

**UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO**



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**“DR. WILMAN RUÍZ VIGO”**

**CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**Comparación del efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial  
de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano” con claritromicina  
en cepas de *Helicobacter pylori***

**Bach. Ángel Lorenzo Mendoza Guarniz**

**Bach. Sonia Vásquez Tarrillo**

**Asesora:**

**Dra. Q.F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia**

**Co-Asesor:**

**Mg. Blgo. Jorge Enrique Bazán Mayra**

**Cajamarca – Perú**

**Mayo – 2019**

**UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO**



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**“DR. WILMAN RUÍZ VIGO”**

**CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**Comparación del efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial  
de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano” con claritromicina  
en cepas de *Helicobacter pylori***

Tesis presentada en cumplimiento parcial de los requerimientos para optar el  
Título Profesional de Químico Farmacéutico

**Bach. Ángel Lorenzo Mendoza Guarniz**

**Bach. Sonia Vásquez Tarrillo**

**Asesora: Dra. Q.F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia**

**Co-Asesor: Mg. Blgo. Jorge Enrique Bazán Mayra**

**Cajamarca – Perú**

**Mayo – 2019**

COPYRIGHT © 2019 by

Ángel Lorenzo Mendoza Guarniz

Sonia Vásquez Tarrillo

Todos los derechos reservados

## PRESENTACIÓN

SEÑORES MIEMBROS DEL JURADO EVALUADOR:

Dando cumplimiento a lo establecido por el Reglamento de Grados y Títulos Profesionales en la Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo de Cajamarca, sometemos a vuestro elevado criterio el presente trabajo de investigación intitulado:

**Comparación del efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano” con claritromicina en cepas de *Helicobacter pylori*.**

Es una buena oportunidad para manifestar nuestro sincero reconocimiento a nuestra Alma Mater y a toda su plana docente, que con su buena voluntad y capacidad contribuyeron a nuestra formación profesional.

Señores miembros del jurado evaluador, dejamos a su disposición el presente trabajo de investigación para su evaluación correspondiente y sugerencias.

Cajamarca, mayo del 2019

---

Ángel Lorenzo Mendoza Guarniz  
BACH. EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA

---

Sonia Vásquez Tarrillo  
BACH. EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**“DR. WILMAN RUÍZ VIGO”**

**CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

APROBACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO

**Comparación del efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial  
de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano” con claritromicina  
en cepas de *Helicobacter pylori***

**JURADO EVALUADOR**

-----  
Mg. Blgo. Héctor Emilio Garay Montañez  
PRESIDENTE

-----  
Dra. Q.F. Martha Adriana Sánchez Uceda  
MIEMBRO

-----  
Dra. Q.F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia  
MIEMBRO

## DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y estar conmigo en cada paso que doy, guiándome por el buen camino, por iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de mis estudios profesionales; quienes me enseñaron a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. Seguiré conservando a aquellas personas maravillosas que amo con todo mi corazón, como son mis padres y hermanos.

A mis padres: Lorenzo Mendoza Muñoz y Santos Guarniz Miranda, por guiarme por el buen camino, haberme inculcado buenos hábitos, principios y valores; gracias por todos los consejos brindados.

A mi esposa, por ser el motor y motivo de este segundo emprendimiento. Gracias por todo mi amor.

**Ángel**

## DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía, luz en mi camino y darme una familia maravillosa, la que me enseñó a luchar por cumplir mis metas y objetivos a pesar de las dificultades de la vida.

A mis padres: César Vásquez y Juliana Tarrillo, quienes hasta este momento de mi vida, han velado por mi bienestar y salud; además de apoyarme en todo momento de manera incondicional, depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba y aconsejándome a lograr las metas que uno se traza.

A mi hermana, sobrinas y familia, por ser fuente de inspiración y ejemplo de personas; gracias por mostrarme su apoyo voluntario, cariño y comprensión en los momentos más difíciles de mi vida y carrera profesional.

**Sonia**

## AGRADECIMIENTO

A Dios por estar con nosotros día a día, fortalecer nuestros corazones e iluminar nuestras mentes y habernos acompañado y guiado a lo largo de nuestra carrera profesional.

A nuestros queridos y adorados padres, quienes con tanto amor y cariño nos brindaron su apoyo incondicional durante todo el tiempo que pasamos estudiando.

A nuestros docentes quienes, con su sabiduría y años de experiencias, nos transmitieron sus conocimientos que nos servirán más adelante para nosotros también transmitirlos a la sociedad que lo necesita.

A la Dra. Q.F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia, nuestra asesora, quien con su experiencia como docente ha sido la guía idónea durante toda la ejecución de esta tesis; así como, a nuestro Co-Asesor Mg. Blgo. Jorge Enrique Bazán Mayra por su apoyo y grata acogida.

**Ángel y Sonia**

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo principal comparar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano” con claritromicina en cepas de *Helicobacter pylori*. Las cepas fueron obtenidas a partir de biopsias gástricas de pacientes del Hospital II EsSalud - Cajamarca, codificadas como: M – 019, M – 020, M – 021, M – 025 y M – 030. El aceite esencial, se obtuvo por el método de destilación por arrastre de vapor. El efecto antibacteriano in vitro, se determinó mediante el método de Kirby Bauer, con discos de sensibilidad antibiótica de claritromicina 15 µg como grupo control positivo y discos de papel embebidos con aceite esencial de orégano al 100 %, 50 % y 10 % como grupos problema. Los resultados mostraron halos de inhibición promedio para claritromicina de 28,8 mm; para el aceite esencial al 100 % de 15,7 mm; al 50 % 8,7 mm y al 10 % 6 mm de diámetro; que contrastados mediante el análisis estadístico de la prueba U de Mann – Whitney, mostró valores significativos ( $p < 0,05$ ). Por lo que se concluyó que el aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano” tiene efecto antibacteriano in vitro inferior a claritromicina frente a las cepas de *Helicobacter pylori*.

**Palabras Claves:** Efecto antibacteriano in vitro, *Origanum vulgare* L. “orégano”, claritromicina, *Helicobacter pylori*.

## ABSTRACT

The main objective of this research was to compare the in vitro antibacterial effect of the essential oil of the leaves of *Origanum vulgare* L. “oregano” with clarithromycin in strains of *Helicobacter pylori*. The strains were obtained from gastric biopsies of patients from Hospital II EsSalud - Cajamarca, coded as: M - 019, M - 020, M - 021, M - 025 and M - 030. The essential oil was obtained by the method of steam distillation. The in vitro antibacterial effect was determined using the Kirby Bauer method, with 15 µg clarithromycin antibiotic sensitivity discs as a positive control group and paper discs embedded with 100 %, 50 % and 10 % oregano essential oil as groups problem. The results showed halos of average inhibition for clarithromycin of 28,8 mm; for the 100 % essential oil of 15,7 mm; 50 % 8,7 mm and 10 % 6 mm in diameter; that contrasted through the statistical analysis of the Mann - Whitney U test, showed significant values ( $p < 0,05$ ). Therefore, it was concluded that the essential oil of *Origanum vulgare* L. “oregano” has an in vitro antibacterial effect inferior to clarithromycin compared to the strains of *Helicobacter pylori*.

**Key words:** In vitro antibacterial effect, *Origanum vulgare* L. “oregano”, clarithromycin, *Helicobacter pylori*.

## ÍNDICE

<b>PRESENTACIÓN</b> .....	IV
<b>JURADO EVALUADOR</b> .....	V
<b>DEDICATORIA</b> .....	VI
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	VIII
<b>RESUMEN</b> .....	IX
<b>ABSTRACT</b> .....	X
<b>ÍNDICE</b> .....	XI
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	XIII
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	XV
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	XVII
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	XVIII
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	01
<b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....	05
2.1. Antecedentes teóricos de la investigación .....	05
2.2. Bases teóricas .....	08
2.3. Definición de términos básicos .....	43
<b>III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	45
3.1. Unidad de análisis, universo y muestra .....	45
3.2. Métodos de investigación .....	47
3.3. Técnicas de investigación .....	49

3.4. Instrumentos, equipos, materiales y reactivos .....	62
3.5. Técnicas de análisis de datos .....	64
3.6. Aspectos éticos de la investigación .....	64
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>66</b>
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>72</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>77</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>78</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>90</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla N° 01:</b> Halos de inhibición de claritromicina y del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> L. “orégano” al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de <i>Helicobacter pylori</i> código M – 019 .....	66
<b>Tabla N° 02:</b> Halos de inhibición de claritromicina y del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> L. “orégano” al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de <i>Helicobacter pylori</i> código M – 020 .....	67
<b>Tabla N° 03:</b> Halos de inhibición de claritromicina y del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> L. “orégano” al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de <i>Helicobacter pylori</i> código M – 021 .....	68
<b>Tabla N° 04:</b> Halos de inhibición de claritromicina y del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> L. “orégano” al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de <i>Helicobacter pylori</i> código M – 025 .....	69
<b>Tabla N° 05:</b> Halos de inhibición de claritromicina y del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> L. “orégano” al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de <i>Helicobacter pylori</i> código M – 030 .....	70
<b>Tabla N° 06:</b> Halos de inhibición promedio de claritromicina y del	

aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> L. “orégano” al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de <i>Helicobacter pylori</i> código M: 019, 020, 021, 025, 030 .....	71
---	----

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico N° 01:</b> Halos de inhibición de claritromicina y del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> L. “orégano” al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de <i>Helicobacter pylori</i> código M – 019 .....	66
<b>Gráfico N° 02:</b> Halos de inhibición de claritromicina y del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> L. “orégano” al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de <i>Helicobacter pylori</i> código M – 020 .....	67
<b>Gráfico N° 03:</b> Halos de inhibición de claritromicina y del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> L. “orégano” al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de <i>Helicobacter pylori</i> código M – 021 .....	68
<b>Gráfico N° 04:</b> Halos de inhibición de claritromicina y del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> L. “orégano” al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de <i>Helicobacter pylori</i> código M – 025 .....	69
<b>Gráfico N° 05:</b> Halos de inhibición de claritromicina y del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> L. “orégano” al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de <i>Helicobacter pylori</i> código M – 030 .....	70
<b>Gráfico N° 06:</b> Halos de inhibición promedio de claritromicina y del	

aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> L. “orégano” al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de <i>Helicobacter pylori</i> código M: 019, 020, 021, 025, 030 .....	71
---	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura N° 01:</b> Morfología estructural y virulencia de <i>Helicobacter pylori</i> .....	13
<b>Figura N° 02:</b> Infección por <i>Helicobacter pylori</i> .....	17
<b>Figura N° 03:</b> Principales mecanismos moleculares que induce la citotóxica vacuolizante ( <i>vacA</i> ) .....	18
<b>Figura N° 04:</b> Regulación fisiológica y farmacológica de la secreción gástrica .....	31
<b>Figura N° 05:</b> Mecanismo de los betalactámicos, claritromicina y tetraciclina .....	33
<b>Figura N° 06:</b> Mecanismo de acción de los antibióticos .....	35
<b>Figura N° 07:</b> Estructura química del carvacrol .....	41
<b>Figura N° 08:</b> Estructura química del timol .....	42
<b>Figura N° 09:</b> Reacción de la prueba oxidasa .....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- ARN:** Ácido ribonucleico.
- ARNr:** Ácido ribonucleico ribosómico.
- BabA:** Adhesión de unión al antígeno sanguíneo A.
- CagA:** Citotoxina asociado al gen A.
- CIM:** Concentración inhibitoria mínima
- CG-EM:** Cromatografía de gases - espectrofotometría de masa.
- Hp:** *Helicobacter pylori*.
- HpaA:** *Helicobacter pylori* adhesin A.
- IgG:** Inmunoglobulina G.
- IL-4:** Interleucina cuatro.
- INC:** Instituto Nacional de Cáncer.
- LPS:** Lipopolisacárido.
- OipA:** Proteína inflamatoria de la membrana externa A.
- RCP:** Reacción en cadena de la polimerasa.
- FNT $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa.
- UFC:** Unidad formadora de colonias.
- VacA:** Vacualizante antigénica citotóxica A.

## I. INTRODUCCIÓN

Se calcula que la infección por *Helicobacter pylori* afecta a la mitad de la población mundial, siendo la mayor prevalencia en países en desarrollo, llegando a cifras hasta el 90 %, relacionada a niveles socio económicos bajos, adquiriéndose a edades más tempranas en comparación con los países desarrollados, Todos los sujetos que presentan *Helicobacter pylori* desarrollan gastritis, presentando úlcera péptica de 15 a 20 % y adenocarcinoma gástrico en 1 %. La infección de este tipo de bacteria se puede dar a través de alimentos que no se lavaron o prepararon adecuadamente, o por ingerir agua contaminada.<sup>29,39</sup>

*Helicobacter pylori* es una bacteria en forma de espiral que crece en la capa mucosa que recubre el interior del estómago humano y para sobrevivir en este medio hostil ácido del estómago, secreta una enzima llamada ureasa, la cual convierte la úrea química en amoniaco. La producción de amoniaco alrededor del *Helicobacter pylori* neutraliza la acidez del estómago, para hacerlo más acogedor para la bacteria. Además, la forma espiral de esta bacteria le permite penetrar la capa mucosa, la cual es menos ácida, también puede adherirse a las células que revisten la superficie interna del estómago.<sup>2,5</sup>

En 1994, la Oficina Internacional de Investigación de Cáncer, clasificó a la bacteria *Helicobacter pylori* como carcinógena, o causante de cáncer en los humanos, a pesar de resultados contradictorios en aquel tiempo. Desde entonces, la colonización de este tipo de bacteria es la causa importante del cáncer de estómago

y del linfoma gástrico del tejido linfoide; asociadas además y con un riesgo menor de adenocarcinoma esofágico.<sup>6,8</sup>

El *Helicobacter pylori* habita generalmente dentro de la mucosa gástrica, anclado a las células epiteliales, puesto que la gran mayoría de los microorganismos permanecen en un estado no replicativo (pero viable), que convierte a la bacteria en fenotípicamente resistente, dado que se reduce la capacidad de los antibióticos, especialmente la amoxicilina y claritromicina. Este estado fenotípicamente resistente es mucho más frecuente cuando el pH de la cámara gástrica oscila entre 3 a 6, mientras que sí el pH gástrico aumenta de 6 a 7, la bacteria entra en un estado replicativo, donde se hace más susceptible a la amoxicilina y claritromicina. Así que, cuando más potente sea la supresión ácida, mayor será la capacidad de éxito del tratamiento antibiótico.<sup>40,45</sup>

La creciente tasa de resistencia de *Helicobacter pylori* a antibióticos, especialmente claritromicina, metronidazol y levofloxacino, es la causa más frecuente de la falla del tratamiento. El escenario ideal, sería conocer de antemano la susceptibilidad a antibióticos del microorganismo mediante cultivo in vitro, para diseñar un tratamiento adecuado. Tal y como se ha mencionado anteriormente, puesto que en realidad la mayoría de los tratamientos se prescriben, sin hacerse un cultivo in vitro; por lo tanto, esta elección se debe hacer teniendo en cuenta variables dependientes de la bacteria y del individuo. Por lo que, se deberían conocer las tasas de resistencia a antibióticos y en caso de desconocerlas, hacer una estimación de las mismas según la eficacia de los tratamientos utilizados. La historia previa de consumo de

antibióticos del paciente es esencial para poder predecir el fallo de tratamientos de primera línea que contienen claritromicina y levofloxacino. Se debe interrogar al paciente acerca de tratamientos previos con macrólidos.<sup>36,41</sup>

Desde los hallazgos y previa identificación de *Helicobacter pylori* en la mucosa gástrica y los conocimientos sobre este tipo de infección que ha evolucionado notablemente, se acepta su rol dentro de la patología úlcera péptica gastroduodenal y el adenocarcinoma gástrico. En la actualidad, numerosas terapias a base de antibióticos están disponibles; sin embargo, estas terapias tienen varios problemas, incluyendo la aparición de resistencia antibiótica, aparición de efectos adversos, riesgo de reinfección y el alto costo de dicho tratamiento. Razón por la que, se decidió realizar este trabajo de investigación teniendo como objetivo principal comparar el efecto antibacteriano del aceite esencial extraído de las hojas de orégano con claritromicina frente a las cepas de *Helicobacter pylori*, con la finalidad de dejar en evidencia una alternativa natural terapéutica, contra este tipo de bacteria.

Por lo que se formuló el siguiente problema de investigación:

**¿Tendrá mayor efecto antibacteriano in vitro el aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano” en comparación con la claritromicina en cepas de *Helicobacter pylori*?**

Planteándose los siguientes objetivos:

- **Objetivo general:**

Comparar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano” con claritromicina en cepas de *Helicobacter pylori*.

- **Objetivos específicos:**

- Identificar y aislar las cepas de *Helicobacter pylori* de las biopsias obtenidas de los pacientes hospitalizados en el Hospital II EsSalud, de la ciudad de Cajamarca.
- Determinar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano” a las concentraciones de 100 %, 50 % y 10 % frente a las cepas de *Helicobacter pylori*
- Comparar si la claritromicina tiene mayor efecto antibacteriano que el aceite esencial de *Origanum vulgare* “orégano” al 100 %, 50 % y 10 % en cepas de *Helicobacter pylori* in vitro.

Con el propósito de dar respuesta a los objetivos planteados se formuló la siguiente hipótesis:

El aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano” tiene mayor efecto antibacteriano in vitro frente a las cepas de *Helicobacter pylori* en comparación con la claritromicina.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes teóricos de la investigación

**Zea D y Bayona M (2017)**<sup>46</sup> hicieron una investigación sobre la “Actividad antimicrobiana de productos naturales contra *Helicobacter pylori*”. Este trabajo resumió y analizó los estudios recientes más relevantes de plantas con actividad antibacteriana. Los resultados mostraron que existe varias especies medicinales con actividad antibacteriana contra el *Helicobacter pylori*, destacándose entre ellas, al orégano, ajo, jengibre, brócoli, arándolos y té verde; llegando a concluir, de dichas especies medicinales son eficaces para el tratamiento de la ulcera gástrica y duodenal.

**Harmati M et al (2016)**<sup>27</sup> estudiaron la “Mezcla binaria de aceites esenciales de *Satureja hortensis* y *Origanum vulgare*, eficacia terapéutica in vivo contra la infección por *Helicobacter pylori*”, los ensayos los realizaron en ratones a los cuales se les indujo úlcera gástrica, para luego administrarles la combinación de los aceites esenciales de *Satureja hortensis* y *Origanum vulgare*. Los resultados mostraron que la mezcla binaria de dichos aceites esenciales fue eficaz para reducir la colonización por *Helicobacter pylori*, sugiriéndose que esta mezcla de aceites esenciales tiene un gran potencial como agente terapéutico nuevo, eficaz y seguro contra *Helicobacter pylori*.

Por su parte, **Lesjak M et al (2016)**<sup>31</sup> hicieron una investigación de la “Mezclas binarias y terciarias de *Satureja hortensis* y *Origanum vulgare*, aceites

esenciales como potentes agentes antimicrobianos contra *Helicobacter pylori*. El propósito de este estudio fue desarrollar un potente producto natural contra *Helicobacter pylori*, para lo que extrajeron el aceite esencial de 9 especies, después de lo cual los más activos se mezclaron en diversas proporciones para encontrar la actividad antimicrobiana notablemente mayor. El más activo fue la mezcla de *Satureja hortensis* y *Origanum vulgare*, ya que ambos aceites se caracterizaron por presentar un alto contenido de fenoles (48-73%), con carvacrol como el principal transportador de actividad antimicrobiana.

De otro lado, **Brdanin S et al (2015)**<sup>10</sup> realizaron un trabajo de investigación sobre la “Actividad antimicrobiana de orégano (*Origanum vulgare* L.) y extractos de albahaca (*Ocimum basilicum* L.)”, en la que mencionan que el orégano y albahaca son especias muy comunes en toda dieta diaria y que podrían ser importantes tanto en la prevención y tratamiento de muchas enfermedades, incluida la infección bacteriana. Como fuente rica en compuestos fenólicos y otros compuestos secundarios con actividad antimicrobiana, podrían estar sujeto a un rol preventivo adicional en la infección por *Helicobacter pylori* in vivo.

Asimismo, **Carhuapoma M (2007)**<sup>14</sup> determinó la “Composición química, actividad anti-*Helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling (urqu muña)”. La *Satureja brevicalyx*, es una especie medicinal utilizada para tratar problemas gastrointestinales, como la gastritis. El aceite esencial de esta especie reportó compuestos como: la

pulegona (27,2%), linalol (20,3%), mentona (11,1%), isomentona (8,3%), cis-isopulegona (2,7%), trans-isopulegona (0,9%), carvacrol (0,6%), timol (0,6%), alfa-terpineol (0,5%), entre otros; relacionando su actividad antibacteriana frente *Helicobacter pylori*, a sus principios activos, entre ellos al carvacrol y timol; así como a su actividad antioxidante.

**Chun S, Vатtem D, Lin Y (2005)<sup>18</sup>** en su estudio sobre “Antioxidantes fenólicos del orégano clonal (*Origanum vulgare*) con actividad antimicrobiana contra *Helicobacter pylori*”, demostraron que los metabolitos fenólicos del orégano tienen efectos beneficiosos sobre la salud humana, incluida la inhibición de la mutagénesis y la carcinogénesis. Además, algunos componentes fenólicos han demostrado tener actividad antimicrobiana contra *Helicobacter pylori* asociada a úlcera péptica y actividad antifúngica.

**Lin Y et al (2005)<sup>34</sup>** realizaron un estudio sobre “Inhibición de *Helicobacter pylori* y la ureasa asociada por el orégano y las sinergias fotoquímicas de arándano”, ensayaron un tratamiento combinado de una mezcla de extracto de orégano y arándano en la inhibición de *Helicobacter pylori* en placa, mostrando inhibición específica de la ureasa en ensayos de placa y caldo. Los efectos sinérgicos de las combinaciones de extractos de plantas proporcionan una amplia gama de diversidad fenólica, lo que aumenta significativamente la eficacia antimicrobiana. Dichos perfiles fenólicos también tienen el beneficio adicional de mejorar el tejido del huésped y las respuestas celulares a través de la actividad enzimática antioxidante potenciada.<sup>35</sup>

**Albado E et al (2001)**<sup>3</sup> investigaron la “Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano)”. El aceite esencial lo obtuvieron por destilación por arrastre con vapor de agua, a partir de las hojas y flores desecadas de orégano. Los resultados mostraron que el orégano tiene un contenido de 9% de carvacrol, 12,19 % de terpineol, 6,86 % de p-cimeno y otros compuestos; asimismo tiene actividad antibacteriana contra las bacterias Gram negativas: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella cholerae suis* y *Vibrio cholerae*; y bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*.

## 2.2. Bases teóricas

### 2.1.1. *Helicobacter pylori*

#### a) Historia

La mayor parte de infecciones bacterianas del hombre se descubrieron a comienzos del siglo XX, el *Helicobacter pylori* se retrasó hasta los años ochenta, cuando en el año 1981 Marchall B y Warren J hacían un estudio prospectivo en pacientes que acudían a consulta para ser sometidos a endoscopia oral, descubrieron este tipo de bacteria y seguramente ellos no eran conscientes de la revolución que iban a originar en el mundo de la medicina. Hasta la fecha si a alguien se le hubiera ocurrido decir que las úlceras gastroduodenales podían ser curadas con antibióticos, les habrían tildado de locos.<sup>9,14</sup>

Independientemente, ambos investigadores fueron premiados, ya que Warren fue el primero en ver dichas bacterias el 11 de junio de 1979, lo cual comentó diciendo: “estaba yo realizando los mismos trabajos de siempre de examinar las preparaciones para el estudio microscópico de las biopsias gástricas, en una preparación de la mucosa gástrica con gastritis crónica activa, vi una línea azul en la superficie del epitelio gástrico y utilizando una mayor ampliación vi claramente que muchos bacilos pequeños formaban la línea azul y se adherían firmemente a la superficie del epitelio. Confirmé mi sospecha con un lente de inmersión”. Por su parte, Warren J tenía una mente lógica y era un experto en tinción histológica. Para identificar los componentes de la mencionada “línea azul” probó las tinciones de Gram y Warthin-Starry (con preparaciones de plata). Usando ambas manchas, particularmente la última, logró teñir y diferenciar las bacterias de las células epiteliales. También examinó las secciones más delgadas de la mucosa bajo un microscopio electrónico, y vio a las bacterias adherirse firmemente a la superficie del epitelio.<sup>15,45</sup>

Al reunirse Marshall, Warren y Goodwin, comprobaron, que el hecho de observar bacterias curvadas en secciones histológicas de biopsias gástricas de pacientes con gastritis era algo nuevo. Lo que si marcaría un hito en la historia de la microbiología que por primera vez y tras varios intentos fallidos lograron cultivar la bacteria helicoidal de biopsias del antro gástrico siguiendo la metodología descrita por

Skirrow para el aislamiento del *Campylobacter spp.* Pero en vez de incubar las placas las 48 horas se hicieron por 7 días incubándose al coincidir con el periodo de semana santa. En un principio Marshall sugiere que podrían pertenecer al género *Spirillum* proponiendo posteriormente el nombre formal de *Campylobacter pyloridis* siendo revisado en 1987 para adaptarse a las formas gramaticales latinas correctas y apareciendo en las publicaciones científicas como *Campylobacter pylori*. En 1989 se adoptó la nueva denominación de *Helicobacter*, pasando a denominarse *Helicobacter pylori*.<sup>2,40</sup>

#### b) Clasificación científica<sup>9</sup>

Reino	: Bacteria.
Clase	: Proteobacteria.
Orden	: Campylobacterales.
Familia	: Spirillaceae.
Género	: <i>Helicobacter</i> .
Especie	: <i>Helicobacter pylori</i> .

#### c) Morfología y estructura bacteriana

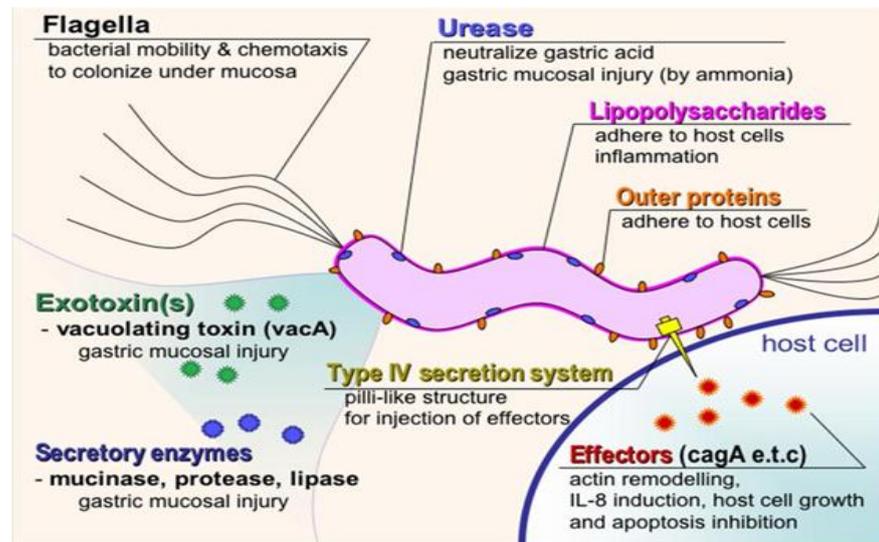
*Helicobacter pylori* es un bacilo Gram negativo, curvado y microaerofílico que se encuentra infectando la mucosa gástrica del estómago de los pacientes con gastritis y úlceras gástricas, tiene una morfología espiral en forma de sacacorchos cuando se encuentra en la mucosa gástrica y menos espiral cuando crece en medios artificiales,

esta forma se puede perder en los cultivos más viejos o sometidos a situaciones poco favorables para su crecimiento adoptando forma cocoide. Tiene un tamaño de 0,5 a 1,0 micra de ancho por 3 micras de largo, formando de 2 a 6 flagelos monopolares fundamentales para su movilidad, y están recubiertos por una vaina de estructura lipídica, al igual que la membrana externa, que parece tener la misión de proteger a los flagelos de su degradación del medio ácido.<sup>16,17</sup>

*Helicobacter pylori* es también un microorganismo polimórfico que posee una estructura cocoide (denominado estructura de resistencia o latencia) y se puede observar su morfología en cultivos viejos o de larga data (mayor a siete días) (estado no viable para el cultivo). Ambas pueden descubrirse en el estómago y el duodeno. La forma cocoide no se adhiere a las células epiteliales y tampoco es capaz de inhibir la producción de interleucina – 8, esta bacteria secreta proteínas con efectos quimiotácticos, es decir captan a los macrófagos y neutrófilos los que producen inflamación en la zona afectada. Su característica bioquímica más sobresaliente es la abundante producción de la enzima ureasa, que cataliza la úrea en amonio y dióxido de carbono, lo que permite la formación de amonio que es un mecanismo muy importante para la sobrevivencia de la bacteria en un pH tan ácido como el jugo gástrico. Únicamente ha sido identificado parte del mecanismo mediante el cual la bacteria es capaz de sobrevivir en el medio ácido del estómago, cuando el medio externo

es excesivamente ácido, los cuales se incrementan 300 veces la cantidad de la urea que entra al citoplasma de la bacteria y ello resulta en la suficiente producción de amonio para neutralizar el periplasma.

La bacteria produce varios factores solubles, la toxina vacuolizante A (Vac A) que produce la formación de vacuolas en las células gastrointestinales, la proteína codificada por el gen asociado con la citotoxina A (proteína Cag A) que al igual que la Vac A, está fuertemente asociada con el desarrollo de las úlceras y la catalasa que permite a la bacteria resistir el ataque de las células inflamatorias del hospedero. La proteína como la catalasa, es producida por la bacteria y es absorbida por el epitelio gastrointestinal, lo que desencadena un grupo de señales proinflamatorias con el reclutamiento y activación de las células inflamatorias.<sup>16,41</sup>



**Figura N° 01: Morfología estructural y virulencia de *Helicobacter pylori***

**Fuente:** Rivas F, Hernández F. *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. Rev Biomed. [Revista virtual]. 2000; 11 (3):187 - 205.<sup>41</sup>

#### d) Epidemiología

*Helicobacter pylori* es una bacteria que afecta alrededor de 50 % de la población mundial, con cifras de prevalencia de 80 a 90% en África y Latinoamérica y 25 a 40 % en Europa y Estados Unidos. El cáncer es una de las principales causas de morbilidad en el mundo, pues se estima que el número de nuevos casos aumente en un 70 % en los próximos 20 años. En el 2015, ocasionó 8,8 millones de defunciones, siendo los cinco tipos de cáncer que causan un mayor número de fallecimientos, el pulmonar (1,69 millones de defunciones), hepático (788 000 defunciones), colorrectal (774 000 defunciones), gástrico (754 000 defunciones) y mamario (571 000 defunciones).<sup>14,15</sup>

Cerca del 15 % de los casos de cáncer diagnosticados en 2012 se atribuyeron a infecciones, especialmente las causadas por *Helicobacter pylori*, los papilomavirus humanos, los virus de la hepatitis B y de la hepatitis C y el virus de Epstein – Barr. Según el Programa de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales (SEER) del INC (Instituto Nacional del Cáncer), se calculaba que, en 2013, 21 600 individuos de los Estados Unidos fueron diagnosticados con cáncer gástrico.<sup>17,38</sup>

En el Perú, en los últimos 20 años, la tasa de prevalencia de la infección en la población de bajo nivel socioeconómico ha permanecido invariable; mientras que en los estratos socioeconómicos medio y alto se ha observado una disminución sostenida (de 80 % a 45 %). El Instituto Nacional de Estadística e Informática en su publicación de enfermedades transmisibles y no transmisibles en el Perú, 2016; refiere que la mayor parte de las neoplasias están asociadas a hábitos de vida poco saludables como el consumo excesivo de tabaco y alcohol, consumo exagerado de grasas y poco consumo de vegetales. Asimismo, están asociadas a agentes infecciosos como el virus del papiloma humano (VPH) y el *Helicobacter pylori*. Siendo en el Perú los tipos de cáncer más frecuentes el de cérvix, estómago, mama, piel y próstata.<sup>39,40</sup>

Según la Dirección Regional de Salud, en el boletín epidemiológico de la semana epidemiológica veinte, informa que durante el mes de enero a febrero del 2017 se ha reportado 26 casos de cáncer en el ámbito de la región Cajamarca con diagnóstico confirmado por laboratorio, siendo los casos de cáncer de estómago (29,4 %), cuello del útero (32,4 %) y Piel (17,6 %) los que se presentan con mayor incidencia.<sup>39,45</sup>

#### e) **Patogenia y fisiopatología**

El primer paso de la infección producida por *Helicobacter pylori* es la colonización, proceso que dura una semana, para lo cual dicha bacteria resiste el ambiente ácido local, atraviesa la capa mucosa, se adhiere a los receptores de las células epiteliales y se adapta a la hostilidad del medio.<sup>9</sup>

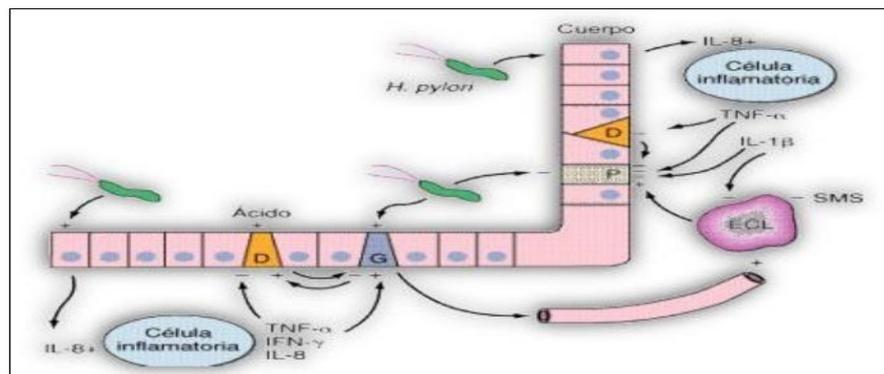
Su supervivencia se lleva a cabo por una serie de mecanismos que incluyen: adhesinas, la actividad ciliar o el recambio epitelial; enzimas bacterianas como la ureasa, lipasa, proteasa, catalasa y superóxido dismutasa. Una vez producida la colonización, *Helicobacter pylori* evita la reacción inmune local del huésped, debido a la presencia de la IgA secretora; esto se suma al hecho de que el lipopolisacárido de su membrana difiere de la mayoría de las Gram negativas, tiene bajo poder inmunogénico y escasa actividad biológica, lo que no permite que el huésped genere una respuesta defensiva. La adherencia de la

mucosa antral por *Helicobacter pylori* produce una reacción inflamatoria aguda con el consiguiente daño en las células epiteliales.<sup>9,41</sup>

Los productos quimiotácticos se liberan desde la bacteria, mientras las células epiteliales producen interleucina - 8 y se genera una activación local de polimorfonucleares. Esta respuesta se ve potenciada por otros factores del huésped, como las citoquinas proinflamatorias IL -1 y TNF alfa, con la posterior producción de enzimas proteolíticas y radicales libres de oxígeno por parte de los neutrófilos. La reacción inflamatoria daña el epitelio y las células adoptan una forma cuboidea, con pérdida de la continuidad de las uniones estrechas intercelulares y se conforman los cambios típicos de una gastritis aguda antral, este proceso dura dos semanas. En la medida que la respuesta inflamatoria aguda se va atenuando, comienzan a llegar los linfocitos y monocitos y se inicia en esta forma una reacción inflamatoria crónica, puesto que la respuesta humoral por medio de la formación de anticuerpos es incapaz de eliminar la bacteria y esto explicaría que no haya erradicación espontánea de *Helicobacter pylori*.<sup>9,14</sup>

La infección crónica de *Helicobacter pylori* lleva a un incremento de la secreción basal y post estimulación del ácido gástrico, por un aumento de la gastrina, la que ejerce una acción trófica sobre las células parietales y una mayor liberación de histamina desde las

células enterocromafines. Normalmente, la secreción gástrica está controlada por un inhibidor de la gastrina, que es la somatostatina. En pacientes con infección por *Helicobacter pylori*, la concentración de somatostatina está disminuida.<sup>16,17</sup>



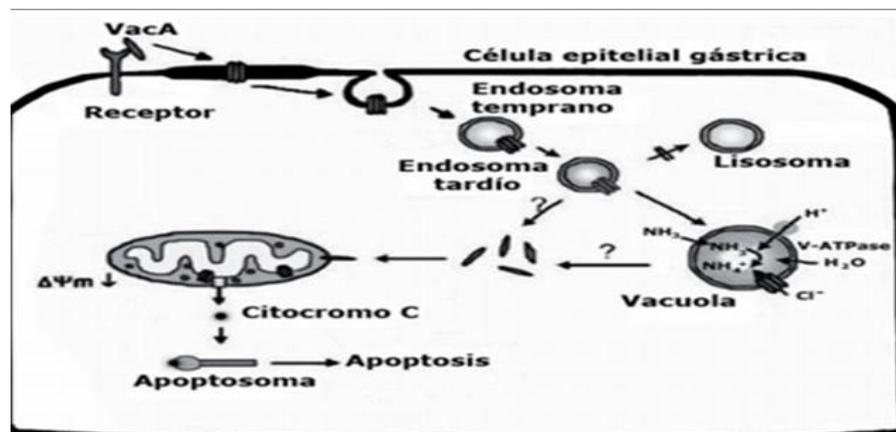
**Figura N° 02: Infección por *Helicobacter pylori***

**Fuente:** Chávez M. Análisis de la prueba inmunológica para la detección de *Helicobacter pylori* en pacientes de 20 a 40 años del Hospital Provincial General Docente Riobamba noviembre 2013 – enero 2014. [Tesis para optar el Título Profesional de Bioquímico Farmacéutico]. Ecuador: Escuela superior politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias; 2014.<sup>16</sup>

#### f) Factores de patogenicidad que contribuyen a la colonización de la mucosa gástrica

- **Ureasa:** la ureasa es la enzima más abundante producida por *Helicobacter pylori* y su actividad depende del pH alrededor de la bacteria. El hábitat natural de *Helicobacter pylori* se encuentra por debajo de la capa mucosa, donde el pH se aproxima a la neutralidad. El mecanismo que utiliza para protegerse de ese pH ácido durante la colonización o de las bajadas de pH, se basa en acumular una gran cantidad de ureasa en el citoplasma, en el espacio periplásmico y en la superficie de la bacteria. La ureasa es

una metaloenzima que cataliza la hidrólisis de la úrea presente en el estómago en amonio y dióxido de carbono. El amonio producido aumenta el pH, elevándolo hasta 6 ó 7 en su entorno. La regulación se produce mediante un transportador dependiente de pH (Ure I), que permite la entrada de úrea, pero una vez que el pH alcanza el valor de 6 - 7, se inactiva. El amoniaco liberado va a producir una serie de daños que afectan a la microcirculación y a las células epiteliales superficiales. La ureasa actúa como factor quimotáctico, activando a los macrófagos a producir citocinas proinflamatorias. Por otro lado, se han establecido nexos entre la acción de la toxina VacA y la ureasa, puesto que la actividad de la citotoxina VacA se incrementa en presencia de elevadas concentraciones de cloruro de amonio.<sup>2,5</sup>



**Figura N° 03: Principales mecanismos moleculares que induce la citotoxina vacuolizante (vacA)**

**Fuente:** Torres L, Rodríguez B. Principales factores de patogenia en la infección por *Helicobacter pylori*. Revista CENIC Ciencias Biológicas. [Revista virtual]. 2008; 39 (1): 52 – 62.<sup>44</sup>

- **Sistemas oxidantes:** *Helicobacter pylori* es una bacteria microaerofílica vulnerable a la toxicidad del oxígeno. Durante el proceso de colonización *Helicobacter pylori* promueve una fuerte respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos y macrófagos, que generan una cantidad de metabolitos reactivos del oxígeno. *Helicobacter pylori* cuenta con mecanismos para la detoxificación de estos metabolitos, así como para la reparación de los daños sufridos que favorecen su supervivencia en el tejido inflamado. Entre los sistemas enzimáticos de detoxificación de los metabolitos reactivos del oxígeno están la enzima superóxido dismutasa, que cataliza la transformación del superóxido en peróxido de hidrógeno; la catalasa o peroxidasa, que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno; las peroxirredoxinas, que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno, peroxinitrito y otros hidroperóxidos orgánicos a sus correspondientes alcoholes.<sup>2,15</sup>
- **Flagelos:** La gran movilidad de estas bacterias es fundamental para colonizar la mucosa gástrica. *Helicobacter pylori* posee alrededor de 2 a 6 flagelos monopolares, característica inusual que es distinta del resto de proteínas flagelares, las cuales son homopoliméricas. Cada flagelo está compuesto por dos flagelinas, FlaA y FlaB. La FlaB se localiza en la base del flagelo, mientras que la más

abundante FlaA, se encuentra en el exterior. La flagelina FlaA es esencial para la motilidad de la bacteria.<sup>8,9</sup>

- **Adhesinas:** Para la colonización por la bacteria debe presentarse primero una adhesión al epitelio gástrico, lo cual se efectúa mediante hemaglutininas (varias adhesinas) que son proteínas glicoconjugadas o por lípidos bacterianos involucrados en el proceso de colonización. Las adhesinas que se mencionan por unos u otros autores y con frecuencia son: BabA, SabA, OMP'S, Hopo, AlpA, AlpB, Hpa; la adhesina que más ha sido estudiada y caracterizada es la BabA. Las adhesinas bacterianas al acoplarse a los receptores de las células del hospedero inducen cambios inmediatos mediante señales de transducción, permitiendo la infiltración de células inflamatorias, pero también estableciendo mecanismos para evadir la respuesta inmune y establecer como infección persistente.<sup>8,15</sup>

**HpaA (*Helicobacter pylori* adhesin A):** La proteína HpaA es una de las principales proteínas de la membrana externa de *Helicobacter pylori*, media la unión a glicoconjugados con ácido siálico presentes en la superficie de las células epiteliales gástricas y en la de los neutrófilos.<sup>8,9</sup>

**BabA (blood antigen binding adhesion):** *Helicobacter pylori* se une con la adhesina BabA a las células epiteliales gástricas a través de los antígenos de Lewis. La unión de *Helicobacter pylori* al receptor gástrico de Lewis promueve una respuesta inmune no específica y el desarrollo de autoanticuerpos frente a las células productoras de ácido, lo que contribuye a la gastritis crónica y a la pérdida de células parietales. Además, la adherencia mediada por BabA participa en la distribución de los factores de virulencia que dañan al tejido del hospedador, pudiendo llevar al desarrollo de úlcera y cáncer gástrico.<sup>35,38</sup>

**SabA (sialic acid binding adhesion):** Se une a los receptores con el ácido siálico de los neutrófilos y origina la activación de su respuesta oxidativa.<sup>15,16</sup>

**OipA (outer membrane inflammatory protein):** Su expresión está asociada a una mayor producción de IL - 8, aunque no se sabe cuál es su contribución real a la inflamación gástrica puesto que suele estar asociada a las cepas cagA+.<sup>15,16</sup>

**Otros factores:**

- **LPS (lipopolisacárido):** El LPS de *Helicobacter pylori* puede afectar a la integridad de la mucosa mediante la modulación de la actividad del pepsinógeno I en el estómago. La pepsina, enzima

proteolítica, posee una alta capacidad mucolítica y puede ayudar a inducir ulceración duodenal.<sup>13,16</sup>

- **Tip  $\alpha$  (TNF -  $\alpha$  inducing protein):** Las proteínas Tip  $\alpha$  tienen una potente actividad carcinogénica a través de la inducción de TNF -  $\alpha$  y la activación de NF -  $\kappa$ B. Promueven la inflamación del cáncer.<sup>13,17</sup>

#### **g) Signos y síntomas de la infección por *Helicobacter pylori***

La mayoría de los individuos infectados con *Helicobacter pylori* tienen pocos o ningún síntoma. Pueden experimentar algunos episodios de gastritis (distensión abdominal, náuseas, vómitos, malestar abdominal), a menudo estos síntomas simplemente pasan. Sin embargo, aquellas personas que tienen una afección más grave presentan síntomas de infección de estómago y úlceras duodenales o gastritis, que incluyen lo siguiente: Dolor abdominal y/o incomodidad que generalmente no aumentan ni disminuyen, náuseas y vómitos a veces con sangre, heces negras o parecidas al alquitrán (color negro de las heces debido a úlceras sangrantes), fatiga, recuento bajo de glóbulos rojos debido a la hemorragia, sensación de saciedad después de una pequeña cantidad de comida; disminución del apetito.<sup>14,15</sup>

**Clínica:** Cuando *Helicobacter pylori* coloniza la mucosa gástrica humana produce una gastritis superficial que puede permanecer así

durante el resto de la vida o bien, al cabo de años o décadas desarrollar una úlcera péptica o una gastritis atrófica que podría ser el primer paso para la evolución a cáncer gástrico. Parece que algunos factores genéticos, ambientales o los factores de patogenicidad de la propia bacteria pueden tener su efecto en el desarrollo de la enfermedad.<sup>2,9</sup>

- **Manifestaciones digestivas:**

**Gastritis:** La gastritis que se origina después de la infección por *Helicobacter pylori* puede desarrollarse sin manifestaciones o bien originar la expresión clínica propia de gastritis aguda. La gastritis crónica se caracteriza por infiltración inflamatoria crónica, constituida por linfocitos y células plasmáticas, con presencia de folículos linfoides y un grado variable de actividad. La colonización permanente de la mucosa gastroduodenal por *Helicobacter pylori* va a causar una inflamación con un infiltrado mixto en el que predominan los leucocitos polimorfonucleares, pero también con linfocitos y células plasmáticas, dando lugar a lo que se denomina gastritis crónica activa.<sup>2,45</sup>

**Úlcera péptica:** la asociación de *Helicobacter pylori* con la úlcera duodenal es clara, ya que un 90 – 95 % de los pacientes presentan el microorganismo y se curan en su gran mayoría al erradicar la bacteria. Los pacientes con úlcera pueden expresar unos síntomas compatibles con lo que se llama dispepsia ulcerosa típica de la

enfermedad ulcerosa péptica: epigastralgia o dolor en hemiabdomen superior, que disminuye con la ingesta de alimentos y antiácidos. Es un dolor discontinuo que alterna con periodos de disminución de molestias y que aumenta antes de las comidas.<sup>35,38</sup>

**Cáncer gástrico:** La infección por *Helicobacter pylori* origina una gastritis superficial y si se cronifica puede aparecer atrofia, con extensión más profunda de las células inflamatorias y atrofia de las glándulas propias antrales, que es una condición precancerosa.<sup>2,43</sup>

**Linfoma gástrico tipo MALT:** El 90 % de pacientes con linfoma MALT son positivos a *Helicobacter pylori*. Es un linfoma tipo B extranodal del tejido linfoideo asociado con la mucosa. El mecanismo más aceptado en la patogénesis del linfoma MALT es que los linfocitos B y T se reúnen en la mucosa como parte de la respuesta inmune contra *Helicobacter pylori*. Las alteraciones genéticas se mantienen hasta que se alcanza una etapa de crecimiento autónomo que culmina en la transformación de un linfoma de bajo grado en un linfoma de alto grado primario. Este tipo de linfoma se localiza preferentemente en el antro del estómago, dado que es la zona donde existe más tejido linfoide.<sup>40,44</sup>

- **Manifestaciones extradigestivas:** Se ha relacionado la infección por *Helicobacter pylori* con una variedad de manifestaciones clínicas extradigestivas.

**Anemia ferropénica refractaria:** Diversos trabajos demostraron una asociación entre la infección por *Helicobacter pylori* y la anemia ferropénica refractaria. No está claro si se trata de un incremento en las pérdidas de hierro o de una disminución de la absorción.<sup>2,6</sup>

**Púrpura trombocitopénica idiopática:** Recientemente se ha observado que algunos pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática crónica han respondido a la erradicación de *Helicobacter pylori* con un incremento del número de plaquetas. La explicación biológica de esta posible asociación es la similitud de los anticuerpos plaquetarios del suero con la citosina asociada al gen *cagA* del *Helicobacter pylori*.<sup>2,14</sup>

- **Otras manifestaciones extradigestivas:** Se ha asociado la infección por *Helicobacter pylori* con la aparición de urticarias, al encontrarse títulos elevados de anticuerpos específicos tipo IgG frente a *Helicobacter pylori*.<sup>5,6</sup>

## h) Diagnóstico

La infección por *Helicobacter pylori* puede diagnosticarse mediante métodos invasivos (que requieren la realización de endoscopia con toma de biopsia gástrica) o no invasivos (métodos para los que no se requiere realización de endoscopia).<sup>5,24</sup>

- **Métodos invasivos o directos:** La endoscopia con toma de biopsia para el estudio histológico permitirá no sólo diagnosticar la infección mediante el cultivo de dicha biopsia, sino que también el cultivo es imprescindible para poder conocer la sensibilidad a los antimicrobianos.<sup>24,35</sup>

**Histología:** La observación de microorganismos de forma espiral en los cortes histológicos de las biopsias es un método de diagnóstico sencillo de la infección por *Helicobacter pylori*. El estudio histológico de la biopsia permite conocer las lesiones de la mucosa además de detectar la infección por *Helicobacter 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.<sup>24,40</sup>

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 el examen en fresco utilizando microscopio con contraste de fases. El *Helicobacter pylori*, al microscopio óptico con tinción Gram, se caracteriza por la presencia de bacilos Gram negativos en forma curvada, con bordes redondeados o alargados, también se observan en ocasiones formas cocoides. Otras tinciones son útiles, entre ellas destacan las tinciones de Giemsa, carbolfucsina, la tinción triple de carbolfucsina/azul de Alcina/hematoxilina - eosina y tinciones de inmunohistoquímica.<sup>15,26</sup>

**Cultivo:** El aislamiento mediante cultivo de *Helicobacter pylori* es sin duda el método más específico en el diagnóstico del microorganismo. No obstante, su sensibilidad 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 dióxido de carbono y humedad, principalmente).<sup>13,26</sup>

Se considera como un método tedioso e incluso de difícil realización, pero debe efectuarse de rutina si se realiza la endoscopía ya que aporta un gran número de ventajas en el estudio de la bacteria. Para su desarrollo en medios de cultivo, *Helicobacter pylori* requiere de medios complejos ya sea sólidos o líquidos con suplementos como: sangre de caballo, hemoglobina,

siero fetal bovino, carbón vegetal o emulsión de yema, además de nutrientes como peptona, triptona, extracto de levadura, glucosa, cloruro de sodio y bisulfito de sodio. Para una buena recuperación del microorganismo se adicionan antibióticos que minimizan la colonización de otras bacterias.<sup>13,37</sup>

**PCR (reacción en cadena de la polimerasa):** Aparte del diagnóstico de la infección, permite utilizar el ADN para distintos estudios como la detección de genes específicos de la bacteria, detección de factores de virulencia y detección de mecanismos de resistencia.<sup>20,21</sup>

- **Métodos no invasivos o indirectos:** El método ideal para diagnosticar la infección sería uno no invasivo o mínimamente invasivo, capaz de diferenciar infección activa de infección pasada.<sup>26</sup>

**Serología:** Las pruebas serológicas para el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* se basan en estudiar la presencia de anticuerpos específicos frente a antígenos de este microorganismo que aparecen como consecuencia de la respuesta inmunitaria, tanto local como sistémica, que se produce tras la infección. *Helicobacter pylori* provoca una respuesta inmunitaria local y sistémica. El sistema inmune responde con un aumento

transitorio de IgM, seguido de un aumento de anticuerpos de los tipos IgG e IgA que persisten durante la infección. La principal respuesta sistémica es de tipo IgG por lo que la detección de estos anticuerpos es la más utilizada para el diagnóstico. Se han estudiado estos anticuerpos específicos utilizando diferentes antígenos de *Helicobacter pylori* y distintas técnicas serológicas: la técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA), otra técnica es Western Blot se utilizan para el estudio de la respuesta frente a antígenos concretos, como CagA y VacA.<sup>20,28</sup>

**Prueba del aliento:** Es un método indirecto que se basa en la presencia de la ureasa de *Helicobacter pylori*. El paciente ingiere una solución con úrea marcada isotópicamente con <sup>13</sup>C (no radioactivo) o <sup>14</sup>C (radioactivo) y se recoge el aliento 30 minutos después de la ingestión de la solución de úrea; previamente se habrá recogido otra muestra de aliento basal. Si *Helicobacter pylori* se encuentra en el estómago, éste hidroliza la úrea gracias a su ureasa y se libera CO<sub>2</sub> marcado (<sup>13</sup>C o <sup>14</sup>C) que se absorbe, difunde a sangre y transporta a los pulmones y es liberado con el aliento.<sup>15,25</sup>

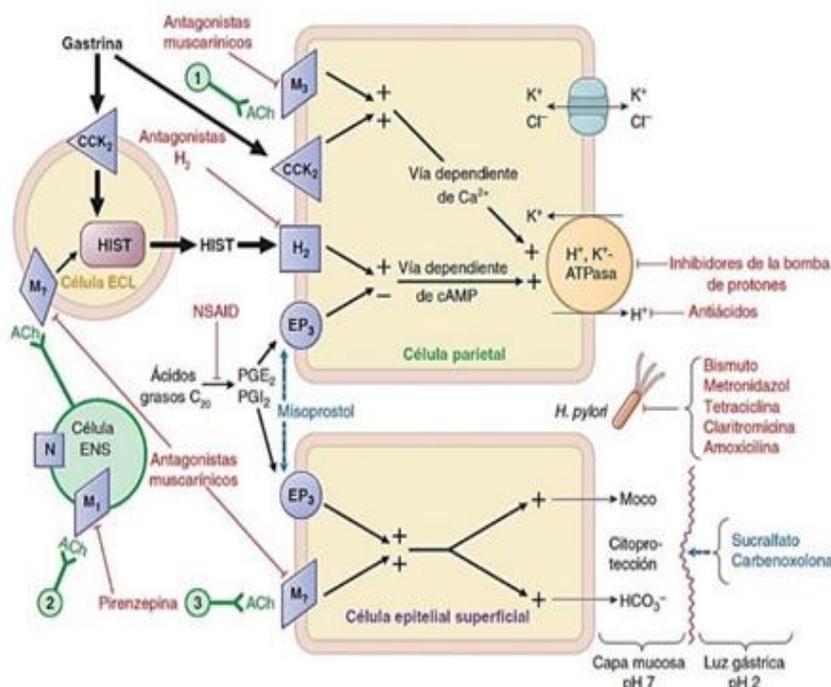
**Test de Sangre Completa:** Es un inmunoensayo que detecta anticuerpos IgG frente a *Helicobacter pylori* presentes en la sangre.<sup>26</sup>

### i) Tratamiento

Las pautas de tratamiento para erradicar *Helicobacter pylori* combinan 2 ó 3 antimicrobianos junto con un compuesto antiulceroso, que permite modificar el pH para que actúe el antibiótico. La duración de la terapia habitual ha sido de 7 a 10 días, aunque algunos autores han probado pautas cortas, de 3 a 5 días que incluyen 3 antibióticos y otros recomiendan pautas largas, de más de 10 días. Antes de iniciar una pauta de tratamiento se debe considerar el porcentaje de resistencia a los antimicrobianos en esa población o área geográfica. Se recomienda la pauta de tratamiento triple con un inhibidor de la bomba de protones y dos antimicrobianos como primera opción.<sup>211,30</sup>

**Inhibidores de la bomba de protones:** Omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, esomeprazol y rabeprazol. Actúan en la célula parietal. Inhiben de forma reversible la enzima  $H^+/K^+ - ATPasa$ , bloqueando toda secreción de ácido.<sup>11,30</sup>

**Compuestos de bismuto:** Citrato de bismuto coloidal y salicilato de bismuto, actúan como citoprotectores. Aumentan la producción de moco y prostaglandinas por la mucosa gástrica. Además, evitan la unión de *Helicobacter pylori* a la superficie de la mucosa gástrica y destruyen la integridad de la pared bacteriana. Pero se desconoce con certeza el mecanismo de acción de estos compuestos.<sup>2,11</sup>



**Figura N° 04: Regulación fisiológica y farmacológica de la secreción gástrica.**

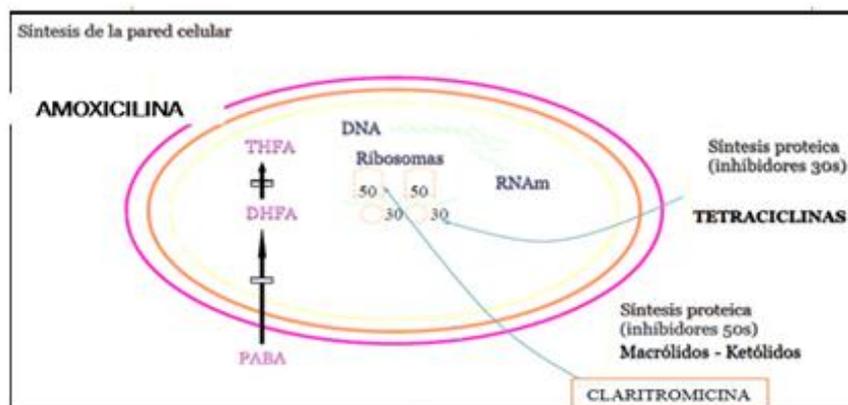
**Fuente:** Brunton L, Chabner B, Knollmann B. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2012. p 1309 - 1321.<sup>11</sup>

**Antibióticos:** *Helicobacter pylori* es sensible a un gran número de antibióticos in vitro, pero no todos presentan eficacia in vivo. Los antimicrobianos que muestran eficacia clínica y que se utilizan o se pueden utilizar en los tratamientos para erradicar la infección son los siguientes:<sup>11,30,36</sup>

- **Amoxicilina:** Entre todos los betalactámicos ensayados in vitro sólo amoxicilina ha demostrado ser útil en el tratamiento de la

infección por *Helicobacter pylori* y se utiliza en diferentes pautas de tratamiento asociado a metronidazol, tetraciclina o claritromicina. Es el betalactámico más estable en el medio ácido y el que alcanza mayores concentraciones en tejidos después de una dosis oral. Los antibióticos betalactámicos actúan inhibiendo la formación de la pared bacteriana de los microorganismos.

- **Claritromicina:** Es el macrólido más utilizado, que presenta una excelente actividad in vitro frente a *Helicobacter pylori*. El mecanismo de acción de la claritromicina interfiere en la síntesis de proteínas en las bacterias sensibles ligándose a la subunidad 50S ribosomal lo cual provoca un bloqueo en la transpeptidación, un bloqueo en la translocación y así se impide la elongación de la cadena peptídica. La claritromicina es bactericida para *Helicobacter pylori*, presente en la mucosa gástrica de la mayoría de los pacientes con úlcera duodenal o gastritis. La actividad de claritromicina frente a *Helicobacter pylori* es mayor a pH neutro que a pH ácido.



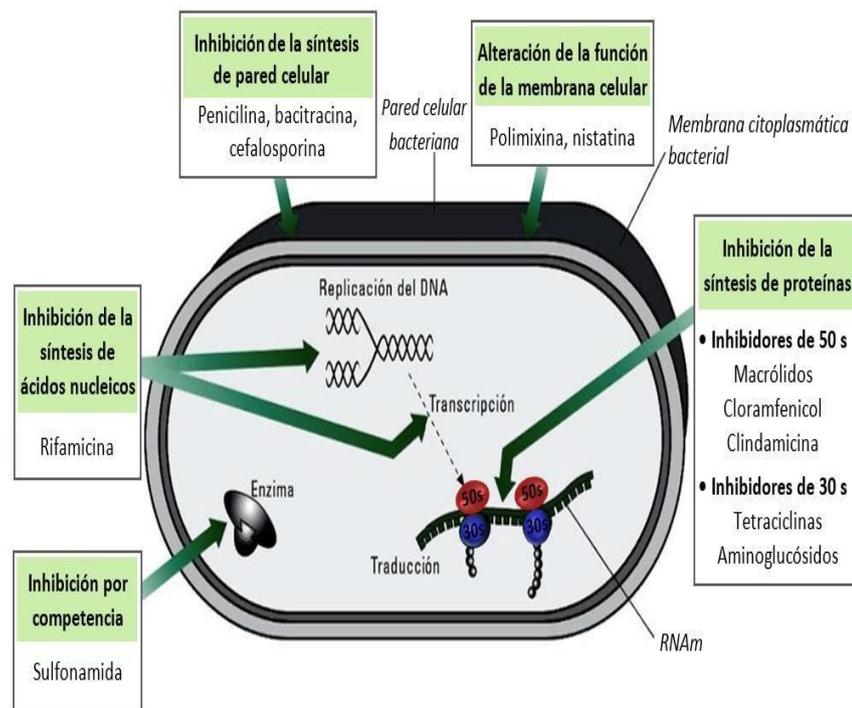
**Figura N° 05: Mecanismo de los betalactámicos, claritromicina y tetraciclina**

**Fuente:** Brunton L, Chabner B, Knollmann B. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2012. p 1309 - 1321.<sup>11</sup>

- **Metronidazol:** Es un antimicrobiano ampliamente utilizado en el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. Metronidazol y otros antibióticos nitroimidazólicos son activos después de la reducción del grupo nitro unido al anillo imidazólico. El metronidazol tras ingresar en la célula mediante difusión pasiva es químicamente reducido por proteínas del metabolismo anaerobio, estas proteínas son exclusivas de algunos parásitos y de bacterias anaerobias y algunas microaerófilas. El metronidazol reducido produce pérdida de la estructura helicoidal del ADN, rotura de la cadena e inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y muerte celular. En *Helicobacter pylori* se ha descrito un piruvato flavodoxina oxidorreductasa, que puede ser la proteína capaz de reducir el metronidazol.

- **Tetraciclina:** La tetraciclina presenta buena actividad in vitro y ha demostrado su utilidad en la práctica clínica, aunque su principal inconveniente es el no poder utilizarse en enfermos pediátricos. La tetraciclina atraviesa la membrana externa a través de porinas mediante difusión pasiva, llega al citoplasma por un mecanismo dependiente de energía y en el interior se une reversiblemente a la subunidad 30s produciendo una inhibición de la síntesis de proteínas.
- **Furazolidona:** Los nitrofuranos tienen también buena actividad frente a *Helicobacter pylori*, siendo furazolidona el más eficaz en la curación de la úlcera duodenal y en erradicar *Helicobacter pylori* de la mucosa gástrica. El mecanismo de acción es similar al del metronidazol, formación de radicales nitros aniónicos y daño del DNA.
- **Levofloxacino:** Actualmente levofloxacino se ha utilizado con éxito en la erradicación de la bacteria. Las quinolonas inhiben la replicación del DNA, actúan en el ADN cromosómico bacteriano, uniéndose a las topoisomerasas e inhibiendo su acción. Actúan sobre dos proteínas diana: ADN girasa y topoisomerasa IV (ambas son topoisomerasas responsables de los cambios en la topología del ADN). En el caso de bacterias Gram negativas, como es el caso de *Helicobacter pylori*, actúan inhibiendo la ADN girasa.

- **Rifabutina:** Es un antibiótico derivado semisintético de la rifampicina y ha demostrado tener una alta eficacia contra *Helicobacter pylori*. El mecanismo de acción consiste en la inhibición del inicio de la síntesis de ARN al inhibir la enzima ARN polimerasa.



**Figura N° 06: Mecanismo de acción de los antibióticos**

**Fuente:** Brunton L, Chabner B, Knollmann B. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2012. p 1309 - 1321.<sup>11</sup>

#### j) Resistencia antibiótica de *Helicobacter pylori*

La resistencia antibiótica es un factor clave en el fracaso de la erradicación y la recrudescencia de la infección por *Helicobacter pylori*. Las tasas de resistencia a los antibióticos están aumentando a nivel mundial; varían geográficamente y son más altas en los países en desarrollo. En el caso de la claritromicina, la resistencia fluctúa

entre el 10 % - 24 % en Europa 13 % en Estados Unidos. Las tasas de resistencia al metronidazol fluctúan alrededor de 39 % en Estados Unidos y 50 a 90 % en países en vías de desarrollo.<sup>11,36</sup>

La erradicación de *Helicobacter pylori* de la mucosa gástrica humana ha sido un reto para la comunidad científica, pues el rol de este patógeno parece cambiar su grado de virulencia, quizá por influencia epigenética aún no clara, como la presión en la bacteria producida por los antimicrobianos, permitiendo relacionar el tratamiento de la infección con el cuadro patológico. Es fundamental determinar los patrones de sensibilidad de los antibióticos más usados en una población, para controlar y resolver la infección por *Helicobacter pylori*, lo cual tiene especial trascendencia en zonas de alta prevalencia, dado que constituye una buena herramienta para disminuir las cepas resistentes de *Helicobacter pylori*, que son el principal inconveniente en la erradicación de la infección con los tratamientos de primera línea (amoxicilina más claritromicina más omeprazol).<sup>9,23</sup>

Debido a la resistencia antibiótica, todas las guías de práctica clínica actuales desaconsejan el empleo de la terapia triple clásica (inhibidor de la bomba de protones, claritromicina y amoxicilina) cuando la tasa de resistencia a claritromicina es mayor del 15 %, por lo cual el tratamiento de elección en España es una pauta cuádruple sin bismuto

concomitante, es decir, un inhibidor de la bomba de protones, amoxicilina, claritromicina y metronidazol administrados conjuntamente, donde diversos estudios llevados a cabo han demostrado una eficacia cercana o superior al 90 %.<sup>5,6</sup>

**k) Mecanismos de resistencia:**

**-Resistencia a Metronidazol:** Puede deberse a la utilización indiscriminada de los nitroimidazoles para tratar algunas infecciones parasitarias y trastornos ginecológicos, el principal mecanismo de resistencia de *Helicobacter pylori* al metronidazol se relaciona con la pérdida de la actividad enzimática necesaria para que metronidazol intracelular pueda servir como agente antimicrobiano. Esta actividad se consigue mediante la enzima nitrorreductasa, NADPH insensible al oxígeno, la cual se codifica por el gen *rdxA*. Los genes *rdxA* y *frxA* son necesarios para la activación del metronidazol y su inactivación induce resistencia.<sup>30</sup>

**-Resistencia a Claritromicina:** Se debe a la mutación en el gen 23S ARNr específicamente en la región de la activación de la peptidil - transferasa en el dominio V.<sup>30</sup>

**-Resistencia a Amoxicilina:** Se debe a la mutación de la proteína de unión a penicilinas (PBPs) 1, 2 y 3, con una mayor importancia la mutación en la PBP1.<sup>11</sup>

**-Resistencia a Levofloxacino:** Debido a la mutación en el gen gyrA. Estas mutaciones de las subunidades de la girasa parecen ser causa de un cambio de conformación suficiente de la girasa de modo que se reduce o se pierde su afinidad por las fluoroquinolonas (pérdida de afinidad a la girasa).<sup>11</sup>

### 2.2.2. *Origanum vulgare* L. “orégano”

#### a) Origen y distribución geográfica

El nombre orégano proviene de la palabra griega “Origanum” y se deriva de dos palabras, “oros” montaña y “ganos” alegría, en alusión a la apariencia festiva que le da esta planta a las laderas de las montañas donde crece. Con el nombre genérico de orégano se conoce a diversas especies de plantas pertenecientes a las familias verbenaceae, labiadas y compuestas, abarcando 170 géneros y 3000 especies. Las especies más importantes desde el punto de vista económico son: *Lippia berlandieri*, *Origanum vulgare*, y *Lippia palmeri*. Las plantas de las diferentes familias de orégano mexicano se encuentran en estado silvestre, en regiones áridas y semiáridas de, al menos 24 estados de la república. Sus principales hábitats están en suelos generalmente pedregosos de cerros, laderas y cañadas entre los 400 y 2000 metros de altitud, aunque se le halla en mayor abundancia entre los 1400 y 1800 metros de altitud.<sup>1,3</sup>

### b) Clasificación taxonómica<sup>7</sup>

División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Orden	: Lamiales
Familia	: Lamiaceae
Género	: <i>Origanum</i>
Especie	: <i>Origanum vulgare</i>

### c) Morfología de la planta

Son plantas dicotiledóneas, perennes y ramificadas, poseen un agradable sabor y son muy aromáticas, se caracterizan por poseer un sistema radicular muy ramificado y rizomas también muy ramificado, rastreros y con pequeñas raicillas. El tallo puede ser: erecto o decumbente, aristado, cuadrangular de 30 – 80 cm de altura, a veces de coloración púrpura. Las hojas son enteras, opuestas, depunculadas, levemente alargadas u ovaladas, verde azulado o verde grisáceo, de 2 – 4 cm. de longitud y 1 – 3 cm de ancho. Pueden tener el borde continuo o dentado, vellosas en los bordes y cara inferior. Las nervaduras son poco visibles y el envés es más pálido. En las hojas se encuentran tricomas glandulares secretores que producen esencias, estos pelos glandulares poseen un determinado patrón de desarrollo, que es utilizado para diferenciar sistemáticamente las distintas especies de *Origanum*. Las flores son pequeñas, hermafroditas, corola bilabiada, de color blanco violáceo, blancas, rosadas o púrpuras, se

encuentran agrupadas en inflorescencias formando glomérulos terminales.<sup>10,18</sup>

#### **d) Composición química**

El orégano contiene aceites esenciales, flavonoides (apigenina, luteolina, agliconas), alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano. También se han encontrado ácidos coumérico, ferúlico, caféico, rhidroxibenzóico y vainillínico.

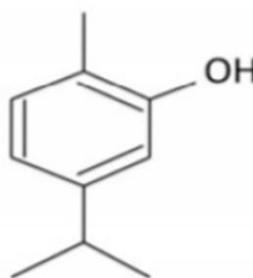
Los aceites esenciales del orégano son obtenidos a partir de diferentes partes de la planta como flores, semillas, hojas, ramas, cortezas, etc. Son mezclas complejas de líquidos que presentan alta volatilidad, evaporándose al aire libre. Estos aceites tienen dentro de sus componentes al timol y carvacrol, sustancias responsables de las propiedades terapéuticas.<sup>42,43</sup>

#### **e) Mecanismos de acción farmacológica**

Los componentes del aceite esencial del orégano son: el timol, carvacrol y eugenol, compuestos fenólicos, que poseen fuertes propiedades antimicrobianas contra diversos microorganismos.<sup>18,25</sup>

**Carvacrol.** El carvacrol (o 2-metil-5-(1-metiletil) fenol) esta presente en el aceite esencial del orégano entre 60 a 70 %. Su estructura química esta presentada por un grupo fenólico con un alto poder

hidrofóbico. De todos los agentes antimicrobianos naturales, carvacrol es uno de que más atención ha recibido en su mecanismo de acción; tienen la capacidad de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática provocando con ello la salida del ATP, inhibición de la actividad de las ATPasas y disminución de la fuerza motriz del protón.<sup>25</sup>



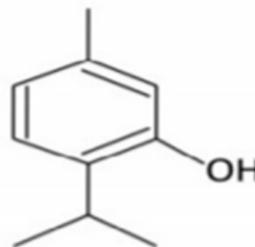
**Figura N° 07: Estructura química del carvacrol**

**Fuente:** García M, Palou E. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. Rev sobre temas selectos de Ingeniería y Alimentos. [Revista virtual]. 2008; 2 (2): 41 -51.<sup>25</sup>

**Timol.** El timol (o isopropilmetacresol, o 2-isopropil-5-metilfenol), es uno de los agentes antimicrobianos más activo de los constituyentes de los aceites esenciales. Se encuentra presente en el aceite esencial (50 %). Su estructura química es similar a la del carvacrol cambiando únicamente la posición del grupo hidroxilo.<sup>24</sup>

El mecanismo de acción del timol es semejante a la del carvacrol, ya que su estructura química es similar. El timol es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, permitiendo la

salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática.<sup>25</sup>



**Figura N° 08: Estructura química del timol**

**Fuente:** García M, Palou E. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. Rev sobre temas selectos de Ingeniería y Alimentos. [Revista virtual]. 2008; 2 (2): 41 -51.<sup>25</sup>

#### **f) Extracción del aceite esencial**

La extracción se realiza por métodos convencionales como la destilación por arrastre de vapor y el uso de solventes orgánicos, aunque actualmente se utiliza la extracción supercrítica con dióxido de carbono como solvente de acuerdo con las propiedades de este gas (sustancia no toxica, ni explosiva y fácil de remover). También se puede utilizar la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masa (CG-EM).<sup>19,42</sup>

#### **g) Propiedades**

Se considera espasmolítica, digestiva, carminativa, aperitiva, colerética, expectorante, antiséptica de las vías respiratorias, diurética, tónica. En uso externo es cicatrizante, analgésica, antiséptica y antifúngica. Además, tiene propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antioxidantes.<sup>10,18</sup>

### 2.3. Definición de términos básicos

- **Aceite esencial:** Son fracciones líquidas volátiles que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas.<sup>19</sup>
- **Cepa:** Cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento.<sup>13</sup>
- **Colonia:** Crecimiento visible bacteriano, originada por la multiplicación de una sola bacteria preexistente.<sup>13</sup>
- **Concentración inhibitoria mínima (CIM):** Concentración más débil de un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana al cabo de 18 - 24 horas de incubación.<sup>21</sup>
- **Escala de Mc. Farland:** Estándar de turbidez de sulfato de bario. La escala usada para el inóculo de las pruebas de susceptibilidad por el método de disco difusión es 0,5.<sup>20</sup>
- **Incubación:** Mantenimiento de cultivos bacterianos en condiciones de temperatura y humedad favorables para su desarrollo y multiplicación.<sup>37</sup>
- **Inóculo:** Alícuota de un cultivo bacteriano transferida a un medio de cultivo.<sup>37</sup>
- **Microaerofílico:** Organismo que crece y se reproduce mejor en la presencia de una tensión de 5 % de oxígeno, 10 % de anhídrido carbónico y 85 % de nitrógeno.<sup>13</sup>
- **Unidad formadora de colonias (UFC):** Célula viva y aislada que se encuentra en un substrato y en condiciones ambientales adecuadas y produce una colonia en un breve lapso de tiempo.<sup>26</sup>

### III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

#### 3.1. Unidad de análisis, universo y muestra

##### 3.1.1. Unidad de análisis

Aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “oregano”.

##### 3.1.2. Universo

Hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano”.

##### 3.1.3. Muestra

- Aceite esencial obtenido de 7 kg de hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano”.
- Cepas de *Helicobacter pylori*.
- 03 discos de sensibilidad antibiótica de claritromicina 15 µg.

#### a) Aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano”

##### Criterios de inclusión

- Aceite esencial obtenido de las hojas de orégano exento de microorganismos.
- Aceite esencial de orégano con buenas características organolépticas: Como color, sabor, olor, consistencia, etc.
- Aceite esencial obtenido de las hojas de orégano que se mantuvo bajo condiciones de temperatura y humedad adecuada.

### **Criterios de exclusión**

- Aceite esencial obtenido de las hojas frescas de orégano que presentaron contaminación microbiológica.
- Aceite esencial de orégano que mostraron malas características organolépticas, como color, sabor, olor, consistencia, etc.

### **b) Cepas de *Helicobacter pylori***

#### **Criterios de inclusión**

- Cepas identificadas de *Helicobacter pylori* aisladas de biopsias gástricas de pacientes atendidos en el servicio de gastroenterología del Hospital II Es Salud – Cajamarca, que fueron codificadas como: M – 019, M – 020, M – 021, M – 025 y M - 030.
- Cepas de *Helicobacter pylori* que no mostraron alguna contaminación microbiológica, como presencia de hongos u otro tipo de bacterias.
- Cepas de *Helicobacter pylori* que fueron conservadas en estado de temperatura y humedad adecuada.

#### **Criterios de exclusión:**

- Cepas de *Helicobacter pylori* que no se lograron por completo identificar y menos aislar.
- Cepas de *Helicobacter pylori* que mostraron alguna contaminación microbiológica.

- Cepas de *Helicobacter pylori* que no estuvieron conservadas en estado de temperatura y humedad adecuada.

### c) Discos de sensibilidad antibiótica de claritromicina

#### **Criterios de inclusión:**

- Discos de sensibilidad antibiótica de claritromicina, que estuvieron en estado de conservación, temperatura y humedad adecuada.
- Discos de sensibilidad con fecha de vencimiento vigente.

#### **Criterios de exclusión**

- Discos de sensibilidad antibiótica de claritromicina que estuvieron almacenados en condiciones no adecuadas de temperatura y humedad.
- Discos de sensibilidad antibiótica de claritromicina que se encontraron con fecha de expiración vencida.

## **3.2. Métodos de la investigación**

### **3.2.1. De acuerdo al fin que se persigue:**

La investigación de acuerdo al fin que se persigue fue básica, ya que estuvo encaminada a ampliar el conocimiento científico, explorando nuevas teorías y transformando las ya existentes.<sup>28</sup>

### 3.2.2. De acuerdo al objeto de estudio:

La investigación de acuerdo al objeto de estudio fue explicativa, pues el propósito estuvo dirigido a responder las causas, los eventos y los fenómenos físicos o sociales; se enfocó en explicar el por qué ocurre un fenómeno y en qué condiciones se manifiesta o por qué se relaciona dos o más variable.<sup>28</sup>

### 3.2.3. De acuerdo a la técnica de contrastación

De acuerdo a la técnica de contrastación, esta investigación fue descriptiva y comparativa.<sup>28</sup>

**Descriptiva.** Porque se recolectó teorías o datos sobre la base de una hipótesis o teoría, resumiendo la información de manera cuidadosa y luego analizándolo minuciosamente los resultados, a fin de extraer generalizaciones significativas que contribuyan al conocimiento.

**Comparativa.** Porque se efectuó una comparación exhaustiva entre dos teorías a fin de analizar y sintetizar sus diferencias y similitudes. Una de las virtudes de esta investigación permitió que se llegue a un conocimiento general y profundizado de las realidades que estudia, a partir de trabajar aspectos muy particulares y concretos.

### 3.3. Técnicas de investigación

#### a) Recolección y selección de la especie vegetal

La muestra se obtuvo del centro poblado de Cumbico, distrito de Magdalena, región Cajamarca. Para ello se viajó a dicho centro poblado y en compañía de algunos pobladores de la zona, se procedió a recolectar hojas frescas de orégano. Posteriormente se empacó y luego se trasladó a la ciudad de Cajamarca y luego al Laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo. A su llegada, se lavó con agua potable y se enjuagó con agua destilada.

#### b) Obtención del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano”, mediante el destilador de caldera de acero inoxidable

Se pesó 7 kg de hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano” y se colocó en el recipiente para la muestra. Se agregó 20 litros de agua en el tanque generador de vapor. Posteriormente se acoplaron los tres componentes del equipo, dejando correr el agua por el refrigerante. Se extrajo el aceite esencial por un tiempo de 4 horas. Transcurrido el tiempo de extracción, se separó el agua del aceite con la ayuda de una pera de decantación. Posteriormente se guardó el aceite esencial en un frasco de color ámbar con tapa rosca. Se almacenó en condiciones de temperatura y humedad adecuada, hasta su posible utilización.

**c) Dilución del aceite esencial de orégano a concentraciones del 100 %, 50 % y 10 %**

Las diferentes diluciones de aceite esencial se hicieron en alcohol de 96°, empleándose la siguiente fórmula.

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

- **Concentración al 100 %:** Para la concentración al 100 %, se consideró el aceite esencial puro.

- **Concentración al 50 %:**

$$100 \% \text{ aceite esencial} \times V1 = 50 \% \times 1000 \mu\text{L}$$

$$V1 = \frac{50 \% \times 1000 \mu\text{L}}{100 \%}$$

$$V1 = 500 \mu\text{L}$$

En un microvial estéril, a partir de la solución madre se tomó 500  $\mu\text{L}$  del aceite esencial y se agregó 500  $\mu\text{L}$  de alcohol de 96°, agitándose por completo.

- **Concentración al 10 %:**

$$100 \% \text{ aceite esencial} \times V1 = 10 \% \times 1000 \mu\text{L}$$

$$V1 = \frac{10 \% \times 1000 \mu\text{L}}{100 \%}$$

$$V1 = 100 \mu\text{L}$$

En un microvial estéril, a partir de la solución madre se tomó 100 µL del aceite esencial y se agregó 900 µL de alcohol de 96°, agitándose por completo.

**d) Obtención de las biopsias gástricas para identificar *Helicobacter pylori***

**Toma de muestra:** Se tomó una muestra de biopsia del antro y una del cuerpo gástrico de un total de 30 pacientes (codificadas del M - 01 al M-030) que acudieron al servicio de gastroenterología del Hospital II EsSalud– Cajamarca. Las biopsias fueron tomadas por el personal médico responsable del Servicio de Endoscopia Digestiva.<sup>17,22</sup>

**Transporte y maceración de la muestra:** Las biopsias tomadas recientemente para el estudio microbiológico se mantuvieron húmedas en 0,8 mL de solución fisiológica estéril en un tubo de vidrio tapa rosca estéril. Luego se transportaron rápidamente al Laboratorio a una temperatura de 4 a 8 °C y en seguida se realizó la maceración del tejido con ayuda de una jeringa estéril de 1 mL protegida con el capuchón, la cual sirvió como bagueta. Todas las muestras se procesaron antes de las seis horas después de la toma de la muestra.

**Diferenciación bioquímica del macerado de la muestra (Procedimiento**

**del método de la ureasa rápida):** De la biopsia macerada con la ayuda de un asa de siembra estéril se tomó una porción del macerado y se introdujo en un tubo con agar urea base, se incubó por 24 horas.

La presencia de *Helicobacter pylori*, se observaron el cambio de color de amarillo a rosado.

**e) Identificación microscópica de *Helicobacter pylori* en el macerado de la biopsia:**

Se constató la presencia de *Helicobacter pylori*, mediante la observación de microorganismos Gram negativos curvos, en forma de S o alas de gaviota, que se tiñen débilmente. Para ello se usó la técnica de coloración Gram modificada, cuyo procedimiento es el siguiente:<sup>20,26</sup>

Sobre una lámina porta objeto previamente desengrasada se colocó 3 gotas del macerado de la biopsia y se dejó secar. Se fijó con el calor del mechero tipo Bunsen. Se añadió cristal violeta durante 1 minuto. Se lavó con agua del grifo. Se fijó con lugol durante 1 minuto. Se lavó con agua del grifo. Se decoloró con alcohol acetona durante 10 segundos. Se lavó con agua del grifo. Se añadió fucsina fenicada por 3 minutos. Se lavó con agua de grifo. Se visualizó con el microscopio a 100 aumentos utilizando aceite de inmersión.

**Nota:** Solo se identificaron 5 cepas del total de las 30 muestras de los 30 pacientes, las que fueron codificadas como: M- 019, M – 020, M – 021, M – 025 y M – 030.

**f) Cultivo de la muestra:**

Para el cultivo de la muestra se utilizó agar chocolate y agar sangre, suplementado con sangre desfibrinada de cordero al 20 %, más suplemento antibiótico.

**Toma y obtención de sangre de cordero desfibrinada:<sup>4</sup>**

- Preparación del animal: Se preparó la zona del cuello con la respectiva asepsia, que incluyó la esquila, para exponer el área de la piel limpia.
- Sujeción del animal: Se sujetó de tal manera que las rodillas presionaran al cordero para evitar que se mueva, con una mano se giró levemente la cabeza de éste y se sostuvo de la mandíbula.
- Ubicación de la vena yugular: Con ayuda del médico veterinario se hizo una moderada presión con la mano en el surco yugular, facilitando la visualización o tacto de la vena.
- Desinfección del sitio de punción: Se realizó la desinfección de la zona exacta a la punción, con suficiente alcohol de 70° impregnado en el algodón.
- Punción de la vena: Con la ayuda de una jeringa de 20 mL y una aguja calibre N° 18 mm se dirigió en un ángulo de 45° y se procedió a la extracción sanguínea.
- Desfibrinación de la muestra sanguínea: Para la desfibrinación de la de sangre, se utilizó el mismo número de perlas de vidrio que mililitros de sangre. La sangre se colocó en un frasco de vidrio estéril tapa rosca, el cual contenía las perlas de vidrio.

- Luego se aplicó suavemente movimientos rotatorios, al cabo de 2 a 3 minutos se escuchó el ruido que las perlas hacen al chocar contra las paredes del frasco dejó de oírse, a partir de ese momento se prosiguió el movimiento rotatorio durante 10 min. Posteriormente se separó con mucho cuidado la sangre desfibrinada.

#### **Preparación del agar sangre y agar chocolate:<sup>26,37</sup>**

**Agar Sangre:** Se utilizó agar Müller Hinton y se procedió de la siguiente manera:

Se pesó 38g de agar Müller Hinton y se suspendió en 1000 mL de agua destilada durante 10 minutos. Se calentó y agitó hasta su ebullición, durante 1 minuto. El balón de fondo plano se tapó y se colocó a esterilizar en la autoclave a 121 °C durante 15 minutos y 15 libras de presión atmosférica. Se agregó como suplemento antibiótico vancomicina (6 mg/1000 mL), anfotericina B (5mg/1000 mL) y sulfametoxazol/trimetoprima (5mg/1000 mL). Se dejó enfriar entre 45 a 50 °C (hasta que el calor sea soportable en el dorso de la mano) y se añadió sangre desfibrinada estéril de cordero al 20%. Se homogenizó suavemente con movimientos rotatorios con el fin de obtener una buena mezcla y evitar la formación de burbujas. Luego se distribuyó 500 mL en placas Petri estériles y se controló la esterilidad incubando a 37 °C por 24 horas.

### **Agar chocolate:**

Para obtener el agar chocolate se llevó los 500 mL de agar sangre restante a Baño María (80 °C) durante 10 minutos mezclando frecuentemente. Se dejó enfriar de 45 a 50 °C, luego se distribuyó en placas Petri estériles. Se controló la esterilidad incubando a 37 °C por 24 horas.

### **Siembra de la muestra bacteriana:**

En las placas de agar chocolate y agar sangre suplementados, se realizó la siembra del macerado de las biopsias gástricas mediante el método de agotamiento por estría.

### **Generación de atmósfera microaerofílica:<sup>20,21</sup>**

La atmósfera microaerofílica que necesitó *Helicobacter pylori* se logró de la siguiente manera: En una jarra de anaerobiosis se generó la atmósfera adecuada con una vela encendida y un sobre de sal de Andrews ® (bicarbonato de sodio 45,6 g; 45,6 g de sulfato de magnesio desecado; excipientes c.s). El contenido del sobre se colocó en un tubo de vidrio estéril con 10 mL de agua destilada, para lograr una atmósfera de 5 % de oxígeno, 10 % de dióxido de carbono y 85 % de nitrógeno con una humedad de 90 % - 100 %.

Luego se incubó a 37 °C durante un tiempo de 7 días.

**g) Identificación de cepas de *Helicobacter pylori*:**<sup>20,26</sup>

Transcurrido el tiempo de incubación, se observó el crecimiento de las colonias y se realizaron las siguientes pruebas:

**Identificación macroscópica:** Las colonias se observaron de forma circular, convexas. De color gris brillante, translúcidas, elevadas y con un diámetro de 1 - 2 mm aproximadamente.

**Identificación microscópica:** Para la identificación microscópica de las cepas de *Helicobacter pylori* se realizó la tinción Gram modificada empleándose el siguiente procedimiento:<sup>15</sup>

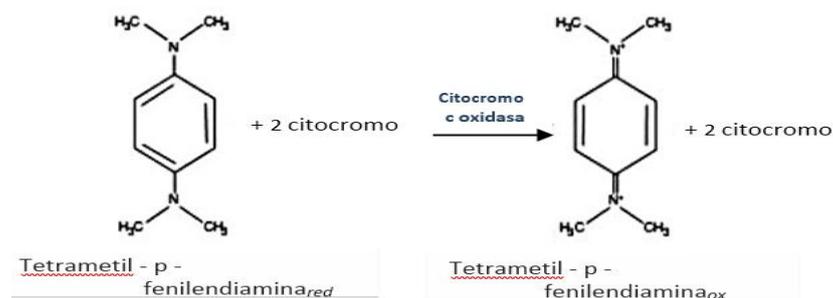
Sobre una lámina porta objeto previamente desengrasada se colocó una gota de agua destilada y con la ayuda de un asa de siembra estéril se agregó una colonia aislada, se homogenizó y se dejó secar. Se fijó con el calor del mechero tipo Bunsen. Se añadió cristal violeta durante 1 minuto. Se lavó con agua del grifo. Se fijó con lugol durante 1 minuto. Se lavó con agua del grifo. Se decoloró con alcohol acetona durante 10 segundos. Se lavó con agua del grifo. Se añadió fucsina fenicada por 3 minutos. Se lavó con agua del grifo. Se visualizó en el microscopio con el objetivo de 100x utilizando aceite de inmersión.

**h) Identificación bioquímica de las cepas de *Helicobacter pylori***

- **Prueba de ureasa rápida:** Se recogió una colonia pura y se introdujo en un vial limpio conteniendo 1mL de caldo de úrea al 6 % con indicador de pH (rojo de fenol), se observó el cambio de color de la suspensión de un color amarillo a un color rosado fucsia dentro de los primeros 10

minutos. Para mayor evidencia también se empleó agar urea base, de la siguiente manera: Con la ayuda del asa de siembra estéril se tomó una colonia y se introdujo en un tubo con agar úrea base, observándose el cambio de color amarillo a rosado, en los primeros 30 minutos.

- **Prueba de catalasa:** Consistió en recoger el centro de una colonia pura y se colocó sobre una lámina porta objetos limpia, inmediatamente se agregó con un gotero una gota de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 3 %, y se observó la formación de burbujas (liberación de gas), lo que indicó un resultado positivo.
- **Prueba de oxidasa:** Sobre una tira reactiva de oxidasa con el asa de siembra estéril, se hizo un extendido de una colonia sospechosa, siguiendo una pequeña línea. La reacción positiva se produjo de 5 - 10 segundos y se evidenció el viraje de las colonias oxidasa positivas a un color púrpura intenso o azul. Esta prueba se fundamenta mediante la siguiente reacción:



**Figura N° 09: Reacción de la prueba oxidasa**

**Fuente:** Fernández A, García C, Saéz J, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. España: editorial Seimc; 2010. p. 2 – 10.<sup>23</sup>

**i) Preparación de los medios de cultivo para determinar el efecto antibacteriano in vitro**

Para la evaluación antimicrobiana se trabajó con las 5 cepas de *Helicobacter pylori*, aisladas de pacientes con problemas gástricos del Hospital II EsSalud-Cajamarca. Las cuáles fueron positivas a todas las pruebas antes mencionadas, codificadas como: M -- 019, M – 020, M – 021, M – 025 y M – 030.

**Preparación del agar Müller Hinton<sup>20,26</sup>**

Se pesó 38 g de agar Müller Hinton y se suspendió en 1000 mL de agua destilada durante 10 minutos. Se calentó y se agitó hasta su ebullición, durante 1 minuto. Posteriormente se procedió a autoclavar a 121 °C durante 15 minutos y/o 15 libras de presión atmosférica. Se dejó enfriar hasta que alcance los 45 °C - 50 °C, se añadió sangre desfibrinada de cordero al 5 %. Una vez esterilizado y solidificado se midió el pH del Agar, obteniéndose el valor de 7,4. Esta medición se realizó con ayuda del potenciómetro. Se repartió el medio en placas petri (60 mL a 70 mL para placas de 150 mm de diámetro interno), de manera que el grosor del agar en la placa será de 4 mm. Se realizó las pruebas de esterilidad, incubando dos placas a 37 °C durante 24 horas.

**Preparación del estándar (0,5 Mc. Farland) para el inóculo<sup>21,26</sup>**

Para estandarizar la densidad del inóculo se utilizó una suspensión de sulfato de bario (0,5 de la escala de Mc. Farland), como estándar. Para

prepararlo, se agregó 0,5 mL de una solución de BaCl<sub>2</sub> 0,048 M (BaCl<sub>2</sub>) a 99,5 mL de una solución de ácido sulfúrico al 0,18 M (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se mezclaron y se agitó con movimiento suaves para mantener la suspensión. Se verificó la densidad correcta del estándar, en el espectrofotómetro a una absorbancia de 625 nm, cuyos resultados fueron de 0,08 a 0,10. Posteriormente se distribuyó 6 mL en tubos con tapa rosca o tapón de jebes. Se ajustaron bien las tapas o tapones para evitar la evaporación y se agitó vigorosamente, comparándose la turbidez de las cepas inoculadas en el caldo de tripticasa de soja y se verificó que la turbidez sea parecida.

#### **Preparación del caldo tripticasa soja** <sup>13,21</sup>

Se pesó 3 g de caldo tripticasa soja y se disolvió en 100 mL de agua destilada, se colocó el caldo en tubos con tapa rosca y se llevó al autoclave a 121 °C durante 15 minutos y 15 libras de presión atmosférica.

**Preparación del inóculo:** A partir de 4 ó 5 colonias bien aisladas e identificadas y de igual morfología en un medio de aislamiento primario se preparó una suspensión en 5 mL de caldo tripticasa soja tocando la parte superior de cada colonia haciendo uso de un hisopo. Se incubó el tubo de cultivo a 37 °C hasta que se alcance o exceda la turbidez del estándar equivalente al 0,5 de Mc Farland (2 - 6 h).

**Estandarización del inóculo:** Se ajustó la densidad del cultivo que se encontró en fase logarítmica, con caldo por comparación visual hasta la

turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de Mc. Farland. Para facilitar este procedimiento, se midió los tubos contra un fondo blanco con una línea negra como contraste. Se procedió a realizar el antibiograma.

**j) Diseño experimental: Método de Kirby Bauer para determinar el efecto antibacteriano<sup>22,23</sup>**

- **Grupo Blanco:** En las placas con agar Müller Hinton se sembraron las cepas de *Helicobacter pylori*, luego se incubaron a 37 °C en condiciones de microaerofilia durante 72 horas.
- **Grupo control positivo:** Como control positivo se utilizaron discos de sensibilidad de claritromicina 15 µg, los cuales se colocaron en las placas de cada grupo problema; estos sirvieron como control de referencia. Para medir la zona de inhibición se midieron del lado donde se colocaron los discos retirando la tapa de la placa y utilizando luz reflejada (el ensayo fue trabajado por triplicado).

**Aplicación de los discos de antibióticos:** Los discos fueron sacados del refrigerador 1 - 2 horas antes de su uso para lograr un equilibrio con la temperatura ambiente y reducir la posibilidad de que la humedad afecte la concentración de los antibióticos.

- **Grupo problema:** Se depositó 20 µL de las diluciones del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano” al 100 %, 50 % y 10 % sobre los discos de sensibilidad para analizar el efecto antibacteriano.

Los discos embebidos con las diluciones se colocaron sobre la superficie de las placas sembradas con el inóculo de *Helicobacter pylori*, con la ayuda de una pinza estéril presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar. Se distribuyeron los discos uniformemente, de modo que estuvieron a una distancia mínima de 25 mm uno del otro, para evitar las superposiciones de las zonas de inhibición, luego se procedió a incubar las placas en una jarra de anaerobiosis a 37 °C durante 72 horas. La zona de inhibición se midió del lado donde se colocaron los discos retirando la tapa de la placa y utilizando luz reflejada (el ensayo fue trabajado por triplicado).

**k) Interpretación de sensibilidad según escala de Durafaud:<sup>20</sup>**

- **Nula:** Si es inferior o igual a 8 mm.
- **Sensibilidad límite:** De 9 a 14 mm.
- **Sensibilidad media:** De 15 a 19 mm.
- **Sumamente sensible:** Si es igual o superior a 20 mm.

**3.4. Instrumentos, equipos, materiales y reactivos**

**Instrumentos**

- Programa Básico Estadístico Excel 2013.
- Programa Estadístico Software I.B.M. Statistical Package for the Social Sciences (IBM - SPSS) versión 22,0. Prueba no paramétrica de U de Mann – Whitney
- Escala de Duraffourd & Lapraz.

- Ficha de datos para registro de los pacientes.

### **Equipos**

- Estufa (MEMMERT).
- Incubadora (EN - 032).
- Autoclave (Sturdy SA - 300VFA).
- Espectrofotómetro (UV/VIS Spectronic 20 modelo Genesys).
- Equipo de destilación de acero de caldera inoxidable.
- Jarras de anaerobiosis (Anaerocult® - Merck).
- Microscopio electrónico (Leica DM750).
- Refrigeradora (SAMSUNG).
- Balanza analítica (ADVENTURES - TM).
- Campana extractora de gases (Telstar II Bio Advance).

**Materiales:** Materiales de vidrio y otros de uso común en el Laboratorio Clínico Llontop, Laboratorio del Hospital II EsSalud y Laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la UPAGU.

### **Reactivos**

- Caldo Tripticasa de soya marca Merck, Proveedor: Quimelab.
- Agar Müller Hinton marca Merck, Proveedor: Quimelab.
- Agua destilada, Laboratorio B. Braun Medical Perú S.A.
- Alcohol 96<sup>0</sup> x 1000 mL, Laboratorio Portugal
- Úrea al 6 % (MERCK).

- Rojo de fenol.
- Tiras reactivas de oxidasa (MERCK BACTIDENT®).
- Peróxido de hidrógeno al 3 %. (JENFARMA)
- Reactivos para la coloración Gram modificada.
- Reactivos para la escala de Mc. Farland.
- Suero fisiológico (MEDIFARMA).
- Discos de sensibilidad antibiótica de claritromicina 15 µg (BIODISC).

### 3.5. Técnicas de análisis de datos

Los datos fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) y para contrastar la hipótesis se utilizó la prueba no paramétrica de U de Mann – Whitney, que establece comparaciones entre grupos (control versus problema).

### 3.6 Aspectos éticos de la investigación

La presente investigación se realizó empleando una especie vegetal teniendo en cuenta el cuidado de la biodiversidad, de acuerdo a la ley general del ambiente (Ley N° 28611), según el artículo 85°: Los recursos naturales son Patrimonio de la Nación, solo por derecho otorgado de acuerdo a la ley y al debido procedimiento pueden aprovecharse los frutos o productos de los mismos, salvo las excepciones de ley.<sup>33</sup>

El aislamiento de la cepa bacteriana involucró a pacientes, razón por la cual se consideró su derecho a confidencialidad, de acuerdo a la ley general de salud

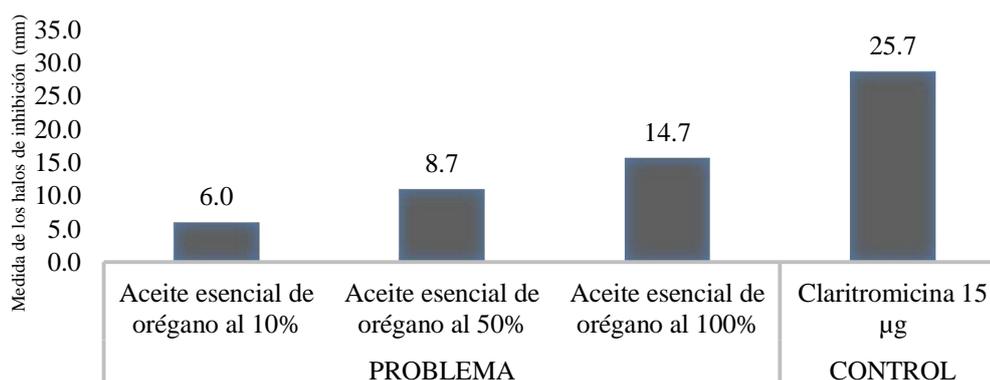
(Ley N° 26842), tal como se menciona en el artículo 25°: Toda información relativa al acto médico que se realiza, tiene carácter reservado y se exceptúa de la reserva de la información relativa al acto médico, cuando fuere utilizada con fines académicos o de investigación científica, siempre que la información obtenida de la historia clínica se consigne en forma anónima.<sup>32</sup>

#### IV. RESULTADOS

**Tabla N° 01: Halos de inhibición de claritromicina y del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano” al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Helicobacter pylori* código M – 019**

Grupos	Concentración del aceite esencial de orégano (%)	Halos de inhibición (mm)			
		Placa N° 01	Placa N° 02	Placa N° 03	Promedio
Problema	10 %	6,0	6,0	6,0	6,0
	50 %	8,0	9,0	9,0	8,7
	100 %	15,0	14,0	15,0	14,7
Control	Claritromicina 15 µg	25,0	27,0	25,0	25,7

Fuente: Elaboración propia de los tesisistas.



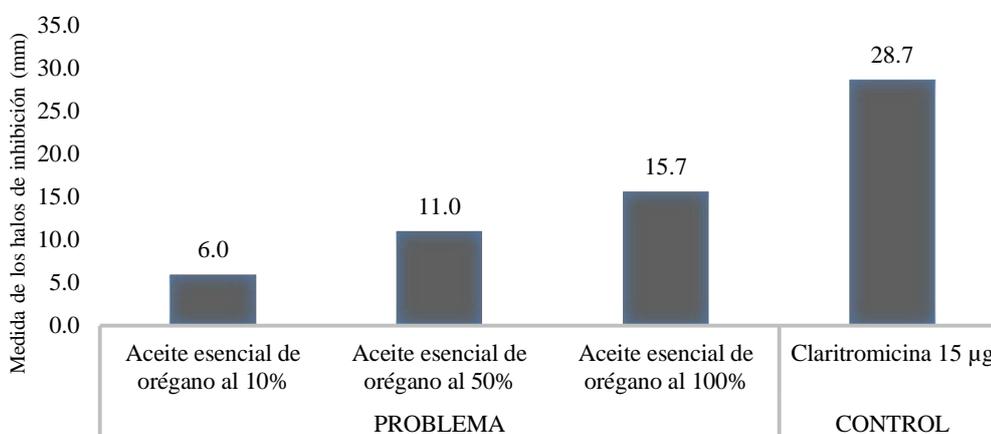
**Gráfico N° 01: Halos de inhibición de claritromicina y del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano” al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Helicobacter pylori* código M – 019**

**Interpretación:** La tabla N° 01 y el gráfico N° 01, muestran las comparaciones de los diámetros de los halos de inhibición antibiótica de claritromicina y el aceite esencial de orégano al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Helicobacter pylori* código M - 019, observándose halos de inhibición de 25,7 mm para claritromicina, 6 mm para el aceite esencial de orégano al 10 %, 8,7 y 14,7 mm de diámetro respectivamente al 50 % y 100 %.

**Tabla N° 02: Halos de inhibición de claritromicina y del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano” al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Helicobacter pylori* código M – 020**

Grupos	Concentración del aceite esencial de orégano (%)	Halos de inhibición (mm)			
		Placa N° 01	Placa N° 02	Placa N° 03	Promedio
Problema	10 %	6,0	6,0	6,0	6,0
	50 %	12,0	11,0	10,0	11,0
	100 %	17,0	14,0	16,0	15,7
Control	Claritromicina 15 µg	29,0	29,0	28,0	28,7

Fuente: Elaboración propia de los tesisistas



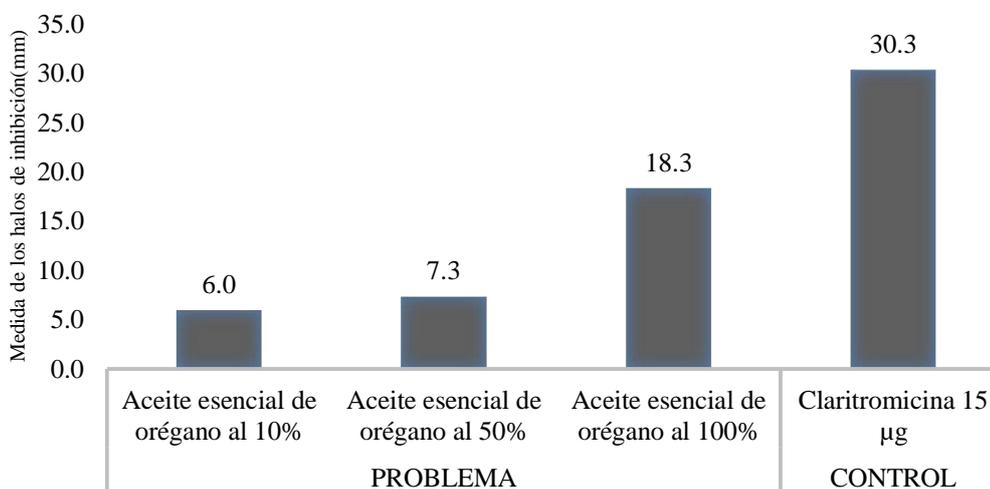
**Gráfico N° 02: Halos de inhibición de claritromicina y del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano” al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Helicobacter pylori* código M – 020**

**Interpretación:** En la tabla N° 02 y gráfico N° 02 se muestran los halos de inhibición de claritromicina y del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano” al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Helicobacter pylori* código M – 020, observándose mayor inhibición en claritromicina con un halo de 28,7 mm, seguido del aceite esencial al 100 % de 15,7 mm y al 50 % de 11,0 mm de diámetro.

**Tabla N° 03: Halos de inhibición de claritromicina y del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano” al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Helicobacter pylori* código M – 021**

Grupos	Concentración del aceite esencial de orégano (%)	Halos de inhibición (mm)			
		Placa N° 01	Placa N° 02	Placa N° 03	Promedio
Problema	10 %	6,0	6,0	6,0	6,0
	50 %	7,0	7,0	8,0	7,3
	100 %	19,0	19,0	17,0	18,3
Control	Claritromicina 15 µg	30,0	31,0	30,0	30,3

Fuente: Elaboración propia de los testistas.



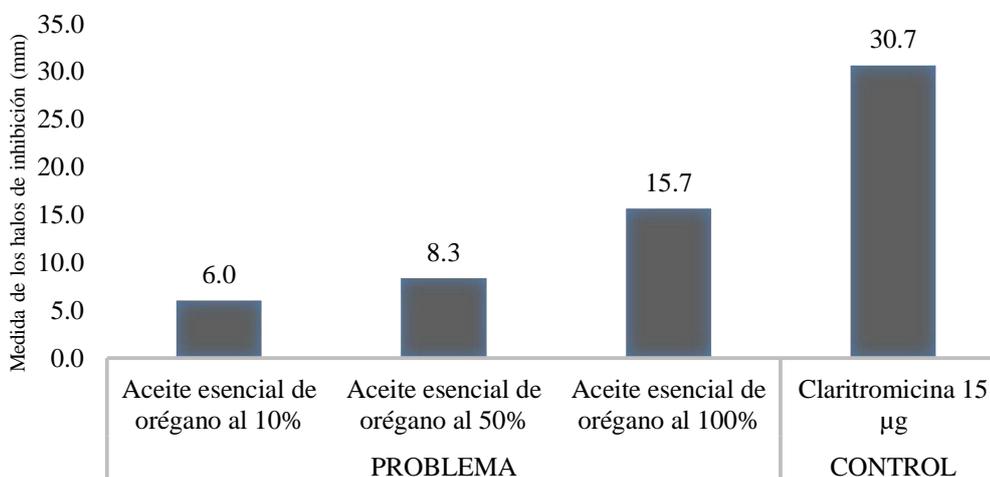
**Gráfico N° 03: Halos de inhibición de claritromicina y del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano” al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Helicobacter pylori* código M – 021**

**Interpretación:** La tabla N° 03 y el gráfico N° 03 muestran los halos de inhibición de claritromicina y del aceite esencial de orégano al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Helicobacter pylori* código M – 021, evidenciándose 30,3 mm para claritromicina y 18,3 mm para el aceite esencial al 100 %, 7,3 mm al 50 % y 6,0 mm de diámetro al 10 %.

**Tabla N° 04: Halos de inhibición de claritromicina y del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano” al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Helicobacter pylori* código M – 025**

Grupos	Concentración del aceite esencial de orégano (%)	Halos de inhibición (mm)			
		Placa N° 01	Placa N° 02	Placa N° 03	Promedio
Problema	10 %	6,0	6,0	6,0	6,0
	50 %	8,0	7,0	10,0	8,3
	100 %	16,0	14,0	17,0	15,7
Control	Claritromicina 15 µg	31,0	29,0	32,0	30,7

Fuente: Elaboración propia de los tesisistas



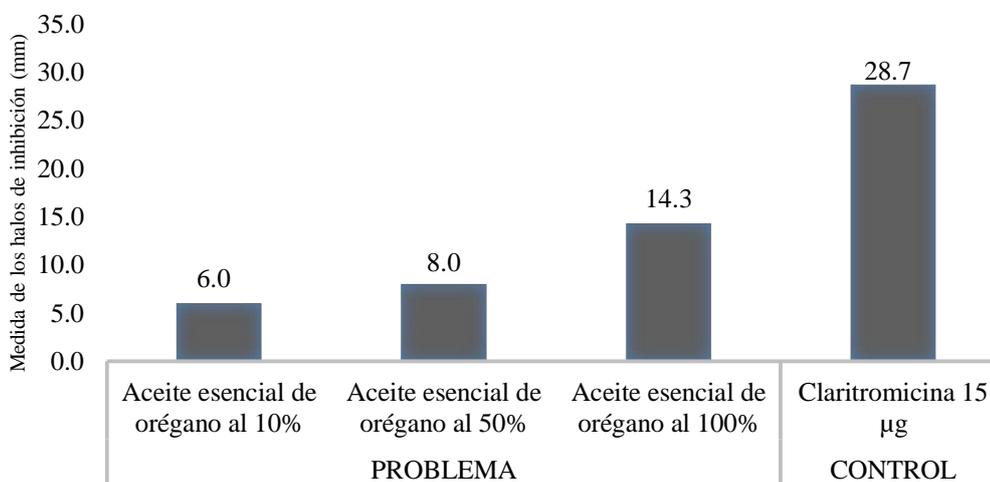
**Gráfico N° 04: Halos de inhibición de claritromicina y del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano” al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Helicobacter pylori* código M – 025**

**Interpretación:** En la tabla N° 04 y el gráfico N° 04, se muestran los halos de inhibición de claritromicina y del aceite esencial del orégano al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Helicobacter pylori* código M – 025, observándose mayor inhibición en claritromicina (30,7 mm), seguido del aceite esencial al 100 % (15,7 mm) y al 50 % (8,3mm). No evidenciándose inhibición del aceite esencial al 10 %.

**Tabla N° 05: Halos de inhibición de claritromicina y del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano” al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Helicobacter pylori* código M – 030**

Grupos	Concentración del aceite esencial de orégano (%)	Halos de inhibición (mm)			
		Placa N° 01	Placa N° 02	Placa N° 03	Promedio
Problema	10 %	6,0	6,0	6,0	6,0
	50%	8,0	9,0	8,0	8,0
	100%	13,0	14,0	16,0	14,3
Control	Claritromicina 15 µg	29,0	28,0	29,0	28,7

Fuente: Elaboración propia de los tesisistas



**Gráfico N° 05: Halos de inhibición de claritromicina y del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano” al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Helicobacter pylori* código M – 030**

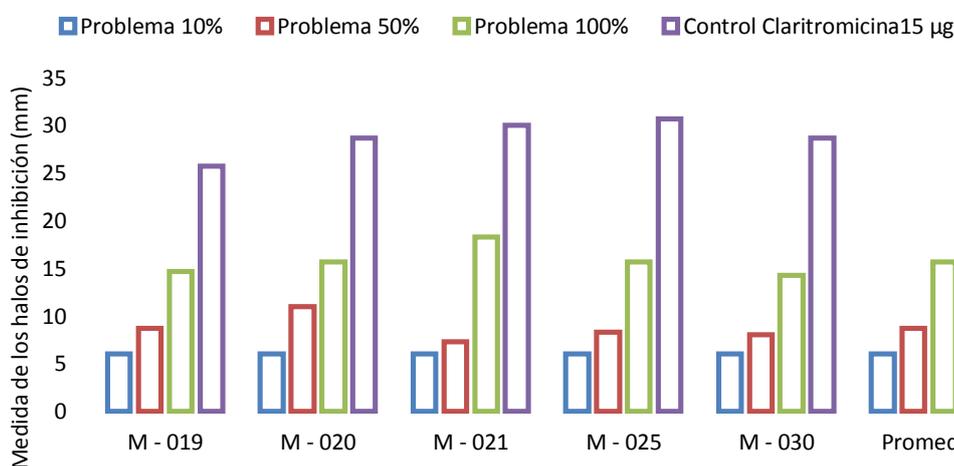
**Interpretación:** La tabla N° 05 y el gráfico N° 05 muestran que el aceite esencial de orégano al 100% alcanzó mayor inhibición (14,3 mm) a diferencia del 50 % que se evidenció 8,0 mm y del 10 % 6,0 mm de diámetro frente a las cepas de *Helicobacter pylori* código M – 030. Mientras, claritromicina superó al aceite esencial, alcanzando un halo de inhibición promedio de 28,7 mm de diámetro.

**Tabla N° 06: Halos de inhibición promedio de claritromicina y del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano” al 10 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Helicobacter pylori* código M: 019, 020, 021, 025, 030**

Grupo	Concentración del aceite esencial (%)	Halos de inhibición promedio (mm)					Promedio
		M -019	M-020	M-021	M-025	M-030	
Problema	10 %	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	<b>6,0</b>
	50 %	8,7	11,0	7,3	8,3	8,0	<b>8,7</b>
	100 %	14,7	15,7	18,3	15,7	14,3	<b>15,7</b>
Control	Claritromicina 15 µg	25,7	28,7	30,0	30,7	28,7	<b>28,8</b>

Fuente: Elaboración propia de los tesisistas

### Halos de inhibición promedio



**Gráfico N° 06: Halos de inhibición promedio de claritromicina y del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano” al 10%, 50% y 100% frente a las cepas de *Helicobacter pylori* código M: 019, 020, 021, 025, 030**

**Interpretación:** La tabla N° 06 y el gráfico N° 06 muestran el promedio de los halos de inhibición de claritromicina y de las 5 muestras del aceite esencial de orégano, codificadas como: M – 019, M – 020, M – 021, M – 025 y M - 030 frente a las cepas de *Helicobacter pylori*, observándose 28,8 mm para la claritromicina y 15,7 mm para el aceite esencial de orégano al 100 %, 8,7 mm al 50 % y 6,0 mm de diámetro al 10 %

## V. DISCUSIÓN

El tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* continúa siendo un problema de salud, evidenciándose un alto porcentaje de fallas en su erradicación. La efectividad de cada tipo de tratamiento establecido depende de la susceptibilidad de la bacteria y del cumplimiento del paciente, ya que los esquemas terapéuticos planteados para *Helicobacter pylori* ha variado con el tiempo, cambiando entre distintas zonas geográficas y entre diferentes tipos de poblaciones, por lo cual se hace necesario un continuo control y monitoreo para asegurar un cumplimiento adecuado por parte de los pacientes.

Actualmente se busca un tratamiento que sea efectivo, de bajo costo y libre de efectos secundarios; sin embargo, no existe un esquema terapéutico que cumpla con dichos requisitos; pero sí, existen muchos que se acercan al tratamiento ideal; tal es el caso de los fitoconstituyente de algunas especies vegetales, como el orégano, que además de utilizarse con otros fines, tiene también actividad antibacteriana; razón por la que, el presente trabajo de investigación buscó comparar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano” con claritromicina en cepas de *Helicobacter pylori*. Para ello, se obtuvo el aceite esencial de orégano y a la vez se hicieron diluciones en alcohol etílico al 100 %, 50 % y 10 %; asimismo, para aislar las cepas de *Helicobacter pylori*, se trabajó con biopsias gástricas de 30 pacientes que acudieron al servicio de gastroenterología del Hospital II EsSalud – Cajamarca, de las cuales se lograron aislar 5 de ellas (tomando en cuenta los criterios de inclusión y exclusión) que

permanecieron viables durante el desarrollo de la investigación y a las que asignaron códigos como cepa M – 019, M – 020, M – 021 M – 025 y M – 030.

Para determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial del orégano frente a las cepas de *Helicobacter pylori* se emplearon discos de sensibilidad antibiótica de claritromicina (grupo control) y discos de sensibilidad embebidos con aceite esencial de orégano al 100 %, 50 % y 10 % (grupo problema), los cuales fueron impregnadas sobre placas Petri sembradas con cepas de *Helicobacter pylori*, incubándose a 37°C durante 24 horas, observándose halos de inhibición promedio de 25,7 mm de diámetro para la claritromicina y 14,7 mm para el aceite esencial de orégano al 100 %, seguido de 8,7 al 50 % y 6 mm de diámetro al 10 % (tabla N° 01 y gráfico N° 01) para las cepas de código M – 019; de igual forma, se evidenciaron halos inhibición promedio de 28,7 mm para la claritromicina y para el aceite esencial de orégano al 100 % 15,7, al 50 % 11,0 mm y al 10 % 6 mm de diámetro (tabla N° 02 y gráfico N° 02) para la cepa del código M – 020; mientras tanto, para las cepas del código M – 021, fueron 30,3 mm correspondientes a claritromicina, seguido de 18,3 mm para el aceite esencial de orégano al 100 %, 7,3 mm al 50 % y 6 mm de diámetro al 10 % /(tabla N° 03 y gráfico N° 03). De la misma manera, se realizó el antibiograma para las cepas de *Helicobacter pylori* del código M – 025; observándose halos de inhibición promedio de 30,7 mm para la claritromicina y 15,7 mm para el aceite esencial de orégano al 100 %, 8,3 mm al 50 % y 6 mm de diámetro al 10 % (tabla N° 04 y gráfico N° 04). En tanto que, para las cepas del código M – 030, arrojaron 14,3 mm de diámetro para el aceite esencial de orégano al 100 %, 8,0 mm al 50% y 6 mm al 10 %, así como para claritromicina que

evidenció un halo de inhibición promedio de 28, 7 mm de diámetro (tabla N° 05 y gráfico N° 05).

Como se puede observar el aceite esencial de orégano, mostró inhibición antibacteriana frente a las cepas de *Helicobacter pylori*, siendo el efecto directamente proporcional a la concentración ensayada, pudiéndose evidenciarse el mayor efecto a la concentración del 100 %, disminuyendo a la concentración del 50 % y no mostrando inhibición alguna al 10 %, puesto que los 6 mm de diámetro que arrojó a esta concentración, solo es reflejo del diámetro del disco. Al constatar los resultados de este estudio con el de **Harmati M et al (2016)**<sup>27</sup> que estudiaron la “Mezcla binaria de aceites esenciales de *Satureja hortensis* y *Origanum vulgare*, eficacia terapéutica in vivo contra la infección por *Helicobacter pylori*”, estudio en donde utilizando ratones a los cuales se les indujo a úlcera gástrica y se les administró la combinación de dichos aceites, dando a conocer que lograron reducir la colonización por *Helicobacter pylori*; asimismo, **Brdanin S et al (2015)**<sup>10</sup> realizaron un trabajo de investigación sobre la “Actividad antimicrobiana de orégano (*Origanum vulgare* L.) y extractos de albahaca (*Ocimum basilicum* L.)”, mencionando que dichas especies son fuente rica en compuestos fenólicos y otros compuestos secundarios con actividad antimicrobiana, que podrían estar sujeto a un rol preventivo adicional en la infección por *Helicobacter pylori* in vivo. Además **Chun S, Vattem D, Lin Y (2005)**<sup>18</sup> estudiaron los “Antioxidantes fenólicos del orégano clonal (*Origanum vulgare*) con actividad antimicrobiana contra *Helicobacter pylori*”, mencionando que algunos componentes fenólicos han demostrado tener actividad antimicrobiana contra *Helicobacter pylori* asociada a

úlceras pépticas; de igual manera, **Lin Y et al (2005)**<sup>34</sup> en su trabajo de investigación sobre “Inhibición de *Helicobacter pylori* y la ureasa asociada por el orégano y las sinergias fitoquímicas de arándano”, ensayaron un tratamiento combinado de una mezcla de extracto de orégano y arándano para la inhibición de *Helicobacter pylori* en placa, mostrando inhibición específica de la ureasa en ensayos de placa y caldo.

Si bien es cierto al realizar un cuadro comparativo sobre los halos de inhibición promedio de claritromicina y el aceite esencial de orégano al 100 %, 50 % y 10 % frente a las 5 cepas de *Helicobacter pylori* codificadas como: M - 019, M - 020, M - 021, M - 025 y M - 030, se evidenciaron 28,8 mm de diámetro para el antibiótico claritromicina; mientras que, el aceite esencial de orégano arrojó halos de inhibición promedio de 15,7 mm de diámetro a la concentración del 100 %, 8,7 mm al 50 % y 6,0 mm de diámetro al 10 % (tabla N° 06 y gráfico N° 06); que contrastados, con la prueba no paramétrica de U de Mann – Whitney, se obtuvieron valores de  $p < 0,05$ , indicando diferencia significativa. Si se observan los resultados obtenidos en este estudio, se puede notar claramente que claritromicina alcanzó halos de inhibición promedio superiores al aceite esencial de orégano; la razón sería que éste es un antibiótico de elección para los problemas gástricos que cursan con infección de *Helicobacter pylori*, cuyo mecanismo de acción interfiere en la síntesis de proteínas en las bacterias sensibles ligándose a la subunidad 50S ribosomal lo cual provoca un bloqueo en la transpeptidación, un bloqueo en la translocación y así se impide la elongación de la cadena peptídica. En tal sentido, el efecto antibacteriano del aceite esencial de orégano se debería principalmente a sus componentes mayoritarios como el timol, carvacrol y eugenol, los cuales son

compuestos fenólicos, que poseen fuertes propiedades antimicrobianas contra diversos microorganismos, incluyendo *Helicobacter pylori*, cuyo mecanismo de acción posiblemente es desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática provocando con ello la salida del ATP, inhibición de la actividad de las ATPasas y disminución de la fuerza motriz del protón.<sup>25</sup>

En base a los resultados obtenidos del presente trabajo de investigación, se puede decir que no se logró contrastar la hipótesis planteada; pero si se demostró que el aceite esencial de *Origanum vulgare* “orégano” tiene efecto antibacteriano in vitro frente las cepas de *Helicobacter pylori* en sus concentraciones del 100 % y 50 %, inferior a claritromicina, siendo un recurso natural terapéutico de fácil acceso y de bajo costo.

## VI. CONCLUSIONES

- Se comprobó que el aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano” tiene efecto antibacteriano in vitro inferior a claritromicina en cepas de *Helicobacter pylori*.
- Se aislaron 5 cepas *Helicobacter pylori* de las biopsias analizadas de pacientes hospitalizados en el Hospital II Es Salud de la ciudad de Cajamarca, que cumplieron con todos los criterios de inclusión.
- El aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano” al 100 % y 50 % mostró tener efecto antibacteriano in vitro frente a las cepas de *Helicobacter pylori*, alcanzando halos de inhibición promedio de 15,7 mm al 100 % y 8,7 mm de diámetro al 50 %; no mostrando efecto antibacteriano in vitro al 10 % (6 mm de diámetro).
- La claritromicina mostró un halo de inhibición promedio de 28,8 mm de diámetro frente a las cepas de *Helicobacter pylori*, reflejando el mayor efecto antibacteriano in vitro, en comparación al aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano” al 100 % en el que se evidenció un halo de inhibición promedio de 15,7 mm de diámetro.

## VI. RECOMENDACIONES

1. El aceite esencial extraído de las hojas de *Origanum vulgare* “orégano” mostró tener efecto antibacteriano in vitro frente a las cepas de *Helicobacter pylori*, razón por la cual, se recomienda realizar pruebas de sensibilidad antibiótica frente a otro tipo de bacterias.
2. Realizar algunos estudios de todas las partes de la planta de *Origanum vulgare* “orégano”, con la finalidad de dar a conocer, en cuál de ellas existe la mayor concentración metabolitos de interés terapéutico.
3. Realizar estudios para determinar el grado de toxicidad del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano”.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acevedo D, Navarro M, Monroy L. Composición química del aceite esencial de hojas de orégano (*Origanum vulgare*). Rev Información tecnológica. [Revista virtual]. 2013; 24 (4): 43 - 48 [fecha de acceso 12 de enero del 2018].  
Disponible en:  
[https://www.cielo.conicyt.cl/cielo.php?scrip=sci\\_arttext&pid=so18-07642013](https://www.cielo.conicyt.cl/cielo.php?scrip=sci_arttext&pid=so18-07642013)
2. Agudo S, Estudio molecular de los factores de virulencia y de la resistencia a claritromicina en la infección por *Helicobacter pylori*. [Tesis para optar el Grado de Doctor]. España: Universidad de Complutense de Madrid, Facultad de Medicina; 2010.
3. Albado E, Sáez G, Grabiél S. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). Rev Med Hered. [Revista virtual]. 2001; 12 (1): 16 – 19. [fecha de acceso 03 de marzo del 2018].  
Disponible en:  
[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1018-130X200](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X200)
4. Alvarado P, Grajales H. Protocolo toma de muestra de sangre en la especie ovina. Colombia: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2011.

5. Ballesta M. Implicaciones clínicas asociadas a las infecciones provocadas por *Helicobacter pylori*. [Tesis para Grado en Farmacia]. España: Universidad de Sevilla, facultad de Farmacia; 2016.
6. Bayona M. Condiciones microbiológicas para el cultivo de *Helicobacter pylori*. Revista de Asociaciones Colombianas de Gastroenterología, Endoscopia digestiva, Coloproctología y Hepatología. [Revista virtual]. 2013; 28 (2): 94 – 99. [fecha de acceso 06 de marzo del 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcg/v28n2/v28n2a02.pdf>
7. Bermúdez P. Aceites esenciales: Uso Industrial de Plantas Aromáticas y Medicinales. Rev E.T.S.I. de Montes – UPM. [Revista virtual]. 2001; 2 (4): 34 -42. [fecha de acceso 28 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://www.ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-a>
8. Bernaola E. *Helicobacter pylori* 29 años después (1983 - 2012): Epidemiología, Patogenia, Diagnóstico y Relación con la Enfermedad Periodontal. Rev. Kiru. [Revista virtual]. 2012; 9 (1): 83 – 90. [fecha de acceso 24 de enero del 2018]. Disponible en: <http://www.aulavirtualusmp.pe/ojs/index.php/Rev- Kiru0/article/viewF07/18>
9. Bilbao P. Estudio de la infección por *Helicobacter pylori* y evaluación de los métodos de diagnóstico 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 para optar el Título Profesional de Licenciado en Bioquímica]. Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas; 2006.

10. Brđanin S, Bogdanović N, Kolundžić M, Milenković M, Golić N, Kojić M, et al. Actividad antimicrobiana de orégano (*Origanum vulgare* L.) y extractos de albahaca (*Ocimum basilicum* L. Rev de Tecnologías avanzadas. [Revista virtual]. 2015; 4 (2) 05 - 10. [fecha de acceso 21 de enero del 2018]. Disponible en:  
<http://www.scindeks-clanci.ceon.rs/data/pdf/2406-2979/2015/2406-2979150>
11. Brunton L, Chabner B, Knollmann B. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12<sup>a</sup> ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2012. p 1309 - 1321.
12. Cabrera C, Marín L. Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial del rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe “Jengibre” en cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, Cajamarca – 2016. [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico]. Perú: Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo, Facultad de Ciencias de la Salud; 2016.

13. Campos M, Santos R, Arellano G, Galván M, González B, Ruiz O. Manual de Laboratorio de Análisis Bioquímico Clínico I. México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina; 2011.
14. Carhuapoma M. Composición química, actividad anti-*Helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling “urqu muña”. [Tesis para optar al Grado de Doctor en Farmacia y Bioquímica]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica - Unidad de Post Grado; 2007.
15. Cisneros S. Mecanismos de resistencia de *Helicobacter pylori* a los antibióticos amoxicilina, claritromicina, levofloxacino y metronidazol. [Tesis para optar el Título Profesional de Bacteriólogo]. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias; 2009.
16. Chávez M. Análisis de la prueba inmunológica para la detección de *Helicobacter pylori* en pacientes de 20 a 40 años del Hospital Provincial General Docente Riobamba noviembre 2013 – enero 2014. [Tesis para optar el Título Profesional de Bioquímico Farmacéutico]. Ecuador: Escuela superior politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias; 2014.
17. Chillihua K, Palomino R, Aguilar E. Aislamiento de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas de pacientes con gastritis en el Hospital Regional

del Cusco, Perú. Rev. Situa. [Revista virtual]. 2004; 13 (1): 15 – 19. [fecha de acceso 06 de marzo del 2018]. Disponible en:

[http://www.sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/situa/2004\\_n1/Pdf/a03.pdf](http://www.sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/situa/2004_n1/Pdf/a03.pdf)

18. Chun S, Vattem D, Lin Y. Antioxidantes fenólicos del orégano clonal (*Origanum vulgare*) con actividad antimicrobiana contra *Helicobacter pylori*. Rev Process Biochemistry. [Revista virtual]. (2005) 40 (1): 809 – 816. [fecha de acceso 15 de enero del 2018]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959204001189>

19. Curioni A y Arizio O. Plantas aromáticas y medicinales, labiadas. Argentina: Hemisferio Sur; 2006. p. 57 – 59

20. Clavell L, Pedrique M. Microbiología. Manual de Métodos Generales. 2ª Edición. Facultad de Farmacia: Universidad Central de Venezuela; 1992.

21. Divo A. Microbiología médica. 4ª ed. México: McGraw Hill Interamericana; 1990. p. 158 - 179.

22. Estrada E, Romero N. Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico y aceite esencial del rizoma de *Zingiber officinale* “Jengibre” en cepas de *Helicobacter pylori*, in vitro [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico]. Perú: Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo, Facultad de Ciencias de la Salud; 2017.

23. Fernández A, García C, Saéz J, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. España: editorial Seimc; 2010. p. 2 – 10.
24. Figueroa M, Cortés A, Pazos A, Bravo E. Sensibilidad in vitro a amoxicilina y claritromicina de *Helicobacter pylori* obtenido de biopsias gástricas de pacientes en zona de bajo riesgo para cáncer gástrico. Rev. Biomédica. [Revista virtual]. 2012; 32 (1): 2 – 42. [fecha de acceso 24 de febrero del 2018]. Disponible en:  
<http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/454/845>
25. García M, Palou E. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. Rev sobre temas selectos de Ingeniería y Alimentos. [Revista virtual]. 2008; 2 (2): 41 -51. [fecha de acceso 06 de julio del 2018]. Disponible en:  
[http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No5-Vol-1/TSIA-5\(1\)-Rosas-Gallo-et-al](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No5-Vol-1/TSIA-5(1)-Rosas-Gallo-et-al)
26. Garay H, Bardales J. Medios de cultivo, preparación de caldo nutritivo, agar simple, agar sangre y agar chocolate. Perú: Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo Catedra de microbiología - Guías de Práctica; 2014. p 15 – 22.
27. Harmati M, Sebestyen G, Dobra G, Terhes G, Urban E, Decsi G, et al. Mezcla binaria de aceites esenciales de *Satureja hortensis* y *Origanum vulgare*,

eficacia terapéutica in vivo contra la infección por *Helicobacter pylori*. Rev de Helicobacter. [Revista virtual]. 2016; 22 (2): 13 - 31. [fecha de acceso 21 de enero del 2018]. Disponible:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27578489>

28. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación. 5a ed. México: McGraw Hill Interamericana; 2010. p. 10 - 23.
29. Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). [en línea]. Perú: Enfermedades no transmisibles y transmisibles; 2016. [fecha de acceso 02 de febrero del 2018]. Disponible en:  
[http://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones\\_digitales/Est/Li](http://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Li)
30. Katzung B. Farmacología Básica y clínica. México: El manual Moderno; 1998. p. 45 –85.
31. Lesjak M, Simin N, Orcic D, Franciskovic M, Knezevic P, Beara I, et al. Mezclas binarias y terciarias de *Satureja hortensis* y *Origanum vulgare*, aceites esenciales como potentes agentes antimicrobianos contra *Helicobacter pylori*. Rev Phytother Res. [Revista virtual]. 2016; 30 (3): 476 - 484. [Fecha de acceso 22 de enero del 2018]. Disponible:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26686190>

32. Ley General de Salud N° 26842. [en línea]. Perú: dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas; 1997. [fecha de acceso 24 de marzo del 2018]. Disponible en:  
<http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/LEYN26842.pdf>
33. Ley General del Ambiente N° 28611. [en línea]. Perú: Ministerio del Ambiente; 2015. [fecha de acceso 25 de abril del 2018]. Disponible en:  
<http://cdam.minam.gob.pe/novedades/leygeneralambiente2.pdf>
34. Lin Y, Kwon Y, Labbe R, Shetty K. Inhibición de *Helicobacter pylori* y la ureasa asociada por el orégano y las sinergias fitoquímicas de arándano. Rev Appl Environ Microbiol. [Revista virtual] .2005; 71 (12): 8558 - 8564. [fecha de acceso 12 de enero del 2018]. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1317381/>
35. Martínez L, Gutiérrez B, Rodríguez B, Reyes O, Varona Y, Páez D. Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* mediante serología, histología y cultivo. Rev Cub Med Mil. [Revista virtual]. 2016; 45 (3): 344 - 353. [fecha de acceso 03 de abril del 2018]. Disponible en:  
<http://scielo.sld.cu/pdf/mil/v45n3/mil09316.pdf>
36. Molina J, Corti R, Doweck J, Nicholl A, Gisbert J. Avances recientes en el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. Rev. Gastroenterol

- Latinoam [Revista virtual]. 2017; 47 (1): 75 - 85. [fecha de acceso 22 de enero del 2018]. Disponible en:  
<http://www.actagastro.org/avances-recientes-en-el-tratamiento-de-la-infec>
37. Navarro J, Perea A, Pineda P, Díez O, Mercado M, Trespalacios A. Evaluación de la productividad de tres medios de cultivo para la recuperación de *Helicobacter pylori*. Rev. Cenic. [Revista virtual]. 2007; 12 (3): 79 – 86. [fecha de acceso 22 de febrero del 2018]. Disponible en:  
[https://www.academia.edu/2915180/EVALUACION\\_DE\\_LA\\_PROD](https://www.academia.edu/2915180/EVALUACION_DE_LA_PROD)
38. Orellana I, Poniachik J. Infección por *Helicobacter pylori*. Rev. Medwave. [Revista virtual]. 2003; 3 (4): 1 – 7. [fecha de acceso 18 de febrero del 2018]. Disponible en:  
<http://www.medwave.cl/link.cgi/Medwave/Reuniones/gastro/Hpylori/2337>
39. Pajares J, Gisbert J. *Helicobacter pylori*: su descubrimiento e importancia en la medicina. Revista Española de Enfermedades Digestivas. [Revista virtual]. 2006; 98 (10): 770 - 785 [fecha de acceso 06 de febrero del 2018]. Disponible en:  
[http://www.scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1130-010820](http://www.scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-010820)
40. Ramírez A, Sánchez R. *Helicobacter pylori* 25 años después (1983 - 2008): Epidemiología, Microbiología, Patogenia, Diagnóstico y Tratamiento. Rev.

- Gastroenterol. [Revista virtual]. 2009; 29 (2): 158 – 70. [fecha de acceso 28 de enero del 2018]. Disponible en:  
[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1022-51292](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292)
41. Rivas F, Hernández F. *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. Rev Biomed. [Revista virtual]. 2000; 11 (3):187 - 205. [fecha de acceso 03 de marzo del 2018]. Disponible en:  
<http://www.cirbiomedicas.uady.mx/revbiomed/pdf/rb001136.pdf>
42. Solís P. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L. “orégano” y *Thymus vulgaris* L. “tomillo” como potenciales bioconservadores en carne de pollo. [Tesis para obtener el Título Profesional de Bioquímico Farmacéutico]. Ecuador: Escuela superior politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias; 2011.
43. Tonguino M. Determinación de las condiciones óptimas para la deshidratación de dos plantas aromáticas: menta (*Mentha piperita* L) y orégano (*Origanum vulgare* L). [Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial]. Ecuador: Universidad Técnica del Norte, Facultad de Ingeniería; 2011.
44. Torres L, Rodríguez B. Principales factores de patogenia en la infección por *Helicobacter pylori*. Revista CENIC Ciencias Biológicas. [Revista virtual]. 2008; 39 (1): 52 – 62. [fecha de acceso 01 de abril del 2018]. Disponible en:<sup>57</sup>  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181214889011>

45. Valdivia M, Gastritis y gastropatías. Rev. gastroenterol. [Revista virtual]. 2011; 31(1): 38 - 43. [fecha de acceso 09 de enero del 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1022-51292011000100008&sc>
46. Zea D, Bayona M. Actividad antimicrobiana de productos naturales contra *Helicobacter pylori*. Revista Venezolana de Salud Pública. [Revista virtual]. 2017; 5 (1): 19 - 26. [Fecha de acceso 26 de marzo del 2018]. Disponible: <https://revistas.ucla.edu.ve/index.php/rvsp/article/view/376>

# ANEXOS

## ANEXO N° 01

### FICHA DE DATOS DE REGISTRO DE PACIENTES

#### FICHA DE REGISTRO DE DATOS DEL PACIENTE

- **CÓDIGO:** .....
  
- **EDAD:** ..... **SEXO:** .....
  
- **LUGAR DE PROCEDENCIA:**  
.....
  
- **SIGNOS Y SÍNTOMAS:**  
.....
  
- **DIAGNÓSTICO:** .....
  
- **TRATAMIENTO ANTISECRETOR O ANTIULCEROSO.**  
.....
  
- **TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO PREVIO 4 SEMANAS:**  
.....
  
- **FECHA DE TOMA DE MUESTRA:** .....
  
- **HORA:** .....

## ANEXO N° 02

### GALERÍA DE FOTOGRAFÍAS



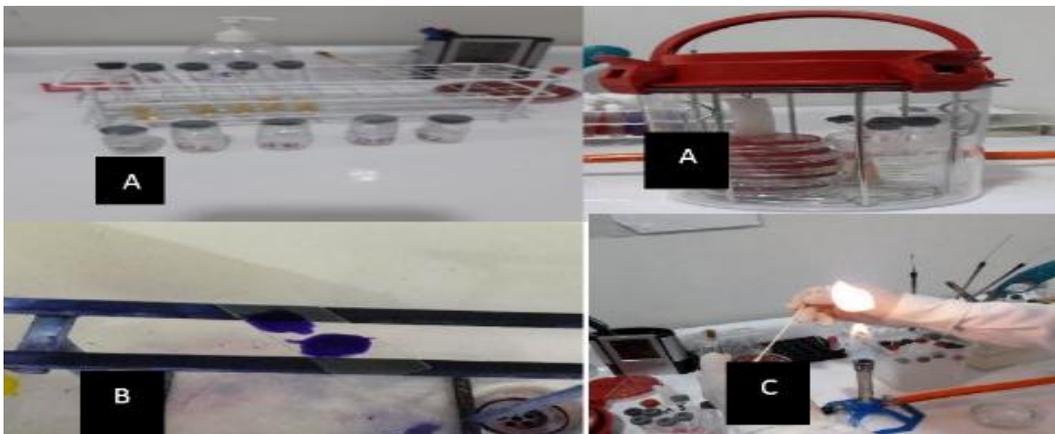
**Fotografía N° 1:** Obtención de sangre desfibrinada de cordero. A) Preparación del material para la toma de muestra sanguínea, B) Preparación del animal, C) extracción sanguínea, D) Desfibrinación de la sangre, E) conservación de la sangre para ser trasladada al laboratorio.



**Fotografía N° 2:** Preparación del caldo urea. Pesado de los antibióticos para suplementar el medio de cultivo.



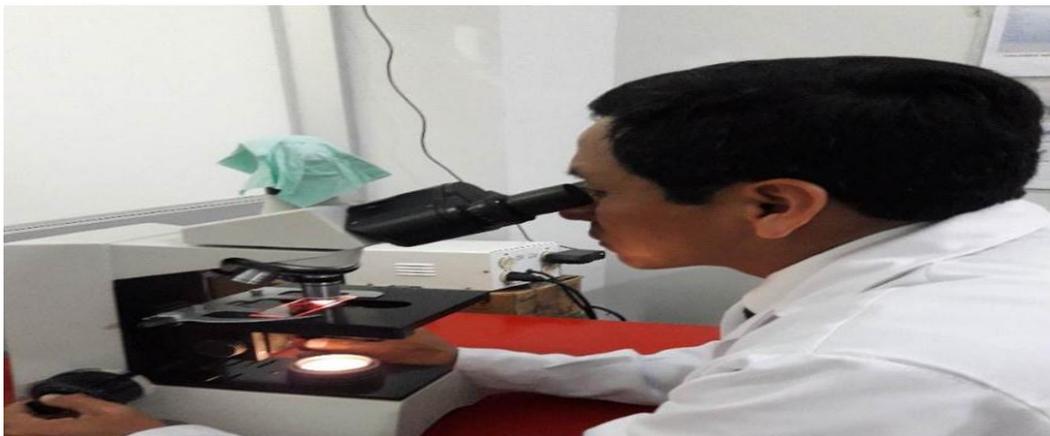
**Fotografía N° 03:** Preparación de agar sangre y agar chocolate enriquecida con sangre desfibrinada de cordero al 20 % más suplemento antibiótico.



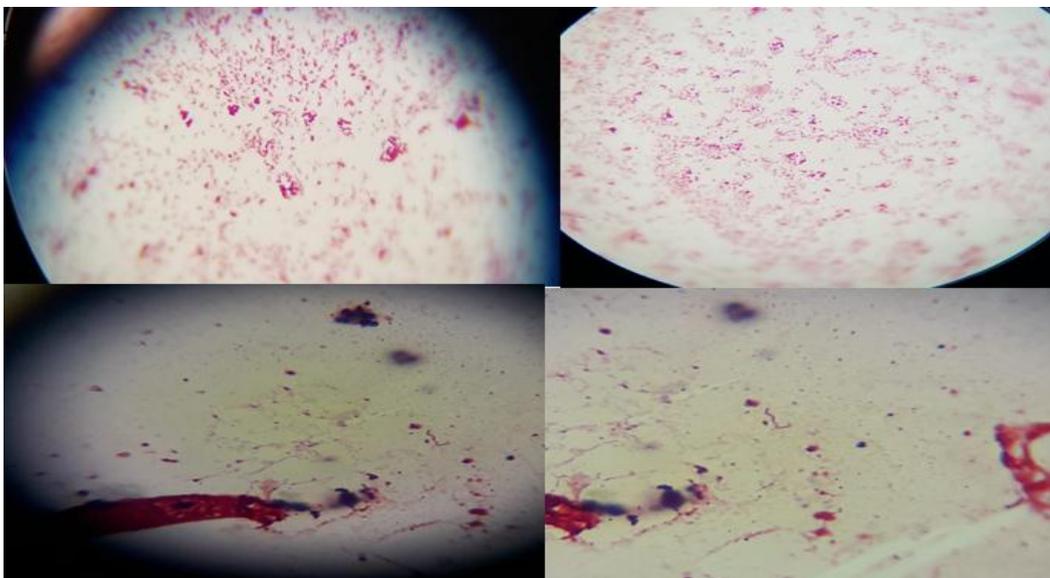
**Fotografía N° 04:** Prueba para la identificación y aislamiento de *Helicobacter pylori*. A) Prueba de la ureasa, B) Coloración Gram modificada, C) Cultivo del macerado.



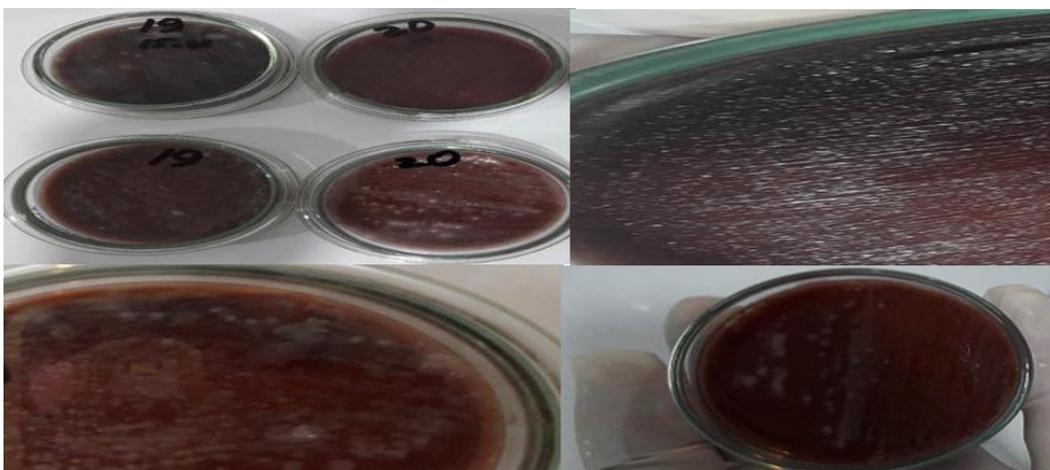
**Fotografía N° 5:** Prueba de ureasa del macerado de biopsias gástricas.



**Fotografía N° 6:** Lectura de láminas con ayuda del Microbiólogo Jorge Bazán Mayra.



**Fotografía N° 7:** Observación de la coloración Gram modificada del del macerado de biopsias gástricas.



**Fotografía N° 8:** Observación macroscópica del aislamiento de las cepas *Helicobacter pylori*.



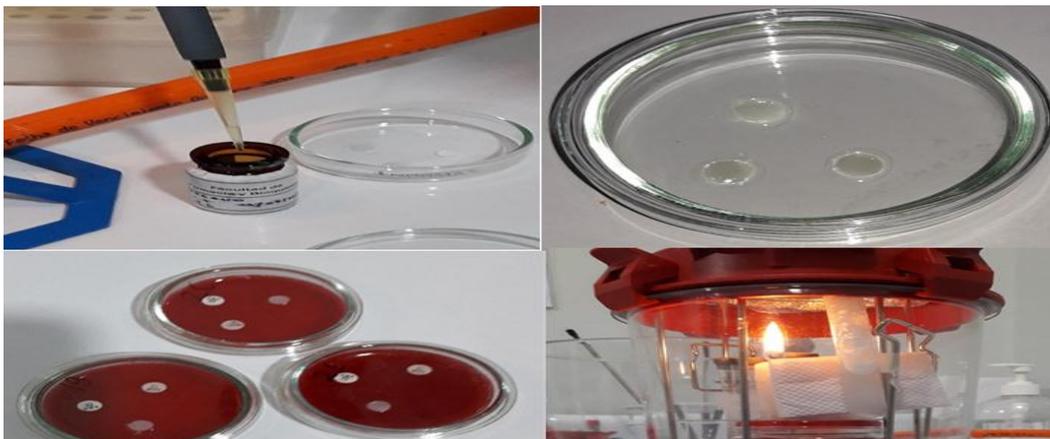
**Fotografía N° 9:** A) Reacción de oxidasa positiva a *Helicobacter pylori*, B) Reacción de catalasa positiva a *Helicobacter pylori*.



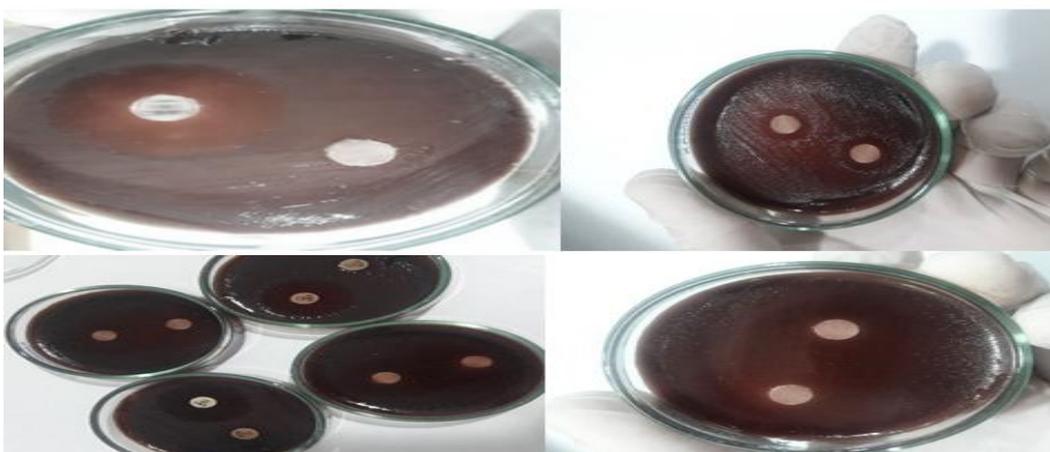
**Fotografía N° 10:** Identificación microscópica de las cepas de *Helicobacter pylori* mediante coloración Gram modificada.



**Fotografía N° 11:** Obtención del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “Orégano” mediante destilación por arrastre de vapor.



**Fotografía N° 12:** Procedimiento para determinación del efecto antibacteriano por método de Kirby Bauer.



**Fotografía N° 13:** Lectura de resultados del efecto antibacteriano.