente, luego se filtró en papel Whatman No. 2 y se guardó de la misma forma que las tinturas anteriores.

5.2.3 Preparación del agar planta

Para la preparación del agar-planta se agregaron 4.5 ml de la tintura a una concentración de 100 mg/ml, a 40.5 ml de agar Müeller-Hinton previamente autoclaveado y enfriado a 50°C, para obtener una concentración final de 10mg/ml.

Esta dilución se agitó y vertió en 2 cajas cuadrilate estériles, vertiendo 5 ml en cada uno de los cuadrantes, el sobrante y lo que se adhirió a las paredes de los recipientes fue descartado. Se identificaron las placas y se incubaron durante 24 horas a 37°C para comprobar esterilidad. Se preparó agar-planta con las otras dos tinturas de la misma forma.

5.2.4 Determinación del efecto antibacteriano

Se inoculó la cepa de *E. coli* en las cajas que contenían el agar planta, usando el método de siembra de una estría, realizando 8 repeticiones por tintura.

Estos procesos se realizaron en el área de bacteriología de LARRSA, utilizando las debidas medidas de bioseguridad para evitar contaminación tanto en las placas como en el medio ambiente.

Se tomó como resultado positivo cuando en la placa no se observó crecimiento bacteriano, negativo cuando se presentaron colonias en el medio y contaminación cuando existió crecimiento fuera del lugar de inoculación en la placa.

5.2.5 Preparación del control negativo (a la inhibición)

El control negativo se preparó mezclando 9 ml de agar Müeller-Hinton y 1 ml de alcohol etílico al 35%, dicha mezcla se homogenizó y posteriormente se vertió en una placa de Petri estéril que se dejó enfriar a temperatura ambiente y luego se incubó durante a 37°C durante 24 horas para comprobar su esterilidad.

La cepa de *Escherichia coli* se sembró por agotamiento sobre el medio para comprobar que la concentración de alcohol etílico en la tintura no tuviera efecto antibiótico.

5.2.6 Determinación de la concentración Inhibitoria Mínima

La actividad antimicrobiana de las diferentes tinturas se determinó evaluando la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento; este valor es conocido como Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). Se realizaron diluciones de las tinturas que mostraron actividad antimicrobiana durante la primera fase, en la cual se había utilizado una concentración de 10 mg/ml, por lo que las diluciones evaluadas en esta fase fueron 5, 2.5 y 1.25 mg/ml.

Para la preparación de los agares se utilizaron 45 ml de agar Müller-Hinton que se mezcló con 5 ml de cada una de las diluciones a utilizar. Después de homogenizar se vertió en placas cuadrilate, se dejó enfriar a temperatura ambiente mientras solidificaba y posteriormente se incubaron a 37°C durante 24 horas como control de esterilidad.

5.3 Análisis de Datos

La variable a analizar fue del tipo cualitativa nominal, pudiendo presentar dos resultados, sí o no, es decir hubo crecimiento, no hubo crecimiento. Para el análisis de la misma se presentaron los resultados de las siembras en una tabla de frecuencias y por medio de porcentajes se estableció si la tintura presentaba o no, un efecto antimicrobiano a la concentración base propuesta, siendo esta 10 mg/ml.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluó el efecto antibacteriano *in vitro* de las tres diferentes tinturas naturales sobre la cepa de *Escherichia coli* aislada de explotaciones avícolas de Guatemala, obteniendo los siguientes resultados. Los extractos de *Tamarindus indica* (Tamarindo) y *Lippia alba* (Salvia Sija) a la concentración de 10mg/ml no presentaron actividad antimicrobiana ya que se presentó crecimiento en las 8 repeticiones realizadas en el estudio contra la cepa de *Escherichia coli*. Esto difiere de los resultados obtenidos por Cáceres (2006) en los que se utilizaron cepas de origen humano; se sabe que la concentración de aceites esenciales (a los que se atribuyen las propiedades antibacterianas de dichas plantas) varía de acuerdo al tipo de suelo y las condiciones climáticas. El extracto etanólico de *Punica granatum* (Granada) a una concentración 10mg/ml mostró actividad contra la cepa de *E. coli* utilizada en el estudio, ya que no se observó crecimiento bacteriano en las 8 repeticiones realizadas (Cuadro No. 1). (Janssen, Scheffer, & Baerheim, 1987) (Sivropoulou, Kokkini, Lanaras, & Arsenakis, 1995).

Cuadro No. 1 Efecto antibacteriano in vitro de tres diferentes Tinturas Naturales sobre *Escherichia coli* a una concentración de 10mg/ml

| Agar planta a 10mg/ml | Número de Siembras | Resultados | | Efectividad |
|----------------------------|--------------------|------------|-----------|-------------|
| | | Inhibe | No Inhibe | |
| <i>Tamarindus indica</i> L | 8 | 0 | 8 | 0% |
| <i>Lippia alba</i> | 8 | 0 | 8 | 0% |
| <i>Punica granatum</i> | 8 | 8 | 0 | 100% |

Fuente: Elaboración propia

Aunado a esto la capacidad de las bacterias de generar resistencia a los antibióticos está muy bien documentada y en estudios anteriores en donde se utilizó una cepa de *Escherichia coli* multiresistente a antibióticos, también resultó ser resistente a los extractos de las plantas utilizados en el estudio. (Nascimento, 2000)

La forma en que los aceites esenciales, que forman parte de los extractos, afectan a las bacterias varía de acuerdo al compuesto químico, pero se cree que en general debido a su naturaleza hidrófoba, afectan tanto la membrana celular como mitocondrial creando poros entre los lípidos de la misma, produciendo así la salida de componentes celulares y causando la muerte de las bacterias. (Burt, 2004)

Las propiedades medicinales de *Punica granatum* (Granada) han sido estudiadas en varios países, aunque se reconoce la presencia de aceites esenciales en los extractos de esta de esta planta, por ejemplo la granatina A y la corilagina, a estos son atribuidas principalmente propiedades antivíricas, antitumorales y antiinflamatorias. Las propiedades antibacterianas de los extractos de Granada son atribuidas a la presencia de taninos, elagitaninos y flavonoides. (Parseh, Hassanpour, Zhara, & Lavasani, 2012)

Los taninos son sustancias complejas que se presentan como mezclas de polifenoles difíciles de separar. Los taninos pueden ser tóxicos a hongos filamentosos, levaduras y bacterias. Por lo tanto, existen tres hipótesis en cuanto a su mecanismo de acción: la inhibición de enzimas de microorganismos, ligándose como sustrato a esas enzimas; a través de su acción sobre la membrana celular, modificando su metabolismo, y por la complementación de los taninos en los iones metálicos, disminuyendo estos iones esenciales para el metabolismo de los microorganismos. Puede que sean estos compuestos los responsables del efecto antimicrobiano que demostró el extracto etanólico de la Granada. (Parseh, Hassanpour, Zhara, & Lavasani, 2012)

Con respecto a establecer la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de las tinturas de Tamarindo y Salvia Sija, debido a que los resultados obtenidos a una concentración de 10 mg/ml fueron negativos, no se realizaron diluciones para determinar la CIM de estos dos extractos naturales.

La tintura de *Punica granatum* sí presentó actividad antimicrobiana en la primera fase del estudio, por lo que se realizaron diluciones a 5 mg/ml, 2.5 mg/ml y 1.25 mg/ml para poder determinar la Concentración Inhibitoria Mínima, de acuerdo a los resultados obtenidos se concluyó que la CIM para esta tintura natural fue la concentración propuesta de 10 mg/ml (Cuadro No. 2).

Cuadro No. 2 Evaluación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de la Tintura del fruto de Granada (*Punica granatum*).

| Concentración | Siembras realizadas | Inhibe | No Inhibe |
|---------------|---------------------|--------|-----------|
| 1.25 mg/ml | 8 | 1 | 7 |
| 2.5 mg/ml | 8 | 2 | 6 |
| 5 mg/ml | 8 | 4 | 4 |
| 10 mg/ml | 8 | 8 | 0 |
| CIM= 10 mg/ml | | | |

Fuente: Elaboración propia

VII. CONCLUSIONES

- La tintura natural de extracto etanólico de Granada (*Punica granatum*) a una concentración de 10 mg/ml presentó efecto antibacteriano *in vitro* contra la cepa de *Escherichia coli* aislada de muestras de explotaciones avícolas de Guatemala.
- Las tinturas naturales de extracto etanólico de Tamarindo (*Tamarindus indica* L.) y Salvia Sija (*Lippia alba*), a una concentración de 10 mg/ml, no presentaron efecto antibacteriano *in vitro* contra la cepa de *Escherichia coli* utilizada en este estudio.
- La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de la tintura de Granada para la cepa utilizada de *Escherichia coli* evaluada en este estudio, fue de 10 mg/ml.
- La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de las tinturas de Tamarindo y Salvia Sija no se determinó, ya que no mostraron actividad antibacteriana *in vitro* contra la cepa de *Escherichia coli* evaluada, en la concentración de 10 mg/ml.

VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios *in vivo* para comprobar la eficacia de la tintura de Granada (*Punica granatum*) contra *Escherichia coli* en aves.
- Realizar estudios *in vitro* para determinar la eficacia antimicrobiana de la tintura natural de Granada contra *Escherichia coli* que afecta a otras especies animales.
- Realizar estudios *in vitro* evaluando la eficacia antimicrobiana de la Granada, utilizando otros métodos de extracción de los compuestos medicinales de la Granada.

IX. RESUMEN

En nuestro país el uso tradicional de extractos de plantas está arraigado en la cultura, debido a la accesibilidad y a la gran variedad de plantas consideradas de uso medicinal. Debido a las malas condiciones de salud en comunidades rurales, las diarreas y otras afecciones de origen bacteriano son causas muy comunes en la baja de producción y en algunos casos la muerte en aves de explotaciones familiares o de traspatio. Por lo que en este estudio se evaluó la efectividad de tres plantas: Tamarindo, Granada y Salvia Sija, contra una cepa de *Escherichia coli* aislada de muestras de explotaciones avícolas de Guatemala, bacteria considerada comensal en el intestino de las aves, pero que al superar las barreras de defensa produce diversas afecciones.

Para extraer los compuestos considerados medicinales, se utilizó el etanol a una concentración de 35% usando un método artesanal, obteniendo como producto las tres tinturas naturales a una concentración de 10%. Cada una de estas se mezcló con agar Müeller-Hinton para producir agar planta, se realizaron 8 siembras inoculando la cepa de *E. coli*. Se evaluó el efecto antibacteriano de las tres tinturas naturales determinando que únicamente la tintura de Granada (*Punica granatum*) presentó efecto contra la cepa de *E. coli* evaluada en el estudio. Se determinó que la Concentración Inhibitoria Mínima fue la concentración propuesta de 10 mg/ml.

Las propiedades antimicrobianas de la Granada se atribuyen a compuestos llamados Taninos. La cepa evaluada en el estudio fue resistente a varios antibióticos de uso común en Guatemala, entre ellos la amoxicilina, cuyo mecanismo de acción es modificar la pared bacteriana alterando su permeabilidad, este mecanismo también se atribuye a los aceites esenciales del Tamarindo y la Salvia Sija, lo que pudiera explicar la falta de efecto de estas dos tinturas.

SUMMARY

In Guatemala the use of plant extracts is part of the traditional medicine and a part of the Guatemalan culture, due to the variety of plants with medical characteristics and the access to them, rather than drugs and chemicals. Poor sanitary measures in rural areas causes bacterial affections that threaten the health and production rates on poultry. That is why it was decided to test the antibacterial effect of an etanolic extract from Tamarind, Pomegranate and Salvia Sija on *Escherichia coli* isolated in Guatemala. *E. coli* is a commensal bacteria in poultry and mammals but if it surpasses the bodily defenses it may cause a fatal infection.

To extract the antibacterial elements from the plants, etanolic alcohol at 35% was used imitating the possible use in rural areas; the three different products were used at a 10% concentration. To test the antibacterial effects the etanolic extract were mixed with Müller-Hinton agar to produce the plant-agar. The only etanolic extract that showed antibacterial effect was the one made from pomegranate (*Punica granatum*). The minimum inhibitory concentration (MIC) was 10 mg/ml.

The antibacterial properties from pomegranate are attributed to tannins and elagitannins, these phenolic compounds have different effects on bacteria they can affect the membrane or make the essential minerals unavailable to bacteria, preventing therefore, the growth and bacterial reproduction. Previous studies signaled the essential oils to be responsible for the antibacterial effects of the other two plants (Tamarind and Salvia Sija), however this chemicals seemed to have a mechanism too related to some of the antimicrobial drugs used on poultry, that could be the reason why they did not shown any antibacterial effects, because the strain used in this study was resistant to several antibiotics. The use of other *E. coli* strains in another study is therefore advised to check the antibacterial effects of the pomegranate etanolic extract.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

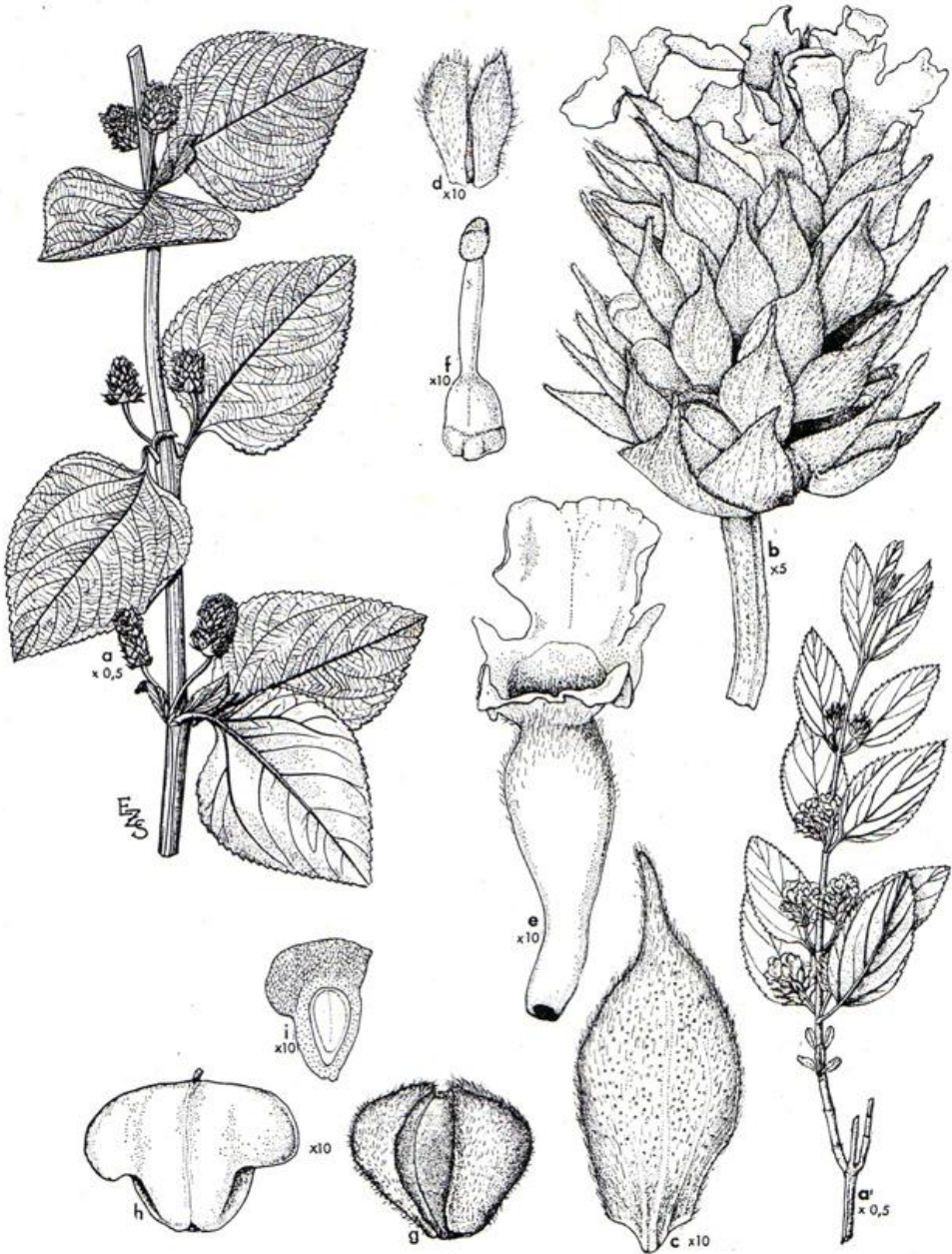
1. Bailleul, F., Hennebelle, T., & Joseph, H. (2009). ***Ethnopharmacology of Lippia alba***. Abgerufen am 10. April 2011 von <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874107006447>
2. Braga, L. (2005). **Pomegranate extract inhibits Staphylococcus aureus growth and subsequent enterotoxin production.** *Journal of Ethnopharmacology* , 335-339.
3. Burt, S. (2004). **Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review.** *International Journal of Food Microbiology III* (94), 223-253.
4. Cáceres, A. (2006). **Vademécum Nacional de Plantas Medicinales.** Guatemala: Agencia Sueca de Cooperación Internacional para el Desarrollo.
5. Calnek, B. (2000). **Enfermedades de las Aves.** México, D.f: Manual Moderno.
6. Chungsamarnyartl, N., & Jansawan, W. (2001). **Effect of Tamarindus indicus L. Against the Boophilus microplus.** *Kasetsart Journal of Natural Science* , 34-39.
7. Dahham, S., Ali, M., & Khan, M. (2010). **Studies of Antibacterial and Antifungal Activity of Pomegranate (Punica granatum).** *Amerian-Eurasian Journal of Agriculture & Enviroment Science* , 273-281.
8. Dhama, K. C. (2013). **Escherichia coli, an economically important avian pathogen, its disease manifestations, diagnosis and control, and public health significance: A review.** *Research Opinions In Animal & Veterinary Sciences* , 179-194.
9. Doughari, J. (2006). **Antimicrobial Activity of Tamarindus indica L.** *Tropical of Pharmaceutical Research* , 597-603.
10. Erb, A., Stürmer, T., & Marre, R. (2007). **Prevalence of antibiotic resistance in Escherichia coli: overview of geographical, temporal, and methodological variations.** *European Journal of clinical microbiology & infectious diseases* , 83-90.

11. Filho, J., Melo, J., Saraiva, M., Psiottano, M., & Xavier, H. (2006). **Antimicrobial Activity and Phytochemical profile from the roots of *Lippia alba***. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* , 506-509.
12. Janssen, A., Scheffer, J., & Baerheim, A. (1987). **Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-86 literature review**. *Planta Medica* , 395-398.
13. Köehler, H. (12 de Junio de 2014). **Köhler's Medizinal-Pflanzen**. Recuperado el 30 de octubre de 2015, de <http://www.koehlers-Pflanzen.org>
14. Kothari, V., & Seshadri, S. (2010). **In vitro Antibacterial activity in seed extracts of *Manilkara zapota*, *Anona squamosa* and *Tamarindus indica***. *Biology Research* , 165-168.
15. Lans, C. (2007). **Comparison of plants used for skin and stomach problems in Trinidad y Tobago with Asian Ethnomedicine**. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* , 33-40.
16. McCarrel, M. (2008). **Antimicrobial activities of pomegranate rind extracts: enhancement by addition of metal salts and vitamin C**. *BMC Complementary and Alternative Medicine* , 64.
17. Menezes, L. (2006). ***Punica granatum* (Pomegranate) Extract Is Active Against Dental Plaque**. *Journal of Herbal Pharmacotherapy* , 79-92.
18. Mesa-Arango, A., Montiel-Ramos, J., Zapata, B., & Duran, C. (2009). **Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity**. *Memories Institute Oswaldo Cruz* , 878-884.
19. Nascimento, G. (2000). **Antibacterial Activity Of Plant Extracts And Phytochemicals On Antibiotic Resistant Bacteria** , *Medica Plantae*. 247-256.
20. Parseh, H., Hassanpour, S., Zhara, E., & Lavasani, A. (2012). **Antimicrobial properties of Pomegranate (*Punica granatum* L.) as a Tannin rich fruit**. *National Congress on Recycling of Organic Waste in Agriculture* (S. 86-92). Isfahan, Iran: CROWA.
21. Pattison, M., McMullin, P., Bradbury, J., & Alexander, D. (2008). **Poultry Diseases** (Sexta ed.). Liverpool: Saunders Elsevier.

22. Ritchie, B., Harrison, G., & Harrison, L. (2005). **Avian Medicine: Principles and Application**. Lake Worth, Florida: Wingers Publishing, Inc.
23. Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M. (1995). **Antimicrobial activity of mint essential oils**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 2384-2388.
24. Stanchi, O. (2007). **Microbiología Veterinaria**. Buenos Aires, Argentina: Inter-Médica.
25. Standley, P., Williams, L., & Gibson, D. (1974). **Flora of Guatemala**. *Fieldiana Botany* , 187-198, 462-466.
26. Vera, J., Pastrana, P., Fernandez, K., & Viña, A. (2007). **Actividad Antimicrobiana In vitro de volátiles y no volátiles de Lippia alba y extractos orgánicos y acuoso de Justicia pectoralis cultivadas en diferentes pisos térmicos del departamento de Tolima** . *Scientia Technica* , 25-34.
27. Womack, N., Kabera, C., Tong, E., Jones, S., & Gaines, S. (2010). **The use of Escherichia coli as a sentinel for antimicrobial resistance in Salmonella** . *National Foundation for Infectious Diseases Annual Conference on Antimicrobial Resistance* (S. 50-62). Maryland: The Foundation.

XI. ANEXOS

Figura 1. Hojas e inflorescencia de *Lippia alba*



— *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown: a, a', ramas floríferas; b, inflorescencia; c, bráctea; d, cáliz; e, corola; f, gineceo; g, cáliz fructífero; h, fruto; i, corte longitudinal de un mericarpio.

Fuente: (Cáceres, 2006)

Figura 2. Hojas, flores y fruto de *Tamarindus indica*



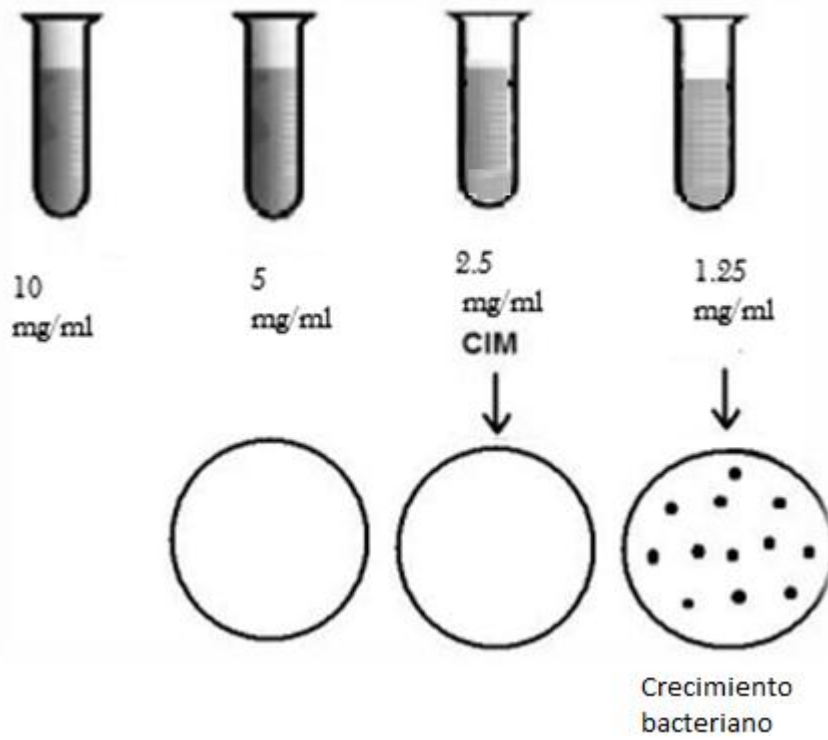
Fuente: (Köehler, 2014)

Figura 3. Hojas y fruto de *Punica granatum*



Fuente: (Köhler, 2014)

Figura 4. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima



Fuente: Elaboración propia

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

**EFFECTO ANTIBACTERIANO *in Vitro* DE TRES DIFERENTES
TINTURAS NATURALES SOBRE *Escherichia coli* AISLADA DE
MUESTRAS PROVENIENTES DE EXPLOTACIONES AVÍCOLAS
DE GUATEMALA**

f. _____
OLSON HAROLDO PALALA ENRÍQUEZ

f. _____
M. A. DORA ELENA CHANG DE JO
ASESOR PRINCIPAL

f. _____
M. Sc. FRANCISCO ESCOBAR SERRANO
ASESOR

f. _____
M.A. ANDREA MUÑOZ LORENZANA
EVALUADOR

IMPRÍMASE

f. _____
M.Sc. CARLOS ENRIQUE SAAVEDRA VÉLEZ
DECANO