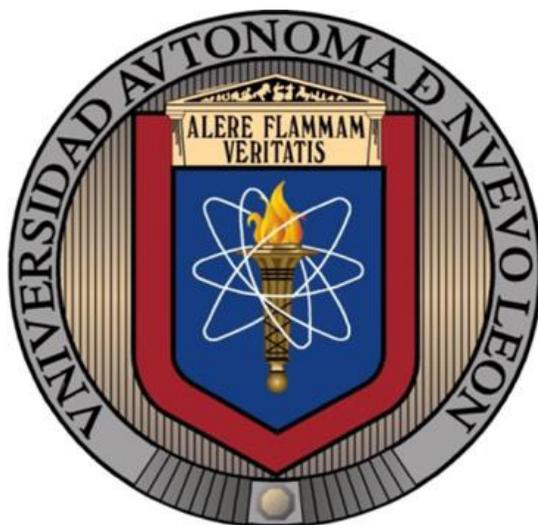


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**ACTIVIDAD ANTI-*Helicobacter pylori* DE EXTRACTOS VEGETALES Y
CARACTERIZACIÓN DEL DAÑO CELULAR AL MICROSCOPIO DE FUERZA
ATÓMICA**

POR

L.C.A. KARLA IVETTE LEAL LÓPEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

M A Y O, 2 0 1 7

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



TESIS

**ACTIVIDAD ANTI-*Helicobacter pylori* DE EXTRACTOS VEGETALES Y
CARACTERIZACIÓN DEL DAÑO CELULAR AL MICROSCOPIO DE FUERZA
ATÓMICA**

POR

L.C.A. KARLA IVETTE LEAL LÓPEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

M A Y O, 2 0 1 7

**ACTIVIDAD ANTI-*Helicobacter pylori* DE EXTRACTOS VEGETALES
Y CARACTERIZACIÓN DEL DAÑO CELULAR AL
MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA**

Comité de Tesis

DRA. MARÍA PORFIRIA BARRÓN GONZÁLEZ
Presidente

DR. RAMÓN GERARDO RODRÍGUEZ GARZA
Secretario

DRA. PATRICIA TAMEZ GUERRA
Vocal

DRA. LICET VILLARREAL TREVIÑO
Vocal

DR. SERGIO MORENO LIMÓN
Vocal

ACTIVIDAD ANTI-*Helicobacter pylori* DE EXTRACTOS VEGETALES
Y CARACTERIZACIÓN DEL DAÑO CELULAR AL
MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA

Dirección de Tesis

DRA. MARÍA PORFIRIA BARRÓN GONZÁLEZ
Director

DR. JORGE LUIS MENCHACA ARREDONDO
Director externo

***“Confía de todo corazón en el Señor, tu Dios,
y no en tu propia inteligencia; ten presente al Señor
en todo lo que hagas, y Él te llevará por el camino recto”***

Proverbios 3, 5-6

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por el don de la vida, por bendecirme con todo lo que tengo y darme la oportunidad de involucrarme en este proyecto, que me ha hecho crecer tanto profesional como personalmente. Por abrirme caminos en el ámbito laboral y escolar a lo largo de estos años, en los que me ha rodeado de personas que me han dejado enseñanzas, y por lo cual estoy enormemente agradecida.

A mis padres, quienes son todo para mí, y que gracias a Dios están aquí para ser cómplices de un logro más, gracias por ser mis pilares en la vida, y darme siempre su apoyo incondicional, por aconsejarme en mis decisiones, por darme todo, sin ellos no hubiese llegado hasta aquí. Gracias por darme lo necesario para superarme profesionalmente, por entender mis proyectos, por dejarme ser lo que quiero, siempre al pendiente de que nunca me falte nada para seguir adelante. Los amo infinitamente.

A Beto, Erika y Juan, por ser los mejores hermanos y un gran soporte, por apoyarme, molestarme y por quererme tanto. Los amo y saben que siempre estaremos unidos en todo. Gracias Beto y Karla, por regalarme a los más hermosos sobrinos, Pato y Vale, anhelo que algún día se sientan orgullosos de su tía que los ama mucho.

A la persona que ha sido mi cómplice desde hace varios años, y quien me demuestra su amor y su apoyo incondicional todos los días. Te agradezco por no dejarme sola en nada y acompañarme pacientemente en cada situación, así sea buena o mala; gracias por apoyar mis decisiones, por tu motivación, tus consejos, por regañarme cuando es necesario, por hacerme sonreír y por confiar en mí. Estoy segura que no será el último logro a tu lado. Te amo topi.

Al resto de mi familia, por brindarme siempre su cariño y apoyo. Los quiero.

Gracias a la Dra. Libertad Leal Lozano, de quien estoy segura que siempre tendré un gran apoyo, en todos los aspectos. Te quiero mucho tía, gracias por ser una gran maestra y aunque no soy tu alumna académica, te he aprendido mucho.

A la Dra. María Porfiria Barrón González, directora y asesora de este trabajo, por abrirme las puertas del laboratorio y adoptarme estos dos años. Gracias por su paciencia, esfuerzo y apoyo durante el desarrollo de mi tesis, por cada enseñanza, consejo y recomendación, tanto personal como para este proyecto.

Al Dr. Ramón Gerardo Rodríguez Garza, por aceptar ser parte de este proyecto y siempre brindarme su apoyo, tanto moral como en cuestión de materiales, por dejarme llevar a cabo algunos experimentos en su laboratorio hasta tarde, e incluso amenizar mi estancia con él.

A la Dra. Patricia Tamez Guerra, por facilitarme las instalaciones de su laboratorio para correr las pruebas moleculares.

A la Dra. Licet Villarreal Treviño, por su disposición en todo momento, por aceptar ser mi tutora, estar siempre al pendiente de mis avances, y por donarme material para realizar las pruebas bioquímicas.

Al Dr. Sergio Moreno Limón, por ser un buen tutor, y brindarme gran apoyo durante estos dos años, por regalarme algunos reactivos y sobretodo en los congresos asistidos.

Al Dr. Jorge Luis Menchaca Arredondo, por abrirme las puertas de su laboratorio en la FCFM y más aún, por facilitarme el equipo de microscopía de fuerza atómica, el cual me permitió concluir el último objetivo. Gracias Doc, por su incesante motivación y apoyo económico para algunos reactivos.

Al Dr. Ezequiel Viveros Valdéz, por siempre estar en el momento preciso en que me surgían dudas y aclararlas, por sus palabras, y sobretodo por su confianza ahora en un nuevo proyecto para mí.

A CONACYT CVU 632318, por el apoyo económico brindado durante estos dos años.

Al personal de Posgrado de la FCB, por mantenerme al pendiente de todos los trámites.
A la Facultad de Ciencias Biológicas, mi segunda casa.

A todos los que participaron de una u otra manera para que yo pudiera llevar a cabo mis experimentos; en especial, a Enriqueta Monreal Cuevas, quien amablemente me explicó algunas técnicas, y me facilitó ciertos reactivos; a Víctor Urrutia, gracias por tu paciencia durante la técnica molecular, por darte el tiempo de ir al laboratorio a explicarme y por donarme todo lo necesario para ello; a Álvaro, gracias por tu gran apoyo para sembrar y hacer crecer mis plantitas, por dejarme molestarte todas las tardes para regar y por todas las pláticas; a Juanjo, muchas gracias amigo, por todo tu apoyo desde el inicio, siempre animándome en mis días pesados; gracias Raúl por todas las veces que fui a pedirte asesoría y siempre me dabas solución o me apoyabas con los materiales, y más aun con mis dudas, sobretodo en biología molecular.

Gracias a toda la gente de Biophyscel, un gran equipo de trabajo, a todos mis compañeros del laboratorio tanto de biología como de físico matemáticas y de ciencias químicas, a Liz, Marco, Dani, David, Reyna, Karen, Omar, Dulce. Néstor, gracias por tu gran apoyo en la repetición de uno de mis bioensayos. Gracias Zulma y Mirthala por ser excelentes compañeras en mis ratos estresantes, por ayudarme a llevar a cabo algunos bioensayos, y apoyarme incluso en los más mínimos detalles, por hacerme reír y motivarme, fue más ameno trabajar con su compañía. Gracias Marco, por analizar mis células y quedarte en ocasiones hasta tarde para terminar una sólo muestra.

Gracias a las mejores compañeras y amigas, Priss, Faby y Deniss, gracias por hacer de mi estancia en el laboratorio, mucho más interesante, más alegre y más amena, gracias por las pláticas, por compartir conmigo tanto cansancio, tantas horas en bioensayos, gracias por resolver mis dudas, gracias por escucharme, por ser cómplice, por las risas, los chismes, por ser como mis hermanas académicas, las quiero mucho.

Gracias a mis compañeros de maestría, David, Héctor y Omar, por tanto esfuerzo en conjunto para superar todas las pruebas académicas.

Gracias a mis compañeros de trabajo en Laseclat, mi isla querida, ustedes saben quiénes son, gracias por su apoyo y por alentarme a terminar este escrito.

Gracias a todos los que me regalaron alguna palabra de ánimo, y que me apoyaron de una u otra forma para poder concluir este proyecto.

Nunca pierdas la fe, porque aquello por lo que has luchado, lo vas a tener.

Que nadie te diga que no, nunca.

DEDICATORIAS

A Dios, por ponerme en el momento indicado en este proyecto.

A mis padres, mis dos grandes tesoros.

A mis hermanos, mis cómplices para toda la vida.

A mis abuelos (†), sé que desde arriba se alegran de verme cumplir esta meta.

A mis sobrinos, que son mi adoración.

A Luis David, mi compañero y amor de mi vida.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	
DEDICATORIAS	
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE FIGURAS.....	
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	
RESUMEN	
ABSTRACT.....	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. <i>Helicobacter pylori</i>	3
2.1.1. Historia y descubrimiento de la bacteria.....	3
2.1.2. Generalidades	4
2.1.3. Clasificación taxonómica.....	6
2.1.4. Epidemiología	6
2.1.5. Patogénesis y virulencia.....	8
2.1.6. Cultivo de <i>H. pylori</i>	11
2.1.7. Tratamiento	11
2.2. Fitoterapia y Medicina tradicional	12
2.2.1. Material vegetal como fuente de antimicrobianos	14
a) <i>Stenocereus marginatus</i>	16
b) <i>Artemisia ludoviciana</i>	18
c) <i>Jatropha dioica</i>	20
d) <i>Glycyrrhiza glabra</i>	22
e) <i>Persea americana</i>	23
f) <i>Mentha piperita</i>	25
g) <i>Trigonella foenum-graecum</i>	28
2.3. Toxicidad	30
2.4. Actividad antioxidante	35
2.4.1. Método DPPH.....	36
2.5. Microscopía de Fuerza Atómica (MFA).....	37
2.5.1. Generalidades.....	37
2.5.2. Modos de operación	38

2.5.3. Aplicación biológica	39
3. JUSTIFICACIÓN.....	41
4. HIPÓTESIS	42
5. OBJETIVOS.....	42
5.1. Objetivo General	42
5.2. Objetivos particulares	42
6. MATERIAL Y MÉTODO	43
6.1. Material biológico	43
a) <i>Helicobacter pylori</i> #43504 fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC).....	43
b) <i>Artemia salina</i> . Los huevecillos de <i>A. salina</i> (Brine Shrimp Eggs San Francisco Bay Brand INC), fueron adquiridos en Petco, EUA.	43
c) Material vegetal	43
C1) Procesamiento del material vegetal.....	44
C2) Preparación de la solución madre o solución stock de los extractos vegetales.....	46
C3) Perfil fitoquímico de los extractos metanólicos	46
6.2. <i>Helicobacter pylori</i>	48
6.2.1. Mantenimiento del cultivo	48
6.2.2. Cinética de crecimiento.....	49
6.2.3. Caracterización molecular de <i>H. pylori</i>	49
A) Extracción del ADN de <i>H. pylori</i>	49
B) Cuantificación del ADN.....	50
C) Integridad del ADN.....	50
6.3. Bioensayos	50
6.3.1. Actividad tóxica de los extractos metanólicos sobre <i>A. salina</i>	50
6.3.2. Evaluación de la actividad biológica de extractos metanólicos sobre <i>H. pylori</i>	51
6.3.3. Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos con mayor actividad anti- <i>H. pylori</i> sobre linfocitos humanos.....	52
6.3.4. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos con actividad anti- <i>H. pylori</i>	57
6.3.5 Análisis morfométrico de <i>H. pylori</i> en presencia de extractos vegetales	58
A) Modos básicos de operación.....	58
B) Observación de la muestra.....	59
6.4. Análisis estadísticos	61
A) Toxicidad de los extractos vegetales sobre <i>A. salina</i>	61

B) Actividad biológica de los extractos vegetales sobre <i>H. pylori</i>	61
7. RESULTADOS	62
7.1. Material vegetal	62
7.1.1. Determinación de grupos funcionales y metabolitos secundarios en los extractos metanólicos	62
7.1.2 Determinación de la actividad tóxica de los extractos metanólicos de las especies vegetales sobre <i>A. salina</i>	64
7.2. <i>Helicobacter pylori</i>	66
7.2.1. Identificación.....	66
7.2.2 Cinética de crecimiento.....	70
7.3. Actividad biológica de los extractos metanólicos sobre <i>H. pylori</i>	71
A) Determinación de viabilidad celular mediante Técnica del MTT	71
B) Método turbidimétrico y recuento bacteriano en placa	77
7.4. Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos metanólicos con actividad anti- <i>H. pylori</i>	79
7.5 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos con mayor actividad anti- <i>H. pylori</i>	82
7.6. Microscopía de Fuerza Atómica	83
8. DISCUSIONES.....	90
9. CONCLUSIONES	100
8. PERSPECTIVAS	101

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Clasificación taxonómica de <i>H. pylori</i>	6
2	Clasificación del rango de toxicidad sobre <i>A. salina</i>	32
3	Etapas del procesamiento de <i>S. marginatus</i> para la obtención del extracto metanólico	45
4	Etapas del procesamiento del resto de las especies para la obtención de los extractos metanólicos	45
5	Descripción de las pruebas para detectar los grupos funcionales presentes en los extractos metanólicos	47
6	Formulación de la solución salina isotónica tamponada con fosfatos	54
7	Comparación de grupos fitoquímicos presentes en los extractos metanólicos estudiados	63
8	Determinación de la toxicidad (DL ₅₀) de extractos metanólicos sobre <i>A. salina</i>	64
9	Primers del gen vacA	68
10	Condiciones en que se realizó la extracción del ADN de <i>H. pylori</i>	69
11	Determinación de la inhibición porcentual de <i>H. pylori</i> por acción de los extractos metanólicos, así como valores de la Concentración Inhibitoria Media (CI ₅₀)	73
12	Determinación de la actividad antioxidante de <i>A. ludoviciana</i>	82
13	Determinación de la actividad antioxidante de <i>S. marginatus</i>	83
14	Comparación de los parámetros morfométricos de <i>H.pylori</i> al MFA cultivada en presencia de los extractos metanólicos de <i>A. ludoviciana</i> y <i>S. marginatus</i>	86
15	Comparación de la magnitud e imagen en 3D de <i>H. pylori</i> (control) y en presencia de los extractos metanólicos de <i>A. ludoviciana</i> y <i>S. marginatus</i>	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Aspecto morfológico de <i>H. pylori</i>	4
2	Producción de biofilm de <i>H. pylori</i>	5
3	Distribución geográfica y prevalencia de <i>H. pylori</i> a nivel mundial	7
4	Factores de virulencia de <i>H. pylori</i>	8
5	Acción patógena de <i>H. pylori</i>	11
6	Principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios en plantas	16
7	Aspecto general del cuerpo de <i>S. marginatus</i>	17
8	Aspecto de la planta <i>A. ludoviciana</i>	19
9	Aspecto de <i>J. dioica</i>	21
10	Aspecto general de la planta <i>G. glabra</i>	22
11	Planta de <i>P. americana</i>	23
12	Aspecto de la planta <i>M. piperita</i>	26
13	Planta <i>T. foenum-graecum</i>	29
14	Nauplios de <i>A. salina</i>	31
15	Reacción formada en el método DPPH	36
16	Microscopio de fuerza atómica (MFA)	38
17a	Cámara de Neubauer	55
17b	Esquema de la cámara de Neubauer	55
18	Comparación de la DL ₅₀ (µg/mL) de los extractos metanólicos evaluados sobre <i>A. salina</i>	65
19	Aspecto de <i>H. pylori</i> a nivel macroscópico	66
20	Observación de <i>H. pylori</i> en microscopio óptico	67
21	Pruebas bioquímicas para <i>H. pylori</i>	68
22	Gel de agarosa que se reveló para evaluar la pureza del cultivo de <i>H. pylori</i>	69
23	Cinética de crecimiento de <i>H. pylori</i>	70
24	Comparación de los valores de CI ₅₀ (mg/mL) de extractos metanólicos	72
25	Comparación de valores de absorbancia por la técnica de MTT del extracto de <i>S. marginatus</i> sobre <i>H. pylori</i>	74
26	Comparación de valores de absorbancia por la técnica de MTT del extracto de <i>A. ludoviciana</i> sobre <i>H. pylori</i>	75

27	Comparación de valores de absorbancia por la técnica de MTT del extracto de hoja de <i>J. dioica</i> sobre <i>H. pylori</i>	75
28	Comparación de valores de absorbancia por la técnica de MTT del extracto de raíz de <i>J. dioica</i> sobre <i>H. pylori</i>	76
29	Comparación de valores de absorbancia por la técnica de MTT del extracto de <i>G. glabra</i> sobre <i>H. pylori</i>	76
30	Comparación de valores de absorbancia por la técnica de MTT del extracto de <i>T. foenum-graecum</i> sobre <i>H. pylori</i>	77
31	Resultados de las UFC/mL de <i>H. pylori</i> con tratamientos	78
32	Aspecto de las UFC/mL de <i>H. pylori</i> en el medio Brucella	79
33	Resultados de las absorbancias a 570 nm de los tratamientos de <i>A. ludoviciana</i> y <i>S. marginatus</i> en presencia de linfocitos humanos y concanavalina A	81
34	Análisis morfométrico de <i>H. pylori</i> al MFA	84
35	Análisis morfométrico de <i>H. pylori</i> cultivada en presencia del extracto metanólico de <i>A. ludoviciana</i> y analizada al MFA	85
36	Análisis morfométrico de <i>H. pylori</i> cultivada en presencia del extracto metanólico de <i>S. marginatus</i> y analizada al MFA	87
37	Comparación de parámetros morfométricos de <i>H. pylori</i>	88

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2-azinobis-(3-3etilbenztiazolina)-6-sulfónico)
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria Media
CL ₅₀	Concentración Letal Media
CoA	Concanavalina A
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DL ₅₀	Dosis Letal Media
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
EDTA	Ácido-Etilendiamino Tetra-Acético
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido Clorhídrico
INEGI	Instituto de Información Geográfica y Estadística
KMnO ₄	Permanganato de Potasio
LPS	Lipopolisacárido
MFA	Microscopía de Fuerza Atómica
MSNM	Metros Sobre el Nivel del Mar
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NaOH	Hidróxido de Sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Proteínas Ligandos de la Penicilina
PBS	Solución Buffer de Fosfatos
PL	Peroxidación Lipídica
ROS	Especies Oxigénicas Reactivas
TBE	Tris Borato EDTA

RESUMEN

Helicobacter pylori es uno de los patógenos más relevantes a nivel mundial, ya que es causante de padecimientos gastrointestinales como gastritis, úlceras, y recientemente se ha vinculado al cáncer de estómago. Debido a que los tratamientos indicados contra la sintomatología ocasionan efectos secundarios, y a la resistencia por parte de la bacteria contra los antibióticos, se ha optado por buscar nuevos compuestos activos que puedan erradicar a *H. pylori*. Investigaciones se han enfocado en las plantas, que por muchos años se han utilizado dentro de la medicina tradicional contra padecimientos incluso los gastrointestinales, ya que poseen metabolitos que actúan como antimicrobianos. En este trabajo se evaluó la actividad biológica de los extractos metanólicos de las plantas *Jatropha dioica*, *Mentha piperita*, *Trigonella foenum-graecum*, *Stenocereus marginatus*, *Persea americana*, *Glycyrrhiza glabra* y *Artemisia ludoviciana*, en comparación con la droga ceftriaxona, mostrando que ésta última inhibe en su totalidad a la bacteria, mientras que los extractos de *A. ludoviciana* y *S. marginatus* presentan actividad inhibitoria sobre *H. pylori*. Previamente se realizó el análisis fitoquímico y toxicológico de dichos extractos, mostrando moderada toxicidad frente a *A. salina*. Además, poseen metabolitos secundarios tales como alcaloides, sesquiterpenlactonas, saponinas, esteroides, triterpenos y flavonoides, siendo quizá éstos los responsables de su actividad antimicrobiana. Respecto al análisis morfométrico al microscopio de fuerza atómica de *H. pylori* (control) y *H. pylori* cultivado en presencia de ambos extractos mencionados, se observan cambios significativos en cuanto a longitud, altura y ancho. Por último, se evaluó su efecto citotóxico sobre linfocitos humanos y su capacidad antioxidante, resultando que ambos extractos no afectan dichas células, y que el extracto metanólico de *A. ludoviciana* posee mayor actividad antioxidante que *S. marginatus*.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is one of the most relevant pathogens worldwide, because of its involvement in diseases such as gastritis, ulcers, and because it has recently been linked to stomach cancer. The treatments indicated for the symptomatology may cause side effects, in addition to the resistance by the bacterium against the antibiotics, it has been decided to search new active compounds that can eradicate *H. pylori*. Research has focused on plants, which for many years have been used in traditional medicine against many diseases including gastrointestinal, as they contain metabolites with antimicrobial activity. In this research, the biological activity of the methanolic extracts of the plants *Jatropha dioica*, *Mentha piperita*, *Trigonella foenum-graecum*, *Stenocereus marginatus*, *Persea americana*, *Glycyrrhiza glabra* and *Artemisia ludoviciana*, was evaluated in comparison with the drug ceftriaxone, showing that the latter fully inhibits the bacterium, whereas the extracts of *A. ludoviciana* and *S. marginatus* present inhibitory activity on *H. pylori*. Previously, the phytochemical and toxicological analysis of these extracts were carried out, showing moderate toxicity to *A. salina*. In addition, they have secondary metabolites such as alkaloids, sesquiterpenolactones, saponins, sterols, triterpenes and flavonoids, which may be the ones responsible for their antimicrobial activity. Regarding the atomic force microscope analysis of *H. pylori* (control) and *H. pylori* cultured in presence of the mentioned extracts, they show significant changes in length, height and width. Finally, its cytotoxic effect on human lymphocytes and its antioxidant capacity, were evaluated. Neither of the extracts affected these cells, and that the methanolic extract of *A. ludoviciana* possesses greater antioxidant activity than *S. marginatus*.

1. INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es un bacilo gram negativo, curvo o espirilado, microaerofílico, que mide de 2 a 3 nm por 3.5 por 0.5 nm de ancho y posee seis flagelos unipolares que le dan gran movilidad. Esta bacteria coloniza el estómago del 70 al 80% de la población en países en desarrollo y su presencia incrementa el riesgo de padecer gastritis, úlcera péptica y/o cáncer gástrico (Cervantes 2006; Majalca et al. 2001).

Se han encontrado factores de virulencia de la bacteria que influyen en el desarrollo de dichos padecimientos tales como adhesinas, flagelos lofotricos, la presencia de CagA, VacA, la enzima ureasa, hemolisinas, b-catenina, gastrina, mucinasa, catalasa y lipasa, pudiendo también influir aspectos medioambientales y propios del hospedero (área geográfica, genética, sistema inmune, edad, raza, alimentación, estatus socioeconómico, entre otros) (Graham et al. 1991; Segal et al. 2001).

Existen diferentes terapias que han sido prescritas para el tratamiento de *H. pylori* con diferentes combinaciones de agentes terapéuticos tales como antibióticos, bismuto e inhibidores de la bomba de protones, encontrándose como primeras opciones, la terapia triple estándar, la terapia secuencial y la terapia concomitante o cuádruple (Sierra et al. 2014).

Sin embargo, la resistencia emergente de dicho microorganismo a los antibióticos utilizados, especialmente omeprazol, claritromicina y metronidazol, limita su uso en el tratamiento de infecciones en países desarrollados, y más aún, en países en vías de desarrollo (Lind et al. 1999; Sherif et al. 2004). El crecimiento de la resistencia a los antibióticos y las complicaciones específicas, son los mayores problemas de las medicinas utilizadas, los cuales demandan la búsqueda de nuevos compuestos, especialmente de fuentes naturales, como lo son las plantas medicinales (Zahra et al. 2011).

Tanto la OMS, como los Centros de Prevención y Control de Enfermedades (CDC), han reconocido esta necesidad y dentro de sus estrategias para enfrentar el problema

mundial que representan los microorganismos causantes de importantes enfermedades, han definido una en la que se propone el desarrollo de nuevos antibióticos, señalando que en el reino vegetal es posible encontrar moléculas que cumplan con los requisitos químicos y fisiológicos para igualar el mecanismo de acción de los antibióticos (Fauci 1998; Mitscher 1975; Iwu et al. 1999).

A la fecha se han aislado un gran número de compuestos procedentes de organismos vegetales y se estima que constituyen tan sólo el 10% de los metabolitos secundarios (Schultes 1978). Entre estos se encuentran fenoles, quinonas, taninos, cumarinas, flavonas y alcaloides. Un porcentaje importante posee cierta actividad frente a los microorganismos (Domingo y López 2003).

Actualmente, a nivel mundial se reporta cada vez más una gran variedad de compuestos y agentes provenientes de fuentes naturales con actividad antimicrobiana, y específicamente se ha demostrado el potencial que tienen estos metabolitos secundarios para inhibir a *H. pylori* de manera *in vitro*, destacándose flavonoides, taninos, cumarinas, terpenos, quinolonas y alcaloides. Sin embargo, sólo a muy pocos de ellos se les ha demostrado que mantienen su actividad *in vivo* (Palacios et al. 2011).

La presente investigación se enfocó en la evaluación de la actividad antimicrobiana sobre *H. pylori*, de extractos metanólicos de algunas especies vegetales; realizándose la caracterización de parámetros morfométricos al microscopio de fuerza atómica, así mismo se determinó la actividad toxicológica sobre *Artemia salina* y la actividad citotóxica sobre linfocitos humanos. Finalmente, se realizó la determinación de la actividad antioxidante de los extractos con mejor actividad antimicrobiana.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Helicobacter pylori*

2.1.1. Historia y descubrimiento de la bacteria

En 1970, el médico australiano Robin Warren realizó diversas investigaciones clínicas e histológicas, directamente de muestras de biopsias gástricas que él mismo colectó de pacientes con gastritis crónica, dándose cuenta mediante ciertas técnicas que realizaba a los tejidos, que existía en ellos una bacteria que predominaba en todas las lesiones histológicas de gastritis (Warren 2002).

Tiempo después, en el año 1981, conoció al médico australiano Barry Marshall, con quien complementó sus trabajos de investigación, para así llegar a la conclusión de que en muestras de mucosa gástrica normal y sana, no estaba presente la bacteria, sino que solamente se podía observar en mucosa gástrica inflamada. Marshall continuó su apoyo a Warren al tratar de aislar y cultivar dicha bacteria, a la cual se le dio el nombre de *Campylobacter pylori*, por su parecido morfológico con dicho género, y por la localización primordial en la región pilórica (Pajares y Gisbert 2006; Marshall 2002).

La nueva bacteria había sido incluida en la especie *Campylobacter* de forma provisional. Con los miembros del grupo compartía la morfología espiral, la capacidad de microaerofilia, la posibilidad de crecimiento en el mismo medio de cultivo y otras características bioquímicas. Diferían, sin embargo, en dos rasgos esenciales: la presencia de múltiples flagelos en uno de los extremos y su gran contenido de la enzima ureasa (Jones et al. 1985).

Por esta razón, se llevaron a cabo una serie de investigaciones y análisis moleculares, encabezadas por Goodwin, para por fin demostrar que *Campylobacter pylori* era realmente un miembro diferente que no pertenecía al género *Campylobacter*, sino que presentaba características morfológicas y estructurales bioquímicas más parecidas al nuevo género *Helicobacter*. En 1989, con la base científica de los datos existentes,

publican un artículo en el que expuso los hechos que avalaron el cambio de nombre de *Campylobacter* a *Helicobacter pylori*. Desde entonces, este nombre ha sido reconocido y aceptado por la comunidad científica de todo el mundo (Goodwin et al. 1989).

2.1.2. Generalidades

H. pylori (Figura 1) es una bacteria patógena gram negativa, pleomórfica, es decir, que usualmente se encuentra en forma de espiral (de donde deriva su nombre), pero que puede convertirse en células cocoides, bajo un ambiente hostil (Cervantes 2006).

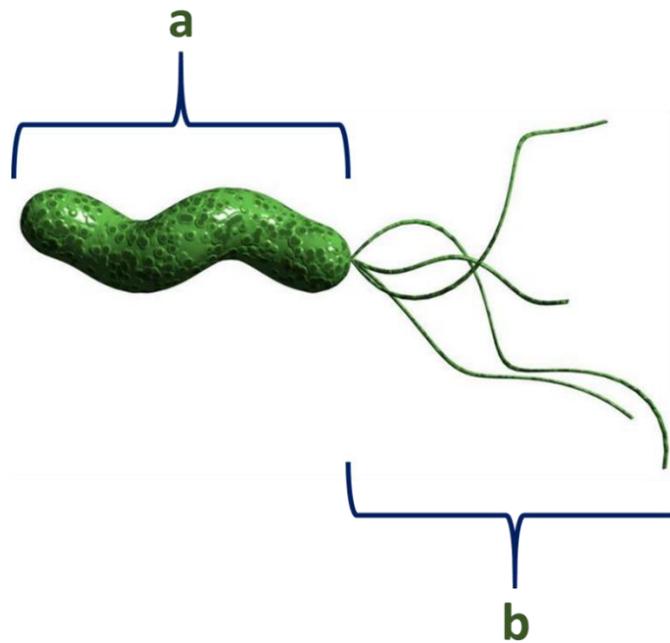


Figura 1. Aspecto morfológico de *H. pylori*. (a) Morfología en espiral de bacilo, (b) flagelos lofotricos característicos de *H. pylori*

Además de ser oxidasa y citocromo-oxidasa positiva, su característica bioquímica más importante es la producción de ureasa, una enzima que cataliza la hidrólisis de la urea en amonio y bióxido de carbono. Esta característica le permite sobrevivir al ambiente ácido del estómago, neutralizando su entorno para colonizar el estómago. Esta actividad

enzimática está altamente conservada en todas las cepas de *H. pylori*, por lo cual se utiliza como un método de diagnóstico (Amieva y El-Omar 2008; Mazari et al. 2001).

Dentro de su mecanismo, *H. pylori* produce un biofilm o biopelícula, el cual consiste en una matriz de polisacáridos, que le ayudan a la bacteria a sobrevivir en ambientes desfavorables y a resistir la acción de los antibióticos, al no permitir la entrada de algunos compuestos (Figura 2). Diversos trabajos demuestran la importancia de éste en la supervivencia y colonización en el estómago (Carron et al. 2006; Cammarota et al. 2012; Souto y Vieira 2008).

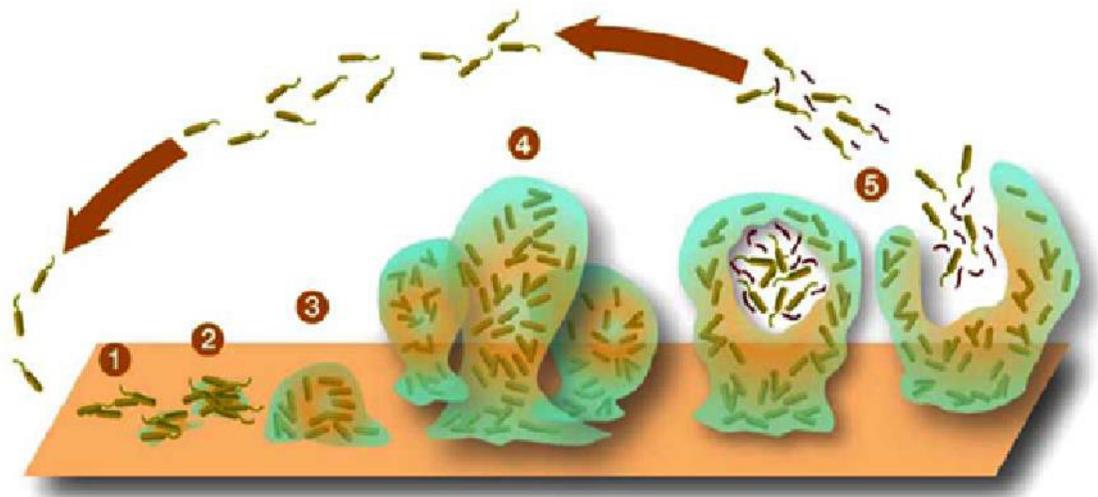


Figura 2. Producción de biofilm y vesículas de *H. pylori*. 1) Células de *H. pylori* colonizan la superficie, 2) producción extracelular de polímeros, 3) y 4) arquitectura madura del biofilm, 5) células de *H. pylori* son liberadas a partir del biofilm (Tomado de Dr. Ettingers's biofilms protocol for lyme and gut pathogens/advancedhealing.com)

2.1.3. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de *H. pylori* se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1
Clasificación taxonómica de *H. pylori*
(Marshall y Warren, 1984)

Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Epsilonbacteria
Orden	Campylobacterales
Familia	Helicobacteraceae
Género	<i>Helicobacter</i>
Especie	<i>pylori</i>

2.1.4. Epidemiología

Se estima que más del 50% de la población a nivel mundial está infectada de *H. pylori*, sin embargo, la prevalencia de infección depende de factores socioeconómicos y de la infraestructura sanitaria. Se ha observado una gran variación entre las diversas zonas estudiadas, existiendo una clara diferenciación entre los países desarrollados y aquellos que están en vías de desarrollo (Pueyo et al. 1998).

Se calcula que en países desarrollados la prevalencia de infección es del 10 al 40% y esta cifra se incrementa hasta un 80 ó 90% en países en vías de desarrollo (Pérez et al. 2004; Taylor y Parsonnet 1995). En el caso de México, se ha reportado una seroprevalencia del 66% y que la infección se adquiere a edades tempranas, alcanzando un 80% en adultos jóvenes entre 18 y 20 años de edad, con una tasa de incremento del 5% anual durante los primeros 10 años de vida (Torres et al. 1998). Así mismo, países en vías de desarrollo, como Nigeria o India, presentan elevados porcentajes de prevalencia (arriba del 80%). Por el contrario, países desarrollados como Francia, llegan a presentar un 25% de prevalencia en la población (Holcombe et al. 1992; Graham et al. 1991) (Figura 3).

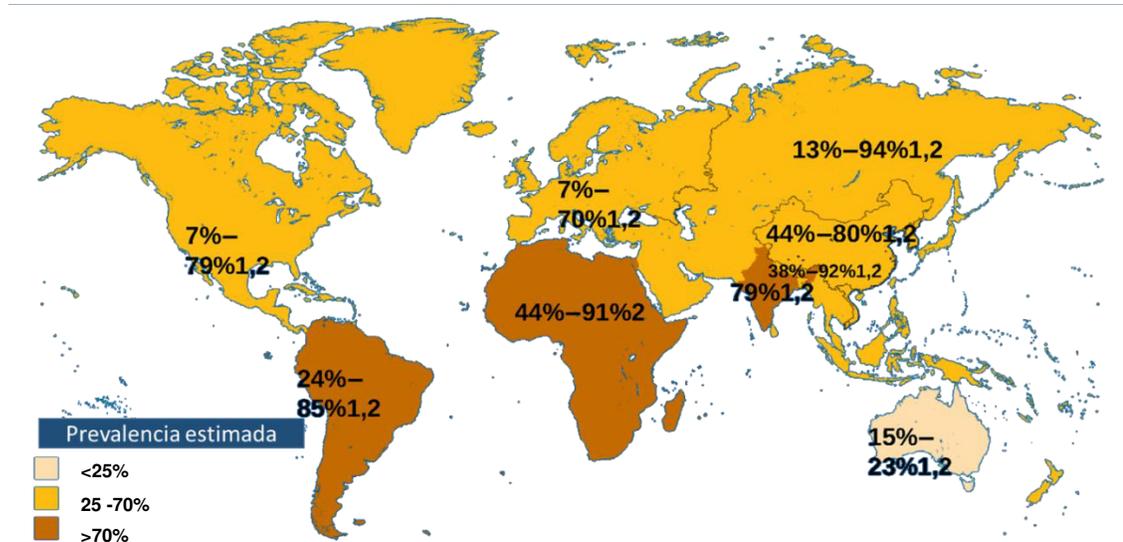


Figura 3. Distribución geográfica y prevalencia de *H. pylori* a nivel mundial. Se observa la distribución de este microorganismo a nivel mundial, indicándose que en México existe una prevalencia de entre el 25 y el 70%

La diferencia en cuanto a la prevalencia en unos países y en otros, radica en la incidencia de la infección durante la infancia. Se sabe que la adquisición natural de la infección por esta bacteria ocurre principalmente dentro del núcleo familiar y es la madre quien infecta al hijo en los primeros años de vida, aunque también se ha encontrado que se puede contagiar de una persona a otra. La ingestión parece ser el medio más viable de adquirir a la bacteria y puede alcanzar la cavidad bucal vía gastro-oral, fecal-oral y oral-oral. En los países desarrollados la prevalencia es baja en las primeras décadas de la vida, luego aumenta progresivamente a partir de los 40 ó 50 años. Una vez alcanzado el máximo pico de prevalencia, ésta tiende a presentar una curva discretamente descendente. Esto se explica por la historia natural de la gastritis asociada a *H. pylori*, que con el paso de los años iría progresando hacia la atrofia, lo que conlleva un cambio del ecosistema propicio para la persistencia de la bacteria (Mitchel 2001; Taylor y Blaser 1991; Pounder y Ng 1995).

El aumento de la presencia de la bacteria en la edad adulta se debe también a las condiciones de hacinamiento y falta de higiene (vivir en casas pequeñas, compartir las camas, ausencia de agua caliente, entre otros factores). En países desarrollados, este microorganismo parece no ser adquirido del ambiente, y las personas menores de 40

años de edad, por lo general no están infectadas o se tiene un bajo porcentaje de prevalencia (Webb et al. 1994). La vía de transmisión más común de *H. pylori* es probablemente la vía fecal-oral, ya que la bacteria ha sido detectada y asociada con agua y alimentos contaminados. En personas con reflujo ha sido encontrado el microorganismo e incluso su ADN en cavidad bucal y placa dental. Recientes observaciones en pacientes infectados, mostraron que pueden dispersar la infección mediante aerosol o salpicaduras de vómito o diarrea (Hulten et al. 1996; Li et al. 1996; Mapstone et al. 1993; Parsonnet et al. 1999).

2.1.5. Patogénesis y virulencia

H. pylori puede infectar a cualquier humano, sin embargo, no todos desarrollan enfermedad, dependerá mucho de la cepa que haya invadido y de las condiciones propias del hospedero, ambientales, genéticas y de alimentación. Esta bacteria presenta características estructurales y morfológicas que favorecen su penetración dentro de la mucosa y consecuentemente la colonización de la cavidad gástrica y la mucosa del duodeno (Figura 4).

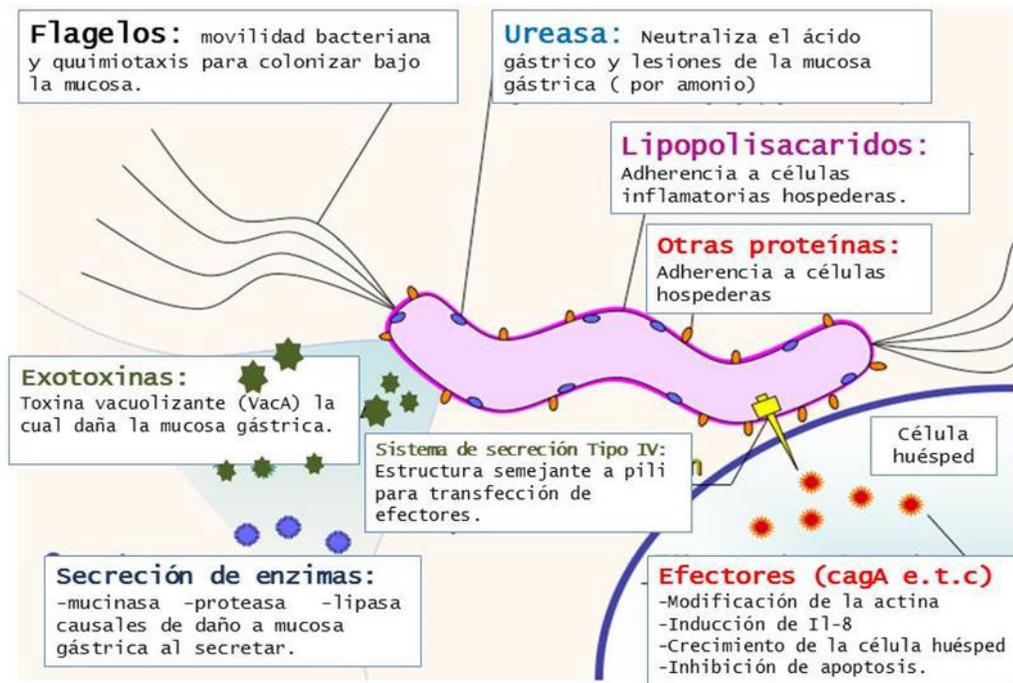


Figura 4. Factores de virulencia de *H. pylori*. En la imagen se observan diversos mecanismos de virulencia de *H. pylori* hacia la célula hospedero. Estos mecanismos pueden ser enzimáticos o a través de estructuras como pili, toxinas o proteínas

Durante el proceso de penetración, la bacteria inicia utilizando sus flagelos lofotricos para poder penetrar hasta el estómago, estos flagelos están compuestos por proteínas denominadas flagelinas, las cuales son codificadas por los genes *flaA* y *flaB* (Rivas y Hernández 2000; McGee y Mobley 1999). La bacteria se sirve de la ureasa para poder hidrolizar la urea, produciendo amonio y dióxido de carbono, permitiendo así rodearse de un medio alcalino y protegerse de la secreción ácida del estómago (Koneman et al. 1997). Una vez adentrada la bacteria, necesita adherirse a la mucosa gástrica para así iniciar el proceso de colonización; esto lo realiza mediante adhesinas, que consisten en proteínas glicoconjugadas o lípidos bacterianos. Cuando *H. pylori* alcanza la capa epitelial, se adhiere a través de las adhesinas BabA, SabA, AlpA, AlpB, Hopo y HpA (Dunn et al. 1990; Fox et al. 1992; Cover et al., 1991; Eaton et al. 1992). La adherencia de la bacteria a los receptores de las células del huésped induce cambios celulares, los cuales incluyen una señal de transducción, permitiendo la infiltración de células inflamatorias como los neutrófilos y los monocitos (Geis et al. 1993; Josenhans et al. 1995). También existen enzimas como las fosfolipasas A2 y C, que juegan un papel importante dentro de la patogenia de *H. pylori*, al degradar los componentes lipídicos de la mucosa que le proporciona integridad. De igual manera, existen otras enzimas relacionadas con la actividad proteolítica, como la catalasa y la superoxidasa dismutasa que protegen a la bacteria de los metabolitos tóxicos, producto de los procesos oxidativos de defensa de los macrófagos y neutrófilos (Wadstrom et al. 1996).

Otro factor de virulencia es el lipopolisacárido (LPS) que posee en su antígeno “O” los carbohidratos de Lewis “x” o Lewis “y” o ambos. Estos antígenos son glicoconjugados con diferente número de residuos de fucosa, los cuales pueden ser de 4 tipos (Mahdavi et al. 2002; Moran 1999). Los antígenos de Lewis participan en la patogénesis ayudando al microorganismo a evadir la respuesta inmune durante la colonización del estómago, favoreciendo a la bacteria su permanencia en el nicho gástrico, y por otro lado induce una respuesta autoinmune contra los antígenos de Lewis que expresa *H. pylori* y que son compartidos por las células eucariotas contribuyendo a un daño directo o indirecto (Bliss et al. 1998; Abdulhamid et al. 2000; Aspinall y Monteiro 1996).

Otros dos factores de virulencia importantes y que han sido muy estudiados son la citotoxina vacuolizante VacA, codificada por el gen *vacA* presente en todas las cepas de *H. pylori*, y la proteína CagA codificada por el gen *cagA* que se encuentra en la membrana externa, que al parecer no presenta citotoxicidad. Por sí misma se le considera altamente inmunogénica, así como también un marcador de virulencia.

Las cepas de *H. pylori* *cag+* se adhieren a las células del epitelio gástrico, donde inducen la secreción de un mediador inflamatorio como la interleucina-8 (IL-8), a través de la activación del factor nuclear kappa beta (NF-kB) (Evans et al. 1998; Xiang et al. 1995; Segal et al. 1996). También se ha observado que la proteína CagA activa la transcripción del factor AP-1 y la cascada de las cinasas ERK/MAP permitiendo la expresión de los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun* (Xiang et al. 1995).

La presencia de la citotoxina vacuolizante VacA está asociada con daño en el tejido epitelial y la úlcera péptica y está implicada en el desarrollo de enfermedades gástricas. Tiene un efecto citopático sobre cultivos celulares, además de ser responsable de la formación de vacuolas *in vivo* en células del epitelio gástrico (Nomura et al. 1994; Bernard et al. 1995; Rudi et al. 1998).

Condiciones como gastritis atrófica, dispepsia, úlcera péptica, y adenocarcinoma gástrico, son usualmente asociadas con una infección de *H. pylori* (Covacci et al. 1999). De hecho, *H. pylori* ha sido designada como carcinógeno de clase I por la OMS, y su erradicación ha sido reportada como beneficiosa en la prevención de desórdenes gástricos, especialmente, úlceras y cáncer (Figura 5) (Hernández 2001).

En numerosos casos, los individuos infectados nunca llegan a desarrollar ningún tipo de síntoma. Incluso se estima que más del 70% de las infecciones son asintomáticas. En ausencia de un tratamiento basado en antibióticos, una infección por *H. pylori* persiste aparentemente durante toda la vida.

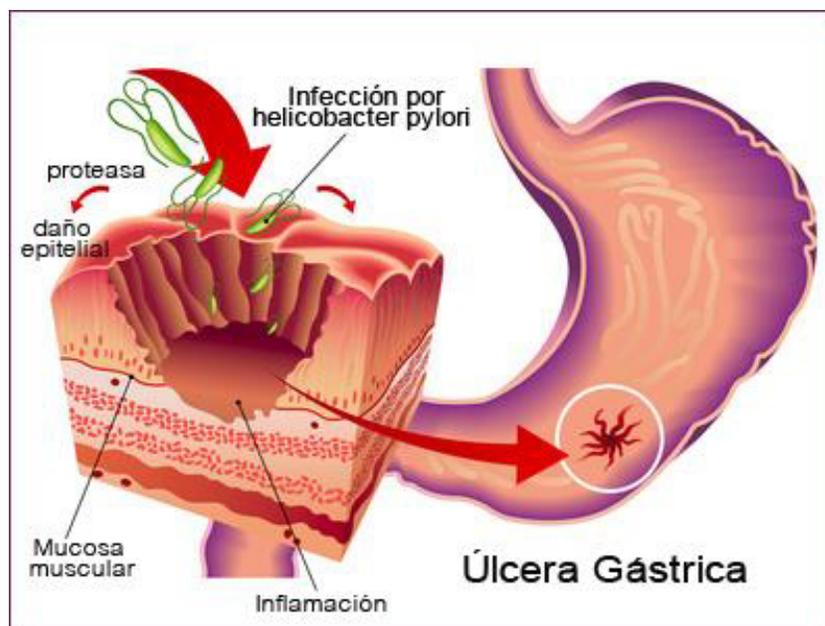


Figura 5. Acción patógena de *H. pylori*. Se observa en la luz gástrica la penetración de las células de *H. pylori* por acción de proteasas, ocasionando daño epitelial

2.1.6. Cultivo de *H. pylori*

El cultivo se realiza principalmente, a partir de biopsias de mucosa gástrica; sin embargo, se logra también empleando muestras extra-gástricas, como placa dental, heces fecales, saliva y muestras obtenidas a partir de esófago. Los crecimientos típicos, se obtienen entre 4 a 7 días, en condiciones de 5-10% O_2 ; 5-10% CO_2 ; 80-90% N_2 ; humedad de 95% y temperatura de 35 a 37 °C. Para su pleno crecimiento, se emplean medios de cultivo complejos, suplementados con sangre o suero fetal, vitaminas y antibióticos (Blanchard & Nedrud 2012; Siavoshi et al. 2012; Abrante et al. 2012; Joo et al. 2010; Stevenson et al. 2003; Cellini et al. 2010; Bayona 2013).

2.1.7. Tratamiento

Hay diversos esquemas para el tratamiento de una infección causada por *H. pylori*. Sin embargo, un tratamiento óptimo aún no ha sido definido, y no existe un tratamiento con un sólo antibiótico que pueda erradicarla. La multiplicidad de fármacos, la dosis y la duración del tratamiento así como las pautas para erradicarlo es muy diversa, por lo que la decisión sobre escoger uno u otro fármaco para el tratamiento es difícil. Históricamente, una combinación de 2 ó 3 antibióticos, ha sido usada para la

erradicación de la infección. Estos incluyen claritromicina, ceftriaxona, amoxicilina, metronidazol, tetraciclina, fluoroquinolones, tinidazol, entre otros. Estos antibióticos, generalmente se usan en combinación con agentes antisecretores, tales como bombas inhibitoras de protones, o con sales de bismuto. Varias combinaciones de estos agentes han mostrado ser efectivos con diferentes tasas de eficacia en la erradicación y tolerabilidad (Garza et al. 2014). La asociación de metronidazol con bismuto o metronidazol, bismuto y amoxicilina o tetraciclina son las que más se utilizan. Su duración oscila entre los 7 y 28 días aproximadamente. Otros tratamientos utilizan la combinación de un antibiótico con un inhibidor de la bomba de protones, como la combinación de amoxicilina y omeprazol. Ésta ha presentado una eficacia de entre el 60-70%. Actualmente se utilizan terapias triples asociando un antisecretores potente con dos antibióticos tal como el omeprazol, con claritromicina y amoxicilina o metronidazol o tinidazol (Lara et al. 2003; Zullo et al. 2003; Sanjuro et al. 1999 y Bazzoli 2001).

La droga de elección para el tratamiento de *H. pylori* es la ceftriaxona, que consiste en un antibiótico bactericida, de acción prolongada para uso parenteral, de la clase de las cefalosporinas de tercera generación, por lo que tiene acciones de amplio espectro en contra de organismos grampositivos y gramnegativos. El anillo betalactámico es parte de la estructura de las cefalosporinas, por lo tanto, la ceftriaxona es un antibiótico betalactámico. El modo de acción de estos antibióticos es la inhibición de la síntesis de la pared celular de las bacterias, específicamente por unión a unas proteínas bacterianas llamadas “proteínas ligandos de la penicilina (PBS)”.

Este antibiótico se usa con frecuencia en combinación con antibióticos macrólidos y/o aminoglucósidos para el tratamiento de neumonía comunitaria y nosocomial. Es también el primer tratamiento de la meningitis bacteriana (Goodman y Gilman 2006).

2.2. Fitoterapia y Medicina tradicional

Las plantas medicinales han acompañado al ser humano a lo largo de su historia. Hipócrates basaba su enseñanza en las propiedades curativas de la farmacognosia, mientras que el médico Paracelso, oponiéndose a las creencias de su tiempo afirmaba

que las enfermedades se debían a agentes externos al cuerpo y que pueden ser combatidas por medio de sustancias químicas, asentando así las bases de la medicina alternativa y la idea de utilizar fármacos que tengan propiedades específicas, aclarando que todo fármaco puede ser un tóxico, dependiendo de la dosis. Por miles de años la medicina y los productos naturales han estado estrechamente relacionados mediante el uso directo de plantas medicinales y “venenos” de origen vegetal, basado en el conocimiento tradicional sobre los mismos por los diferentes grupos étnicos situados en todos los rincones del mundo (Háuad 2010).

Uno de los factores que ha influido en el auge de la fitoterapia es la gran confianza que merecen estos “remedios” de origen natural en amplios sectores de la población, ya que en general ofrece unos márgenes terapéuticos más amplios que los fármacos sintéticos con una menor proporción de efectos secundarios. La fitoterapia constituye una herramienta que puede resultarnos muy útil como complemento terapéutico; será suficiente para prevenir o curar un estado patológico, o como coadyuvante o simplemente como medida paliativa de determinados síntomas. Por ello aspira a ocupar su espacio en la asistencia sanitaria, especialmente en el tratamiento de afecciones leves o moderadas y en enfermedades crónicas, no sólo para huir de la iatrogenia medicamentosa, sino para enriquecer sus posibilidades terapéuticas (Vanaclocha y Cañigüeral 2003).

El desarrollo de antibióticos, agentes antineoplásicos o antimicrobianos son solo ejemplos puntuales de la importancia del aislamiento y caracterización de productos naturales a partir de plantas usadas en la medicina popular, dado que a partir de éstas se pueden obtener sustancias con diferentes efectos farmacológicos (Dahanukar et al. 2000).

Newman et al. (2003), reportaron que el 61% de los 877 fármacos de bajo peso molecular son derivados de productos naturales. Ellos concluyeron que los productos naturales continúan siendo fuente de nuevos fármacos, especialmente para el desarrollo de agentes antimicrobianos, anticancerígenos y antihipertensivos. De esta manera, tanto

en los Estados Unidos de Norteamérica como en la Unión Europea existen ambiciosos programas de búsqueda (screening) (Schwartzmann et al. 2002; Raskin et al. 2003) de nuevas biomoléculas en 250,000 especies de plantas conocidas en nuestro planeta y de las cuales el 50% se encuentran en las regiones tropicales del mismo (Taylor 1995).

México cuenta con una gran diversidad de plantas en sus diferentes zonas geográficas. Muchas de ellas tienen uso medicinal de larga tradición pero no han sido investigadas fitoquímicamente para establecer la estructura de los compuestos bioactivos (Mann 1994). La Secretaría de Salud, por medio de la Dirección de Medicina Tradicional y Desarrollo Intercultural ha implementado diversas estrategias, entre ellas validar la actividad biológica a diversas plantas medicinales mexicanas, para promover el uso seguro de las mismas (Háud 2010).

2.2.1. Material vegetal como fuente de antimicrobianos

Las plantas son fuente potencial de agentes antimicrobianos usadas en diversos países. Alrededor del 60 al 90% de la población en países en desarrollo utilizan la medicina de origen vegetal. Tradicionalmente, los extractos vegetales crudos se utilizan como medicina herbal para el tratamiento de enfermedades infecciosas humanas (Alviano y Alviano 2009; Zhang et al. 2006).

Las plantas son ricas en una gran variedad de fitoquímicos, tales como taninos, alcaloides, terpenoides y flavonoides, entre otros, que se han aislado y caracterizado, y se ha comprobado que tienen propiedades antimicrobianas (Dorman y Deans 2000; Talib y Mahasneh 2010). Aunque el mecanismo de acción y la eficacia de estos extractos crudos vegetales, aun no se ha validado completamente de manera científica, se sabe que sus componentes activos son los responsables de mediar respuestas importantes del hospedero (Cruz et al. 2007; Ruberto et al. 2000).

La prevalencia a nivel mundial, de enfermedades infecciosas, causadas principalmente por bacterias, es un gran problema de salud pública (Zhang et al. 2006; Paterson 2008). Aunado al reciente surgimiento de la resistencia a antibióticos y problemas de toxicidad

relacionados, se limita el uso de antibióticos, provocando el resurgimiento en la investigación de la función antimicrobiana de las plantas contra cepas de bacterias resistentes (Alviano y Alviano 2009).

En el mundo vegetal es frecuente, que sólo en una parte de la planta radique su actividad farmacológica, y por tanto la que determina que una simple especie botánica adquiera el título de planta medicinal. Puede tratarse de la raíz, de la corteza del tronco o de las hojas de un árbol o arbusto. En otras ocasiones la actividad de la planta se localiza en las semillas, las flores, los frutos, o la parte aérea de la planta. La acción farmacológica de una determinada planta medicinal depende en la mayoría de los casos de varios principios activos y no sólo de uno aislado, existiendo sinergismos y acciones coadyuvantes entre ellos, de modo que por lo general resulta más adecuada la acción de toda la planta en su conjunto que la de un determinado compuesto (Vanaclocha y Cañigüeral, 2003).

La Farmacognosia es la ciencia que estudia las “drogas”, considerando el término droga como cada una de estas partes activas del vegetal, responsables de su utilización terapéutica, siendo los principios activos aquellas sustancias, de composición química establecida, responsables de la acción farmacológica de las drogas, siendo en buena parte de los casos los verdaderos compuestos utilizados en terapias, o al menos los que hacen justificable el empleo de muchas plantas medicinales. La mayoría de los principios activos que se obtienen de las plantas medicinales proceden del metabolismo secundario, ilustrado en la Figura 6. Estos, se encuentran en las drogas en porcentaje raramente superior al 1%, son por ello moléculas poco abundantes e inmersas en células vegetales junto a otras moléculas, muchas de las cuales presentan estructuras muy relacionadas.

El género *Stenocereus* es conocido también como *Pachycereus*, y está representado por 19 especies aproximadamente, las cuales son semidomesticadas ya que son utilizadas para crear cercas vivas. Es por esto que estas especies han sido introducidas en varios estados de México, convirtiéndose en especies naturalizadas cuyas poblaciones tienden a aumentar y difundirse. *S. marginatus* es nativa de los estados de Hidalgo, San Luis Potosí, Guanajuato, Puebla, Colima, Michoacán, Guerrero, Morelos y Querétaro.



Figura 7. Aspecto general del cuerpo de *S. marginatus*. (a) se observan las “costillas” representativas, (b) proliferación de ejemplares que son empleados como cercas vivas

La descripción taxonómica de *S. marginatus* es la siguiente:

Reino: Plantae
Subreino: Tracheobionta
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Caryophyllidae
Orden: Caryophyllales
Familia: Cactaceae
Subfamilia: Cactoideae
Tribu: Pachycereae
Género: *Stenocereus*
Especie: *marginatus*

En México se le conoce como cactus, órgano, chilayo, pitayo y orégano de zopilote. El nombre del género proviene del griego *stenós*, que significa delgado, debido a que los

tallos y los artículos son más delgados que en el resto de las plantas de tipo cereus. Una peculiaridad de esta planta es que presenta multiplicación por esqueje, es decir, si un tallo se injerta en otro o se introduce en la tierra, puede reproducirse o multiplicarse. De esta manera saldrán brotes nuevos, verticales, a partir de las areolas localizadas hacia arriba, y las raíces se desarrollarán a partir de las areolas del tallo en contacto con el suelo. Se ha comprobado que la propagación de esta manera, asegura un crecimiento mucho más rápido que las plantas obtenidas a partir de semillas.

La planta en su totalidad consiste de tallos fotosintéticos; su época de floración es de marzo a abril, y la producción de frutos de abril a junio. Requiere forzosamente de condiciones de luz natural y calor. Su crecimiento es lento. La pulpa del fruto es un alimento dulce y fresco, y su importancia nutricional radica en su alto contenido de azúcares, además del aporte vitamínico que ofrece (vitaminas B, C y E) y su capacidad antioxidante (Beltrán et al. 2009).

A esta planta se le han asignado algunos usos medicinales; en el estado de Morelos, se usa para aliviar el dolor de oído, tomando una rodaja de la planta, la cual se asa al rescoldo del “tecuil” y se pone un pedacito de ésta en el oído. En Guanajuato se emplea la parte aérea a manera de té, como antirrábico, además de ser común su uso para lavar el cabello con la maceración de esta misma parte. En Puebla, lo utilizan para pintar el cabello. En Guerrero, se usa para remediar la insolación de los animales, entre otros usos (Pimienta y Nobel 1994).

b) *Artemisia ludoviciana*

A. ludoviciana es una planta perteneciente a la familia Asteraceae, que se distribuye desde el sur de Canadá, Estados Unidos de Norteamérica, México y hasta Guatemala. Es una planta herbácea perenne, aromática al estrujarse, erguida y que llega a medir hasta 1.5 m de altura (Figura 8). Tiene sus ramas grisáceas o blanquecinas y sus hojas están divididas en 3, con forma de listones alargados, por el envés son peludas y blanquecinas y verdes en el anverso; éstas pueden llegar a medir hasta 15 cm de largo, son enteras y lineares a lanceoladas, elípticas, obovadas o profundamente divididas; las

flores están agrupadas en cabezuelas paniculadas o racimos foliosas, con un receptáculo hemisférico, y las flores periféricas llegan a ser de 5 a 12, y las flores del disco, de 6 a 15; éstas, al estrujarse despiden un olor característico.



Figura 8. Aspecto de la planta *A. ludoviciana*.

Se aprecia en la imagen claramente la forma característica de las hojas, las cuales brotan de manera alargada y de color grisáceo

Habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado, desde el nivel del mar a los 3900 msnm. Puede ser cultivada en huertos familiares, crece a orillas de caminos, en terrenos de cultivo abandonados y es común en vegetación perturbada de bosques tropicales caducifolio, subperennifolio y perennifolio, bosque espinoso, matorral xerófilo, bosque mesófilo de montaña, bosques de encino, de pino, mixto de pino-encino y de junípero.

Los nombres populares de la planta son estafiate, istafiate, maistra, rosábari, astafiate, ajenjo, entre otros. Se le conoce desde la antigüedad y actualmente como tratamiento antihelmíntico. En los estados de Nuevo León, Durango, Veracruz, Baja California y

Chihuahua, se utiliza para aliviar el dolor de estómago a manera de té. En ocasiones se menciona que para el dolor provocado por helmintos se debe de tomar un té de flores secas. Otros usos menos frecuentes son para reumas, nervios y bilis. Desde el siglo XVI, es referenciada por Martín de la Cruz como planta medicinal de amplias propiedades. Actualmente se conocen estudios farmacológicos en los que se ha detectado la presencia de aceites esenciales, pero su actividad en estudios biológicos ha sido poco estudiada (Argueta et al. 1994; Rzedowski y Rzedowski 1990).

Se recomienda su uso para el tratamiento del dolor de estómago, retortijones, cólicos estomacales o intestinales, dolor e inflamación en la boca del estómago, etc. Son múltiples los padecimientos que conciernen al aparato digestivo y para los cuales el istafiate se emplea frecuentemente. Así mismo, se emplea en padecimientos respiratorios como anginas, bronquitis, catarros, resfríos, tos, tos ferina y otros.

c) *Jatropha dioica*

Esta planta consiste en un arbusto que va de los 50 cm a 1.50 m de altura. Vulgarmente se conoce como sangre de drago, y esto se debe a que posee un líquido incoloro que cambia a rojo oscuro al contacto con el aire. Sus ramas son de color rojizo con las hojas largas, sus flores son pequeñas y en grupos de color rosa y los frutos son globosos, de 1.5 cm de largo conteniendo una semilla (Figura 9). *J. dioica* es originaria de México. Habita en sitios de climas seco y semiseco, desde los 1100 a los 2550 msnm.



Figura 9. Aspecto de *J. dioica*, en la cual se aprecia el tallo (t), hojas (h) y flor (f)

El uso medicinal que con mayor frecuencia se da a esta planta es para evitar la caída del cabello para lo cual se cuecen los tallos, la planta entera o la raíz machacada en agua, y con este líquido se enjuaga el cabello después de lavarlo, cada tercer día. Es también empleada en várices y golpes, de manera que se hierve la planta y se aplica en forma de cataplasma, o se cuece y se ponen lienzos diariamente sobre los golpes. El agua resultante de la cocción es utilizada en forma de baños para quitar la sarna o en lavados para aliviar la infección de golpes, heridas y granos, aseando previamente con jabón. Por otro lado, para los ojos irritados o eliminar las nubes en los ojos, se debe exprimir el fruto sobre ellos dejando caer dos o tres gotitas. También se recomienda aplicar una gota de látex sobre la piel para sacar espinas, dos gotas en las muelas picadas para provocar su desprendimiento, frotar en la parte afectada para contrarrestar el efecto de las úlceras, y masticar las raíces o tallos o ambos para amacizar los dientes (Argueta et al. 1994).

En el siglo XX, Maximino Martínez la relata como antidisentérica, antiescorbútica, antiséptica, astringente, para la dermatosis, hemorroides, piorrea y como tónico capilar. De la raíz se han identificado tres diterpenos, la citlalitriona, jatrofona, y riolosatriona y un esteral, el R-sitosterol. De las raíces se obtiene un aceite esencial, resina, saponinas, un alcaloide y ácido oxálico. De los tallos, emana un látex rico en taninos. Se ha demostrado que un extracto acuoso de la raíz ejerce una actividad antibiótica contra *Staphylococcus aureus*. Además, en el hombre, se ha demostrado que los

problemas de movilidad dental se corrigen con la aplicación de extractos etanólicos de tallos y raíces (Argueta et al. 1994).

d) *Glycyrrhiza glabra*

Glycyrrhiza glabra es una herbácea perenne con raíces estoloníferas que alcanza 1 m de altura, con hojas pinnadas de alrededor de 7 a 15 cm de largo compuestas por 9 a 17 folíolos. Las flores, de 80 a 120 mm de largo, son púrpuras o azul pálido y surgen en pequeñas inflorescencias. El fruto es una vaina oblonga de unos 2 a 3 cm con varias semillas. Las raíces son estoloníferas, es decir, que se extienden horizontalmente y rebrotan, propagando así la planta (Figura 10).



Figura 10. Aspecto general de la planta *G. glabra*,
en donde se observan las hojas (h) y la
flor (f)

Esta planta, mejor conocida como regaliz, ha sido conocida y utilizada en fitoterapia en todo nuestro país, pues en ella se manifiesta una gran concentración de principios activos, sobre todo en la corteza de la misma (30 a 40% de glicirricina). Uno de los principales campos de actuación lo encontramos en el tracto digestivo. El regaliz está indicado en las úlceras gastroduodenales, por el efecto antiinflamatorio y antiácido, facilitando la secreción de mucosa. Por esta razón y en adición a que provoca un aumento en las secreciones biliares, así como por sus efectos carminativo, bactericida y antiespasmódico, lo convierten en un producto ideal para proteger el tracto digestivo. Se

ha procurado justificar estos efectos apoyándose en los principios activos de la planta por separado, pero a pesar del extenso conocimiento sobre ellos, sólo la sinergia de los mismos es capaz de explicarla (Argueta et al. 1994).

e) *Persea americana*

Persea americana es un árbol de tamaño mediano a grande que llega a alcanzar una altura de 20 m. Sus hojas son más largas que anchas y con la punta alargada, de color verde oscuro por la parte de arriba y pálidas por la parte de abajo, y cuando se estrujan son olorosas. Las flores se encuentran en la unión de la hoja con el tallo y son de color verde crema. Los frutos, en forma de pera y de color verde oscuro, son carnosos y aceitosos, con una semilla que mide de 5 a 6 cm de largo (Figura 11).



Figura 11. Planta de *P. americana*. La imagen muestra el aspecto del árbol (A) y el fruto (B)

Es originario de América tropical y está adaptado a climas cálido, semicálido y templado desde los 40 hasta los 3100 msnm. Se cultiva en distintas regiones de México y está asociado a bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio y perennifolio, matorral xerófilo, bosques mesófilo de montaña, de encino y de pino. La planta del aguacate es frecuentemente reportada en el tratamiento contra áscaris o parásitos. Se utiliza tanto la cáscara de la semilla como el fruto en infusión, tomada en ayunas durante 3 ó 4 días, o 3 veces al día hasta que se expulsen los parásitos, o el cocimiento de la hoja, tomado tveces al día antes de comer para eliminar a los mismos. También es empleada en trastornos digestivos como las diarreas, en casos de disentería, dolor del bazo,

estreñimiento, gases del estómago y vómito, entre otros malestares digestivos. A la cáscara del fruto se le atribuye la propiedad antihelmíntica; el polvo del hueso o semilla es utilizado en problemas estomacales y contra las diarreas atónicas.

La semilla, es la parte de la planta de la cual se tiene más información química. Ésta contiene un aceite en el que se han detectado los esteroides 5- y 7-dehidroavenasterol, campesterol, colesterol, estigmast-7-en-3 β -ol y beta-sitosterol, así como el alfa-tocoferol. Otros componentes de la semilla son los flavonoides catequina y el epíisómero, persea gratissima biscatequina y persea proantocianidina, el heterociclo de oxíno-2-tridecinil-furano, el sesquiterpeno ácido absícico, alquenos y alquinos de cadena corta. En las hojas se han detectado los flavonoides catequín, epicatequín, cianidín, procianidína-1, A-2, B-1, B-2, B-3, B-4, B-5, C-1, D-1, D-2, E y G y quercetín. La cáscara del fruto contiene los flavonoides catequin y glucosil-para-cumarato y galactósido de cianidín, procianidín B-1, B-2, C-1, E y G, y el componente fenílico estragol. En el fruto se han identificado los sesquiterpenos ácidos absícico, dihidro-faseico y su glicósido y el alcaloide de isoquinolina dopamina y el alcaloide del indol 5-hidroxi-triptamina. Se ha comprobado actividad antibiótica en un extracto de semillas preparado con éter de petróleo, frente a las especies de bacterias *Staphylococcus aureus* y *Sarcina lutea* (*Micrococcus luteus*). La actividad antitumoral de un extracto metanólico preparado con hojas frescas fue observada *in vitro* en un cultivo de células inducidas por el virus de Epstein Barr (Argueta et al. 1994).

En estudios con animales han sugerido actividad hipotensora en extractos acuosos y etanólico-acuoso, preparados con hojas y administrados a ratas por la vía intravenosa e intragástrica. Esta actividad también fue observada en perros tratados por la vía intravenosa con extractos acuosos y etanólicos, preparados con hojas y tallos. La actividad espasmogénica y relajante del músculo liso se ha observado en extractos acuosos y etanólicos preparados a partir de hojas y tallos de esta planta, en diferentes modelos experimentales utilizando órganos aislados de conejo (duodeno) y cobayo (íleon). Otra actividad biológica comprobada en esta planta fue la molusquicida, estudiada con extractos etanólicos y de hexano-acetato de etilo preparados con las hojas,

así como en extractos acuosos y etanólicos preparados de semillas. Se ha demostrado que una fracción no saponificable obtenida a partir de frutos de esta planta es inmunoestimulante, según se pudo comprobar en experimentos con ratones tratados por vía intraperitoneal.

La actividad bactericida se debe a la presencia de uno de los compuestos alifáticos no saturado oxigenado en el carbono 17, tratándose del 1, 2, 4-trihidroxiheptadeca-16-ene, que se encuentra en la pulpa y en las semillas de esta planta. Algunos autores le asignan al flavanol 4, 8-biscatequín, el cual ha sido aislado de semillas, la actividad antitumoral comprobada frente al Sarcoma 180 en ratones y ratas (Argueta et al. 1994).

f) *Mentha piperita*

La *M. piperita* es una planta híbrida perenne descubierta por Mirtcham en el siglo XVII. Sus tallos son cuadrangulares, ascendentes, ramosos, rojizos o violáceos, con discreta pilosidad que pueden alcanzar 90 cm de altura. Las hojas son ovaladas-oblongas, lanceoladas, redondeadas en la base, color verde intenso, vellosas por el envés, finamente dentadas y pecioladas. Las flores son púrpuras o violáceas, dispuestas en agrupaciones glomerulares compactas; corola tubular dividida en cuatro partes (Figura 12).



Figura 12. Aspecto de la planta *M. piperita*, en la cual se aprecian las hojas (h) y la flor (f)

A esta planta se le conoce vulgarmente como hierbabuena, hierbabuena china, hierbabuena de menta, hierbabuena de olor, malva, menta, menta inglesa, yerbabuena. Es una hierba de 20 a 80 cm de altura. Los tallos son cuadrados y ramificados. Sus hojas con la parte axial un poco más ancha que la distal, puede tener o no pelos, de olor y sabor agradable, son muy aromáticas. Las flores en espigas terminales, de color púrpura y en ocasiones blancas. Se considera a la hierbabuena como originaria de Europa, Asia y África boreal. Habita en climas cálido, semicálido, semiseco, seco, templado y frío, en un rango altitudinal amplio desde el nivel del mar hasta los 2000 msnm. Es una planta ampliamente cultivada en huertos familiares y se adapta a diferentes condiciones climáticas y ecológicas. Aunque son múltiples y variados los usos medicinales que se le atribuyen a la hierbabuena, la mayoría de ellos están destinados a resolver desórdenes de tipo digestivo como acidez estomacal, bilis, coraje, estreñimiento, infección intestinal, gastritis y mal de estómago, por mencionar algunos. Sin embargo, en Jalisco, Veracruz, Morelos, Michoacán, Estado de México, Oaxaca y Tlaxcala, es utilizada principalmente para la diarrea. También como remedio contra parásitos intestinales, que se adquieren debido a la falta de higiene en los alimentos (Yadegarinia et al. 2006).

Se prepara la hierbabuena en infusión y es administrada por vía oral. Es recomendada contra ampollas en la piel, diabetes, dolor de corazón, sordera, tos, anginas y enfriamiento, sólo en Zacatecas. Otros padecimientos en los que se usa la hierbabuena son el dolor de cabeza, dolor de aire, cólicos, amibiasis, ascariasis y picaduras de alacrán y además se le considera como antidismenorreico (Yadegarinia et al. 2006).

Las partes aéreas de la planta contienen un aceite esencial rico en mentol. Otros monoterpenos detectados en el aceite esencial son el 3-(5'-5' dimetil-tetrahidrofurano-2'-4'), carvacol, carvona, carveol y su acetato; dihidro-carvona, cineol, cinerol, ácido citronélico, criptona, alcohol cumínico, dipenteno, beta-farneseno, geranial, ácido geránico, acetato de geraniol, hept-5-en-2-ona, 6 metil jasmonato, lavandulol, limoneno y varios derivados; linalol, mentofurano, acetato y valeriato de mentol, iso- y neo-mentona; mirceno, pineno, alfa- y beta-pineno, piperitol, piperitona, acetato de pulezol, terpenín-en-4-ol, terpineno, alfa-terpineol, acetato dihidro-terpineol, terpinoleno, tujona y timol. Otros componentes de la esencia son los sesquiterpenos alfa-amorfeno, cardineno, alfa cardineno, óxido de cariófileno, eta-cariófileno, cedreno, cedrol, beta-copaeno, germacreno D, gurjuneno, y otros menores, los diterpenos fenilieno y p-mentano y los componentes fenílicos 2 metil-cinamoldehído de anetol, enzenol, hidroxí y dimetoxi-benzaldehído, el ácido, alcohol y cianuro encílico, cresol, guaiacol, ácido-fenil-acético y varios derivados; y vainillina (Yadegarinia et al. 2006).

También en las partes aéreas se han identificado los flavonoides cosmosín, la hidroxí y dihidroxí-tetrametoxí flavonas, himenoxín, luteolín, mentacuanona y dimetil-pseudoquitín y los componentes fenílicos ácidos cafeico, clorogénico, cumárico, litospérmico, y rosmarínico. Los rutinósidos de eriodictiol y luteolín se han encontrado solamente en las hojas. El extracto acuoso obtenido de las ramas presentó actividad antiviral contra los virus de Herpes simplex, de la influenza A, de la enfermedad de Newcastle y de la viruela y los extractos acuoso y etanólico contra el virus de Rinderpest (Yadegarinia et al. 2006).

Se ha demostrado que el aceite esencial ejerce una actividad antibiótica contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*; tanto el aceite esencial como el extracto acuoso de las flores, fueron activos contra el hongo *Candida albicans* (Yadegarinia et al. 2006).

El extracto acuoso de las ramas presentó actividad antimutagénica sobre *Salmonella typhimurium* TA98. Se observaron también, una acción depresora del sistema nervioso central en pez dorado con el aceite esencial aplicado externamente; una acción anticonvulsiva en rata con el extracto etanólico de las hojas por vía oral; una actividad diurética en ratón de un extracto acuoso de hojas, por vía intragástrica a la dosis de 300 mg/kg. En el hombre se han demostrado las acciones analgésicas y antiinflamatoria del aceite esencial aplicado externamente, carminativa, colerética, descongestionante nasal y espasmolítica, cuando se trataron espasmos menstruales y en pacientes con colitis, aplicando el aceite por vía oral, disminuyó el tiempo de vaciado gástrico en pacientes normales y con dispepsia. Se deben al aceite esencial varias de las acciones farmacológicas de la planta, como se indica antes. Se ha demostrado que una fracción de taninos de las ramas ejerció actividad antiviral sobre los virus de Herpes simplex y de la enfermedad de Newcastle (McKay y Blumberg 2006).

La hierbabuena es una planta introducida a la medicina tradicional que goza de un gran prestigio para aliviar trastornos digestivos que involucran acidez estomacal, infección intestinal diarrea y gastritis. Su efectividad en estos casos ha sido validada experimentalmente (Argueta et al. 1994).

g) *Trigonella foenum-graecum*

T. foenum-graecum consiste en una planta erecta anual que llega a medir 50 cm de altura y puede crecer con ramificaciones, en donde sus hojas se presentan trifoliadas o como láminas oblongo-lanceoladas, que miden hasta 5 cm. Las flores, que empiezan a surgir en los meses de marzo y abril, son pequeñas, de color amarillo con un tamaño de 12 a 18 mm y que emergen de las axilas de las hojas. Los frutos se presentan casi rectos y aplastados con un extremo pronunciado, llegando a medir de 50 a 110 mm de largo.

Las semillas son parduscas, de un tamaño de aproximadamente 4.5 cm de largo, son oblongas, romboidales, con un surco profundo que las divide en dos lóbulos desiguales. Se presentan en vainas en conjuntos de 10 a 20 semillas (Figura 13).

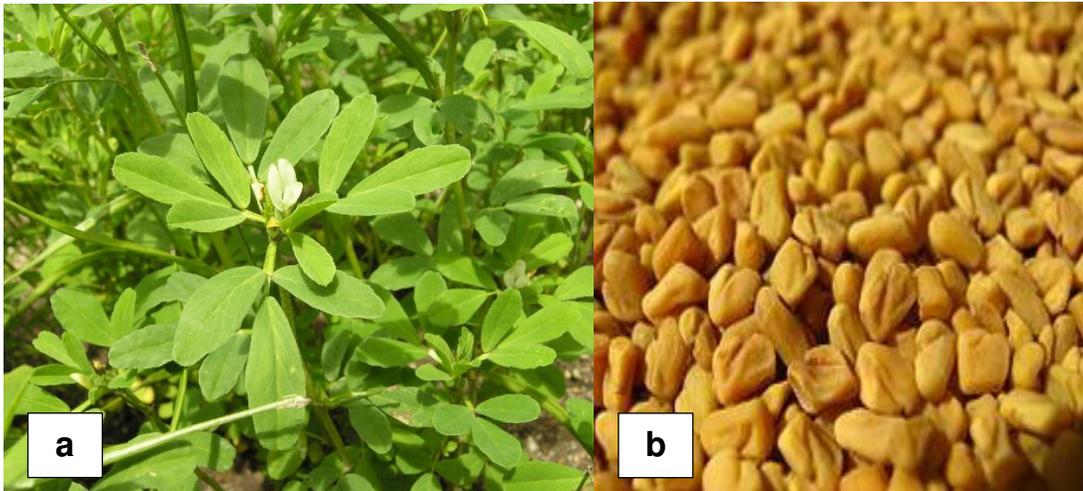


Figura 13. Planta *T. foenum-graecum*. En la imagen de la izquierda (a) se aprecian las hojas y flor características de la planta en su máximo crecimiento. En la imagen de la derecha (b) se observa la forma y aspecto de la semilla

Esta planta es originaria de los países mediterráneos y se trata de una especie utilizada desde la antigüedad como un forraje de cultivo. Debido a la característica de ser aromática, se ha utilizado también como especia. Sus nombres comunes son fenogreco, alholva o helba, según el país en que se presenta. Se cultiva ampliamente en la India y los países vecinos, en el norte de África y Asia occidental. Se conoce que la harina de semillas de fenogreco presenta propiedades terapéuticas y estimulantes, sobretodo en animales de ganado. Con respecto a su uso medicinal, esta especie está indicada contra dolores abdominales, bronquitis, tos, diabetes, asma, ictericia, fiebre, estreñimiento, además de usarse como digestivo y contra problemas gastrointestinales. Se ha revelado que sus componentes principales activos consisten en saponinas esteroideas, diosgenina (presente en la semilla), la trigonelina (alcaloide presente también en la semilla) y trigofoenósidos (Sincich 2002).

2.3. Toxicidad

a) Determinación de ensayos sobre *Artemia salina*

Desde tiempos muy antiguos las plantas han sido utilizadas como terapia medicinal para ciertas afecciones. Muchas especies han demostrado su potencial para proveer drogas efectivas contra enfermedades, causadas tanto por parásitos, como por bacterias, hongos e incluso virus. Es por esto que muchos investigadores se dedican a evaluar extractos vegetales como estrategia para hallar nuevas alternativas terapéuticas frente a estos padecimientos. Sin embargo, es bien conocido que muchas plantas pueden ocasionar reacciones tóxicas a quienes las utilizan (Roig 1974).

Por esta razón, se llevan a cabo investigaciones con el propósito de determinar, además de la acción farmacológica, la toxicidad de estas plantas medicinales. La evaluación toxicológica preclínica se realiza rutinariamente en ratones. Pero, el elevado costo de estas pruebas así como el sufrimiento causado a los animales ha motivado el reemplazo de experimentos que utilicen animales de laboratorio, la reducción del número de animales usados en cada prueba o el perfeccionamiento de las metodologías existentes con el propósito de reducir el dolor y el estrés a los animales (Yajes 1997).

El bioensayo de letalidad frente a *A. salina*, es uno de los biomodelos más utilizados en las etapas preliminares de la investigación fitoquímica; consiste en exponer compuestos activos y/o extractos de plantas a nauplios de *A. salina*, el cual es un pequeño crustáceo (Figura 14), para causar la muerte de estos y así determinar valores de concentración letal 50 (CL₅₀), expresada en g/mL (Martínez y Beltrán 1999). Cabe aclarar, que estos valores obtenidos de CL₅₀, no advierten una actividad biológica o fisiológica en particular, sino que son indicadores de toxicidad a nivel celular que pueden orientar a investigaciones más específicas.



Figura 14. Nauplios de *A. salina*. Crustáceo empleado como modelo biológico para evaluaciones de toxicidad

La toxicidad *in vivo* en un organismo animal puede usarse como método conveniente para el seguimiento y fraccionamiento en la búsqueda de nuevos productos naturales bioactivos. En el caso de *A. salina*, se habla de un organismo fácil de cultivar y manipular en laboratorio, además que es sensible a una gran variedad de tóxicos, y genera resultados confiables, por lo que se sugiere como una alternativa de bajo costo, sencilla y rápida. Al poder ser usada de manera rutinaria en la investigación fitoquímica, permite crear una base para adelantar posteriores estudios, que brinden aplicaciones importantes (Forero 2002).

Este bioensayo es aplicable a compuestos con estructuras y modos de actividad diversos, lo que le otorga la característica de ser de amplio espectro, y de ahí que sea usado como método de análisis para detectar residuos de pesticidas, metales pesados, micotoxinas, anestésicos, toxinas de cianobacterias y compuestos de tipo morfínico, o para predecir citotoxicidad de compuestos puros (Gualdrón y López 1994). El grado de toxicidad del extracto se puede definir en función del rango en que se encuentran los valores de CL_{50} de acuerdo con las categorías descritas en la Tabla 2 descritas por Valdés et al. 2003.

Tabla 2
Clasificación del rango de toxicidad sobre *A. salina*

Clasificación	Rango de la Concentración letal media (CL ₅₀) [µg/mL]
Extremadamente tóxico	< 10
Muy tóxico	≥ 10 CL ₅₀ < 100
Moderadamente tóxico	≤ 100 CL ₅₀ < 1000
No tóxico	< 50 CL ₅₀ >1000

b) Citotoxicidad sobre linfocitos humanos

En la sociedad actual es imprescindible contar con sistemas de análisis de la potencialidad tóxica de las numerosas sustancias que puedan provenir de síntesis o modificación química, o que de manera natural provengan de plantas, y que estén siendo suministradas al organismo humano, con cualquier fin, principalmente con un fin médico, ya que pueden afectar a la salud de quien consume. En este sentido, se evalúan todos los compuestos químicos que van a ser utilizados para la terapia o mantenimiento humano, y así también los aditivos, conservadores, entre otros, destinados al consumo en alimentos, los cosméticos, y, desde luego, los pesticidas y plaguicidas que, además de actuar sobre los seres humanos, afectan ampliamente a los ecosistemas (Gil 2011).

Las pruebas necesarias para evaluar estos posibles efectos tóxicos están reguladas por las legislaciones de los respectivos países y durante mucho tiempo se han desarrollado, con exclusividad, en modelos experimentales en animales. Para ello, se han puesto en marcha protocolos que evalúan el riesgo de que del uso de una determinada sustancia se pueda derivar un efecto tóxico sobre alguno de los aspectos de la salud humana. Se evalúa la potencialidad tóxica en administración, única, en tratamientos a medio y largo plazo, la posibilidad de que genere mutaciones que conduzcan al desarrollo de tumoraciones malignas (Borenfreund y Borrero 1984). Aunque estos protocolos han sido validados, adolecen de algunos defectos de carácter general como es que, en determinadas ocasiones, tienen difícil extrapolación (el efecto citotóxico de una sustancia en animales puede no ser idéntico al que se produzca en humanos), diferencias

orgánicas claras (piel, algunas glándulas, cerebro, etc.), la presencia de estrés durante la administración a los animales puede alterar un resultado (Ekwall 1980).

Por este motivo se han desarrollado estudios de toxicidad *in vitro* que se han extendido de forma muy amplia (Williams et al. 1983; Bondesson et al. 1989). Estos protocolos permiten evaluar los efectos de fármacos y sustancias, analizar los mecanismos de acción, etc. sin necesidad de utilizar grandes grupos de animales, como sí lo requieren los estudios de toxicidad *in vivo* para que sean estadísticamente significativos los resultados obtenidos. También se puede evaluar la toxicidad en células humanas normales o incluso en líneas celulares de células transformadas (Ekwall 1980).

Los estudios de citotoxicidad *in vitro* son ensayos bien estructurados que pretenden evaluar la potencialidad citotóxica de fármacos, sobretodo, y de otros compuestos o sustancias de uso humano, animal o ambiental. También posibilitan conocer con detalle los mecanismos moleculares de la toxicidad celular y determinar las principales sustancias, y sus grupos químicos, que han demostrado alguna capacidad citotóxica, determinando los tipos celulares más sensibles (Gil 2011).

Ante la diversidad de moléculas y de efectos a estudiar resulta comprensible que las técnicas desarrolladas sean numerosas. Los efectos tóxicos de las moléculas sobre las células, sobre todo en cultivo *in vitro*, pueden ser detectados fácilmente por las alteraciones estructurales o funcionales que producen. En experimentación biológica es muy importante siempre tener presente que en cualquier población biológica se puede demostrar la existencia de individuos sensibles, resistentes e intermedios, con independencia del tipo de estímulo empleado y del método de evaluación de la respuesta. No todas las células responden igual a un estímulo idéntico; hay que considerar que determinadas alteraciones para unas células implicarían la muerte celular y para otras no son suficientemente lesivos (Marano y Legrand 1995).

La toxicología genética ha introducido a su metodología el uso de biomarcadores como indicadores de la variación de componentes o procesos bioquímicos o celulares que pueden ser medidos en muestras biológicas. Entre los diferentes biomarcadores, existen aquellos que miden la exposición al tóxico, el efecto temprano y la susceptibilidad (Ostrosky y Gonsebatt 1998).

Los principales métodos de estudio de la alteración celular *in vitro* se basan, sobre todo, en el estudio de la degeneración y/o muerte de las células. Para que el estudio sea relevante hay que utilizar distintos tipos de células y se deben administrar al medio de cultivo varios niveles de dosis de la sustancia considerada potencialmente citotóxica. No obstante, este tipo de ensayos *in vitro* no solo sirven para evaluar la lisis celular sino que también son útiles para conocer los daños concretos y las estructuras diana de una sustancia concreta. Los efectos de los fármacos y xenobióticos son muy variados y dependen en gran medida de la naturaleza química de la sustancia de que se trate (Marano y Legrand 1995).

Los linfocitos son células del sistema inmune presentes en la sangre, cuyo número aproximado es de 2×10^{12} células circulando libremente en la sangre, o permaneciendo en espacios estructurales específicos de ciertos órganos como el timo, médula espinal, bazo, nódulos linfáticos, amígdalas y placas de Peyer; frecuentemente, también se encuentran en la epidermis y en el epitelio no escamoso endodérmico. Los linfocitos periféricos comprenden dos tipos de células, dependiendo de su origen y su función, nombrados células tipo B y T (Gonsebatt et al 1995).

El número de linfocitos por unidad de volumen de sangre cambia con la edad y el estado de salud, con un valor máximo en los recién nacidos y en los niños pequeños, normalmente, y dependiendo de varios factores externos e internos, alrededor del 55 al 80% de los linfocitos son de tipo T y de 10 a 25% son del tipo B; cada grupo de células está compuesto por subpoblaciones con funciones variadas, especialmente las células T. Algunas poblaciones de células T mejoran o suprimen la función inmune. Las diferencias individuales en la proporción de linfocitos T y B pueden ser considerables.

La mayor parte de linfocitos T pasan por los diferentes órganos (bazo, nódulos linfáticos, amígdalas, etc.) y vuelven a entrar al sistema sanguíneo periférico. Así, independientemente de cual sea la ruta de entrada del xenobiótico al organismo, éste tarde o temprano va a estar en contacto con los linfocitos, por lo que éstos son muy utilizados como biomonitores (Gonsebatt et al 1995).

2.4. Actividad antioxidante

Las especies oxigénicas reactivas (ROS), formadas metabólicamente como intermediarios parcialmente reducidos, son especies moleculares activadas, dotadas de un electrón desapareado, conocido como radical libre, en un nivel energético superior y por tanto dotadas de propiedades paramagnéticas que les confieren una alta e indiscriminada reactividad. Las ROS producen diversas acciones sobre el metabolismo de los principios inmediatos, que pueden ser el origen de un daño celular. Actúan sobre los lípidos poliinsaturados de las membranas celulares, produciendo pérdida de fluidez y lisis celular como consecuencia de la peroxidación lipídica (PL); sobre los glúcidos, alterando las funciones celulares tales como las asociadas con la actividad de las interleuquinas y la formación de prostaglandinas, hormonas y neurotransmisores; sobre las proteínas produciendo inactivación y desnaturalización; sobre los ácidos nucleicos mediante la modificación de bases produciendo mutagénesis y carcinogénesis (González et al. 2001).

La evaluación de la actividad antioxidante a través de fuentes generadoras de radicales libres en el sistema de prueba, asume que la oxidación es inhibida en un alto porcentaje por la captura de estos; por tanto se enfoca en monitorear la capacidad de aditivos y extractos para la captura de radicales o la inhibición de su formación. Este es el principio de los métodos más modernos de ensayo tales como los ensayos de ABTS (ácido 2,2'azinobis-(3- etilbenzotiazolina)-6-sulfónico), DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) y phycoerythrin (Antolovich et al. 2002).

El ensayo *in vitro* con el radical libre en mención se considera representativo entre los métodos que emplean modelos radicales en la evaluación de la actividad antioxidante (Koleva et al. 2002), debido a su citada estabilidad en virtud de la deslocalización del electrón desapareado.

2.4.1. Método DPPH

El método DPPH fue desarrollado por Brand Williams y colaboradores, y se fundamenta en que este radical, el 2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo (Figura 15) tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante; la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 517 nm. La diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres (Chávez et al., 2002).

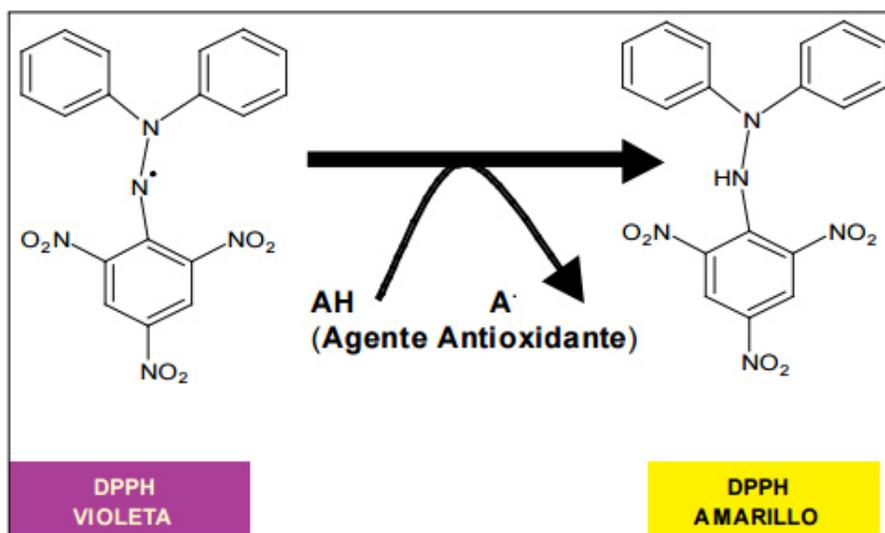


Figura 15. Reacción formada en el método DPPH. Molécula del DPPH en su estado reducido se observa de tono violeta y ante un agente oxidante se torna color amarillo, lo cual es un indicativo de la actividad de la capacidad antioxidante de la sustancia a evaluar

2.5. Microscopía de Fuerza Atómica (MFA)

2.5.1. Generalidades

La microscopía de fuerza atómica es una técnica para la caracterización de superficies (Binnig et al 1986); este tipo de microscopía, se basa en la creación de imágenes digitalizadas mediante la medición de las fuerzas repulsivas y atractivas entre los átomos de una punta y los de una superficie.

La microscopía de fuerza atómica (MFA) (Fotiadis et al. 2002), también conocida como microscopía de fuerza de barrido (Figura 16) es capaz de crear una imagen tridimensional, de la estructura de la superficie de especímenes biológicos en un ambiente fluido, y así provee la oportunidad de observación, a resolución molecular, procesos bioquímicos y fisiológicos en tiempo real.

La MFA ha sido utilizada para crear imágenes de una gran variedad de macromoléculas biológicas individuales, células enteras, membranas y proteínas de unión a membrana, y procesos interactivos (Sokolov 2007). Durante la última década, la MFA se ha convertido en una herramienta poderosa para obtener detalles nanoestructurales y propiedades biomecánicas de muestras biológicas, incluyendo biomoléculas y células (Pelling et al. 2004; Charras y Horton 2002). Puede medir los cambios en las propiedades mecánicas de una membrana celular, la rigidez y la viscoelasticidad de una célula (Charras y Horton 2002).



Figura 16. Microscopio de fuerza atómica (MFA).
Microscopía empleada para el estudio de células vivas que permite el análisis de características morfométricas

2.5.2. Modos de operación

El MFA depende esencialmente de las fuerzas de repulsión o atracción entre una punta, colocada al final del cantiléver, y la muestra. En base a esto, y a las características físicas de la muestra y las propiedades a medir, el microscopio puede ser operado en modo de contacto, modo intermitente, tapping o semicontacto, y en modo de no-contacto (Tang et al. 1994; Fukui et al. 1997; González y Uribe 2005).

- Contacto: Mide la topografía de la muestra deslizando la punta sobre su superficie
- Tapping: También llamado contacto intermitente, mide la topografía de la muestra tocando intermitentemente su superficie
- No Contacto: Mide la topografía de acuerdo a las fuerzas de Van der Waals que existen entre la superficie de la muestra y la punta.

El modo de no contacto es operado en un rango de fuerzas, donde la fuerza total neta sobre el cantiléver es atractiva (negativa). A medida que la punta se aproxima a la muestra, las fuerzas de Van der Waals eventualmente se van haciendo repulsivas. Cuando la punta está en contacto con la muestra, las fuerzas repulsivas dominan el sistema, ejerciendo una fuerza total neta positiva sobre el cantiléver. Es en este rango de fuerzas donde es operado el microscopio en el modo de contacto (López 1996).

Hansma et al. 1997, mencionan que la microscopía de fuerza atómica, por su potencial de lograr resolución molecular y atómica, se ha colocado en una posición fundamental para el análisis de la materia a escala nanométrica, sin el problema de la preparación de material que debe colocarse en un ambiente de vacío, como sucede con el microscopio electrónico. Sus aplicaciones en el área biológica, principalmente se ha utilizado en el análisis de moléculas aisladas y procesos moleculares *in vitro*.

El microscopio de fuerza atómica es capaz de generar imágenes de muestras biológicas tanto fijadas como vivas en condiciones fisiológicas, basado en la interacción local entre la punta (cantiléver) y la superficie de una muestra (Jena y Horber 2002; Morris et al. 2001). Por otro lado, Czajkowsky y Shao 1998; Scheuring et al. 2001 mencionan que el MFA proporciona imágenes tridimensionales de superficies con muy alta resolución espacial que permiten cuantificar la profundidad y morfología de las muestras en tiempo real, en el orden de los nanómetros.

2.5.3. Aplicación biológica

La introducción de microscopía de fuerza atómica en estudios microbiológicos ha ayudado a los investigadores con un nuevo dispositivo para el análisis de la morfología bacteriana. Las características morfológicas específicas de la pared celular bacteriana podrían ser útiles en la identificación de factores específicos asociados con la gastritis o el cáncer de estómago. Hasta la fecha, este método todavía no se ha utilizado para estudiar las características morfológicas de *H. pylori* (Germano et al. 2013).

La principal ventaja de la MFA es la posibilidad de visualización de células vivas *in situ*, lo que hace que sea una técnica potente y muy útil para el estudio de las células bacterianas. Los resultados sugieren que la MFA es una técnica fiable para el estudio de la morfología bacteriana y para examinar las interacciones microbianas en epitelio gástrico (Meincken et al. 2005). Una de las ventajas de la MFA es la preparación de la muestra fácil y la alta resolución alcanzable. Esta condición hace que sea una herramienta prometedora en la investigación. La aplicación de este dispositivo ayuda a aumentar el conocimiento de la investigación de las especies bacterianas (Germano et al. 2013).

La ventaja más importante de la MFA en Biología, es el estudio de muestras biológicas directamente en su ambiente natural, especialmente en soluciones buffer, *in vitro*, *in situ*, e incluso *in vivo* (Sokolov 2007; Yang et al. 1999). También puede detectar la superficie de células vivas y fuerzas moleculares individuales en el campo de la Biología celular (Rabinovich et al. 2005; Zhao et al. 2005). Además no existe ninguna limitación en la elección del tipo de medio, acuoso o no acuoso, temperatura de la muestra, o composición química de la misma.

3. JUSTIFICACIÓN

Helicobacter pylori es una de las bacterias más patógenas y comunes que afectan al humano, su colonización es usualmente de larga duración causando gastritis, úlceras y finalmente puede llegar a causar cáncer de estómago. Se encuentra distribuida prácticamente en la mitad de la población a nivel mundial, con mayor prevalencia en los países en desarrollo, en donde la infección causada por esta bacteria constituye un grave problema de salud pública. Diversos tratamientos se han establecido, incluyendo antibióticos principalmente; sin embargo, la resistencia del microorganismo a estos compuestos es un problema global que necesita atención, ya que limita el uso de antibióticos para el tratamiento de afecciones por *H. pylori*. Se ha encontrado que la prevalencia de organismos patógenos humanos resistentes a los antibióticos es cada vez mayor, y por el contrario, el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos que controlen éstos, va cada vez en decremento. Una amplia búsqueda se ha extendido con el fin de identificar componentes específicos provenientes de fuentes naturales, tales como plantas y que puedan ser utilizadas como terapias alternativas debido a la presencia de metabolitos secundarios con potencial antimicrobiano. México es uno de los países que se caracteriza a nivel mundial, por la gran diversidad de plantas endémicas, y se conoce que alrededor de 3000 plantas son utilizadas con fines medicinales. Un tercio de estas plantas se aprovechan específicamente en el tratamiento de padecimientos gastrointestinales. En los años recientes se han aumentado considerablemente los estudios acerca de la actividad medicinal de plantas sobre *H. pylori*. En este trabajo se seleccionaron algunas especies con el propósito de evaluar su actividad anti-*H. pylori* obteniendo extractos metanólicos de las mismas, y teniendo como control la droga comercial ceftriaxona; así mismo, se realizó el análisis toxicológico sobre *A. salina* y el análisis citotóxico sobre linfocitos humanos para determinar si existe toxicidad celular. Por otra parte, se sometieron células de *H. pylori* a diversos tratamientos y posteriormente se analizaron por microscopía de fuerza atómica para determinar posibles daños celulares.

4. HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos de *Stenocereus marginatus*, *Artemisia ludoviciana*, *Persea americana* var criollo, *Glycyrrhiza glabra*, *Mentha piperita*, *Jatropha dioica* y *Trigonella foenum-graecum* presentan actividad antimicrobiana sobre *Helicobacter pylori* y es posible determinar los parámetros morfométricos de la misma al microscopio de fuerza atómica (MFA).

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Determinar la actividad antibacteriana de extractos metanólicos de especies vegetales sobre *Helicobacter pylori* y caracterizar los parámetros morfométricos al microscopio de fuerza atómica (MFA).

5.2. Objetivos particulares

1. Realizar las pruebas de identificación de grupos funcionales (pruebas coloridas) del extracto metanólico de cada planta evaluada
2. Determinar la actividad toxicológica sobre *A. salina* de los extractos metanólicos
3. Realizar la cinética de crecimiento de *H. pylori*
4. Determinar la actividad biológica sobre *H. pylori*, de los extractos metanólicos no tóxicos a *A. salina*.
5. Evaluar la actividad citotóxica sobre linfocitos humanos de los extractos metanólicos con mayor actividad anti-*H.pylori*.
6. Determinar la actividad antioxidante del extracto metanólico con mayor actividad anti-*H. pylori*, utilizando el método de DPPH.
7. Analizar al MFA los parámetros morfométricos (longitud, ancho, altura, rugosidad, elasticidad y volumen) de *H. pylori* cultivado en presencia de los extractos metanólicos anti-*H.pylori*.

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1. Material biológico

- a) *Helicobacter pylori* #43504 fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC).

- b) *Artemia salina*. Los huevecillos de *A. salina* (Brine Shrimp Eggs San Francisco Bay Brand INC), fueron adquiridos en Petco, EUA.

- c) Material vegetal
 - *S. marginatus* y *J. dioica*: Se colectó la muestra vegetal correspondiente en el municipio de Villa Hidalgo, San Luis Potosí, localizado en la parte centro norte del estado; en la zona centro, la cabecera municipal tiene las siguientes coordenadas: 100°41' de longitud oeste y 22°27' de latitud norte, con una altura de 1670 msnm. Sus límites son: al norte, Villa de Guadalupe; al este, Guadalcázar y Cerritos; al sur, Armadillo de los Infante; al oeste, Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí, Villa de Arista, Moctezuma y Venado. Su distancia aproximada a la capital del estado es de 47 km. La superficie total del municipio, de acuerdo al Sistema Integral de Información Geográfica y Estadística del INEGI, es de 1558.65 km² y representa el 2.57% del territorio estatal. El clima es seco semicálido y predomina en todo el centro del municipio; en el noroeste y suroeste su clima es semiseco templado, y en el sureste su clima es semiseco. Su precipitación pluvial anual es de 336 mm. Su temperatura media anual es de 18.6 °C con una máxima absoluta de 40 °C y una mínima absoluta de 8 °C. El municipio se haya cubierto por una población vegetal típica de las zonas áridas, dentro de esta clasificación se encuentran: matorral desértico micrófilo, matorral espinoso, nopalera, izotal, cardonal, con especies como gobernadora, mezquite, castela, corolaria, lechuguilla, sotol, nopalera, yucas, cardones, entre otros. (<http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM24sanluispotosi/index.html>, accesado 23 de noviembre de 2016).

- *Artemisia ludoviciana*: se obtuvo en el mercado popular del municipio de Matehuala, San Luis Potosí, ubicado en la parte norte del estado, en la zona altiplano, la cabecera municipal tiene las siguientes coordenadas: 100°39" de longitud oeste y 23°39" de latitud norte, con una altura de 1570 msnm. Sus límites son: al norte Cedral, al este Nuevo León, al Sur Villa de Guadalupe, al oeste Villa de Guadalupe y Villa de la Paz. En este municipio predomina el clima seco semicálido. En la parte extrema noroeste, tiene una pequeña franja de clima seco templado. La temperatura media anual es de 19.3 °C y una precipitación pluvial de 450 mm. Su vegetación consta de matorral desértico, matorral espinoso, macrófilo, nopalera, izotal, magueyal, cardonal y pastizal (<http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM24sanluispotosi/index.html>) accesado 23 de noviembre de 2016).
- *P. americana* var criollo: las hojas y el fruto se colectaron en el municipio de Aramberri, localizado en la parte sur del estado de Nuevo León, en las coordenadas 24°49' longitud oeste, a una altitud de 1077 msnm. Limita al norte con Galeana e Iturbide, al sur con Doctor Arroyo y Zaragoza, al este con Tamaulipas y al oeste con Galeana y Doctor Arroyo. (<http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM19nuevoleon/index.html>, accesado 23 de noviembre de 2016).
- *T. foenum-graecum* (semilla) y *G. glabra* (raíz): fueron adquiridas en el establecimiento comercial PACALLI® “la casa de las hierbas” en Escobedo, N.L.
- *Mentha piperita*: Fue obtenida en un vivero comercial en San Nicolás de los Garza, N.L.

C1) Procesamiento del material vegetal

Una vez colectado *S. marginatus* se procesó como se describe en la Tabla 3.

Tabla 3
Etapas del procesamiento de *S.marginatus* para la obtención del extracto metanólico

Etapa	Procedimiento
Lavado	Se enjuagó el material vegetal bajo el chorro de corriente de agua, hasta eliminar cualquier residuo ajeno al material vegetal
Corte	Se procedió a cortar el tallo de <i>S. marginatus</i> , primeramente se quitaron las espinas, con ayuda de un cuchillo, para posteriormente cortar a lo ancho del tallo en rodajas.
Extracción	La obtención del extracto metanólico a partir de la planta, se realizó agregando a matraces Erlenmeyer, las rodajas y trozos obtenidos en los cortes, y se agregó metanol absoluto hasta cubrir. Estos matraces se cubrieron con papel plástico transparente y se mantuvieron en agitación constante durante 7 días a temperatura ambiente.
Filtración	Después de los 7 días, se filtró lo contenido en cada matraz, por medio de papel filtro Whatman No 1.
Concentración del extracto	El solvente (metanol) se destiló con ayuda de un rotavapor Buchi, a 64 °C (temperatura de ebullición del metanol). Se obtuvo el extracto concentrado, el cual se colocó en un vaso de precipitado Pyrex® y enseguida se colocó en la estufa a una temperatura de 37 °C, para su completo secado, posteriormente el extracto se raspó, se almacenó en un frasco ámbar y se conservó en las mismas condiciones de temperatura.

Para el resto de las especies vegetales, el procesamiento para la obtención del extracto metanólico se describe en la Tabla 4.

Tabla 4
Etapas del procesamiento del resto de las especies para la obtención de los extractos metanólicos

Etapa	Procedimiento
Lavado	Se enjuagó el material vegetal al chorro de agua corriente, hasta eliminar cualquier residuo ajeno al material vegetativo.
Extracción	La obtención del extracto metanólico a partir de la planta, se realizó agregando a matraces Erlenmeyer, trozos o partes de la planta y

	posteriormente se agregó metanol absoluto hasta cubrir. Estos matraces se cubrieron con papel plástico transparente y se mantuvieron en agitación constante durante 7 días, en condiciones a temperatura ambiente.
Filtración	Después de los 7 días, se filtró lo contenido en cada matraz, por medio de papel filtro Whatman No 1.
Concentración del extracto	El solvente (metanol) se destiló con ayuda de un rotavapor Buchi, a 64 °C (temperatura de ebullición del metanol). Se obtuvo el extracto concentrado, el cual se colocó en un vaso de precipitado Pyrex® y enseguida se colocó en la estufa a una temperatura de 37 °C, para su completo secado, posteriormente el extracto se raspó, se almacenó en un frasco ámbar y se conservó en las mismas condiciones de temperatura.

C2) Preparación de la solución madre o solución stock de los extractos vegetales

La solución madre o stock se preparó disolviendo una cantidad conocida del extracto metanólico obtenido de cada una de las especies vegetales evaluadas, en cierto volumen de metanol o agua hasta saturación, y a partir de esta solución madre, se realizaron los cálculos necesarios para obtener la concentración deseada en cada experimento. Una vez preparada la solución madre, se esterilizó por filtración empleando filtros Millipore de 0.22 µm. Enseguida se tomó una alícuota y se colocó en medio de cultivo Brucella, se incubó a 37 °C por 24 h y una vez obtenida la prueba de esterilidad positiva, se procedió a su utilización.

C3) Perfil fitoquímico de los extractos metanólicos

Al extracto metanólico de cada especie vegetal se le realizó un análisis fitoquímico de acuerdo con Domínguez, 1973; con la finalidad de identificar sus componentes químicos. Las pruebas se realizaron en placas de cerámica de 9 y 12 pozos, tomando alícuotas provenientes de cada solución madre del extracto. Cada prueba se describe en la Tabla 5.

Tabla 5
Descripción de las pruebas para detectar los grupos funcionales presentes en los extractos metanólicos (Domínguez, 1973)

Grupo funcional	Prueba de	Procedimiento
Insaturaciones	KMnO ₄	Se disolvieron 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua, acetona o metanol y se añadió, gota a gota, una solución de KMnO ₄ al 2% en agua. La prueba fue positiva al observar decoloración o formación de precipitado café en menos de 1 min, resultado de la formación de dióxido de manganeso.
Grupo carbonilo	2,4-Dinitro-fenil-hidracina	De 1 a 10 mg, de la muestra se disolvieron en etanol, se le añadió una solución saturada de 2-4-dinitrofenilhidracina en HCl 6N; la formación de un precipitado amarillo o naranja, indicó la presencia del grupo carbonilo.
Oxhidrilos fenólicos (taninos vegetales)	FeCl ₃	Se disolvieron 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua o etanol y después se añadieron unas gotas de cloruro de hierro al 12.5% en agua. La aparición de un precipitado rojo, azul-violeta o verde, se consideró positivo.
Esteroles y triterpenos	Liebermann-Burchard	Se mezcló 1 mL de anhídrido acético y uno de cloroformo, se enfriaron a 0° y se les añadió una gota de ácido sulfúrico. Se agregó, gota a gota, este reactivo a la muestra, o su solución clorofórmica. Con la formación de color azul, verde, rojo, anaranjado, etc., los que cambian con el tiempo, la prueba se tomó positiva. El orden y tiempo de aparición (0, 1, 5, 20, 60 min) tiene cierto valor diagnóstico; así, una coloración amarilla después de 15 min, parece corresponder a C 14-metilo y una variación -7 insaturación. La prueba se consideró positiva para esteroles que contienen 2 enlaces dobles conjugados, que los pueden formar por una o dos deshidrataciones con isomerización.
Esteroles y triterpenos	Salkowski	Similar a la de Liebermann-Burchard, la muestra (1-2 mg) en contacto con 1 mL de ácido sulfúrico, se desarrollaron colores amarillo o rojo para esteroles y metilesteroles.
Carbohidratos	Molish	A 1-2 mg de la muestra se le agregó, gota a gota, el reactivo de Molish (alfa-naftol al 1% en etanol), luego 1 mL de ácido sulfúrico por las paredes. La prueba fue positiva con la formación de un anillo coloreado en la interfase de color púrpura.
	Cumarinas	Se disolvieron 1-2 mg de muestra en NaOH al 10%; si apareció una coloración amarilla que desaparece al acidular, se toma la prueba como positiva.
	Lactonas	Se disolvieron de 1-2 mg de muestra en solución alcohólica de NaOH al 10%. Un color amarillo o anaranjado que se pierde o desaparece al agregar unas gotas de HCl indicó la presencia de un anillo lactónico.

Sesquiterpenla ctonas	Baljet	A 2-3 mg, del compuesto se le agregaron 3-4 gotas de la solución mezcla, siendo positiva si se tornó de color naranja a roja oscura. La solución mezcla 1:1 consistió de una solución A que contenía: ácido pícrico al 1% en etanol y una B: NaOH al 10%.
Flavonoides	H ₂ SO ₄	Una pequeña cantidad de muestra se disolvió en H ₂ SO ₄ y se observó coloración amarilla para flavonoles; naranja-guinda, para flavonas; rojo-azuloso, para chalconas y rojo-púrpura, para quinonas.
Alcaloides	Dragendorff:	Modificación de Munier y Machelobuf. Se hicieron 2 soluciones. Para preparar la solución A, se disolvieron 0.85 g de nitrato de bismuto, en una mezcla de 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua. Para la solución B, se disolvieron 8 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua. El reactivo se preparó mezclando 5 mL de la solución A, 4 mL de la solución B y 100 mL de agua. El reactivo es estable por un año y la prueba resultó positiva para alcaloides al dar una coloración rojo o naranja persistentes por 24 horas (Pérez 2000)
Aromaticidad	ácido sulfúrico- formaldehí- do	Se preparó una mezcla de 1 mL de ácido sulfúrico concentrado con una gota de formaldehído. Se agregó de 1-5 mg de la muestra disuelta en disolvente no aromático, se añadieron unas gotas de la mezcla anterior y si apareció un color rojo-violeta, la prueba resultó positiva (Treviño 2001).
Saponinas	Bicarbonato de sodio	La sal se preparó al 10% en agua. Se disolvieron de 1-2 mg de la muestra en agua o etanol y se le agregaron de 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se agitó ligeramente, luego se agregó de 2-3 gotas de la solución de bicarbonato de sodio. La aparición de burbujas y su permanencia por más de 1 min indicó la presencia de saponinas.
	Salkowski	Se disolvieron de 1-2 mg de la muestra en 1 mL, de cloroformo y se añadió 1 mL de ácido sulfúrico. La prueba fue positiva si existió aparición de color rojo.

6.2. *Helicobacter pylori*

6.2.1. Mantenimiento del cultivo

La cepa de *H. pylori* (ATCC 43504) se obtuvo del cepario del Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Genética; conservada y mantenida en refrigeración. Para su uso, se requirió su activación en el medio de cultivo caldo Brucella, incubado por 24 h a 37 °C, repitiendo este procedimiento durante 3 días.

6.2.2. Cinética de crecimiento

Se prepararon 27 tubos que contenían caldo Brucella con un volumen de 3 mL y un inóculo de 200 µL de bacterias, se incubaron a 37 °C y se determinó la absorbancia a 635 nm de cada uno de los tubos, cada hora, en un espectrofotómetro (Spectronic LR45227) por un periodo de 12 h. Se midieron además como control negativo, 3 tubos que contenían únicamente caldo Brucella. Al final, se tomaron las absorbancias, se obtuvo promedio de las 3 lecturas y se graficó para obtener la curva de crecimiento.

6.2.3. Caracterización molecular de *H. pylori*

A) Extracción del ADN de *H. pylori*

Se seleccionó un tubo con cultivo de 4 horas para posteriormente separar las células bacterianas por centrifugación a 4000 g durante 10 min; las células se lavaron y resuspendieron en 100 µL de tampón Tris-EDTA 1X (pH 7.4), se añadieron 100 µg de Lisozima (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y 100 µg de Proteínasa K (Thermo-Fisher, Carlsbad, CA, USA) y se incubaron a 37 °C durante 30 min; luego, se realizó la extracción del ADN total con Trizol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); 1 mL de Trizol, para asegurar la completa disociación de los complejos nucleoproteínicos, se incubó por 5 min a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 200 µL de cloroformo, se mezcló vigorosamente por 15 s protegiendo las muestras de la luz, y se incubaron enseguida a temperatura ambiente durante 15 min.

La mezcla resultante se centrifugó a 12000 g por 15 min a 4 °C con el fin de obtener 3 fases: la orgánica (proteínas) en el fondo, interfase (ADN) y acuosa (ARN) en la superficie. Para el aislamiento del ADN, se tomó con una puntilla y con extremo cuidado la interfase y se transfirió a un tubo Eppendorf; luego, se añadieron 500 µL de 2-propanol por 10 min a temperatura ambiente. Tras la incubación, la mezcla se centrifugó a 12000 g por 10 min a 4 °C, posteriormente, se descartó el sobrenadante y se obtuvo el pellet, al cual se añadió 1 mL de etanol al 75% y se repitió la centrifugación. Por último, se eliminó el etanol que contenía la muestra y el ADN se resuspendió en agua libre de nucleasas (Agua DEPC) y se almacenó a -80 °C hasta su utilización.

B) Cuantificación del ADN

Se utilizó 1 μL de ADN total para la cuantificación y determinación de su pureza en radios de absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 8000 UV-Vis (Thermo-Fisher, Carlsbad, CA, USA).

C) Integridad del ADN

Se diluyeron 5 μL de ADN total con 1 μL de tampón de carga 6X, la mezcla se transfirió al gel de agarosa al 1.3% en tampón TBE 1X. La corrida electroforética se realizó a 90 volts por 40 min, luego, se tiñó en solución de bromuro de etidio (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y por último, se transfirió a un transiluminador de luz ultravioleta Gel Doc™ XR+ Imager (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), donde se visualizaron las bandas predominantes de ADN, tanto del marcador de peso molecular, como de la bacteria.

6.3. Bioensayos

6.3.1. Actividad tóxica de los extractos metanólicos sobre *A. salina*

Se preparó el agua de mar artificial, en la que se incubaron los huevecillos, añadiendo sal de mar en una concentración de 40 g/L a un frasco con agua bidestilada, cuyo pH fue ajustado a 7.8. A dicha agua se le añadió una cantidad de 6 mg de levadura de cerveza, la cual funcionó como alimento para los huevecillos. En ella se incubaron 0.1 g de huevecillos de *A. salina* colocados en un recipiente de plástico dividido por una pared intermedia con un espacio en la parte baja de 2 mm; se mantuvieron en condiciones de oscuridad y oxigenación, mediante una pequeña bomba. Uno de los compartimentos se mantuvo bajo luz con una lámpara de 20 Watts, ya que al ser atraídos por la luz, los nauplios pudieron moverse al otro lado de la caja.

A las 24 h, los nauplios fueron transferidos a otro recipiente y se mantuvieron en condiciones de oxigenación y temperatura de 22 a 29 °C durante 24 h más. Luego, en una microplaca de 96 pozos, fueron adicionados 100 μL de la suspensión de nauplios por pozo (aproximadamente 10 nauplios) más 100 μL de las diluciones de los extractos vegetales a probar. Las concentraciones a evaluar estuvieron en un rango de 120 a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Como control positivo de toxicidad se utilizó dicromato de potasio a una concentración de 400 ppm, y como control negativo se usó agua de mar. A las 24 h después de haber aplicado los extractos vegetales, se realizó el conteo de nauplios vivos por dosis, esto con ayuda de un microscopio estereoscópico.

6.3.2. Evaluación de la actividad biológica de extractos metanólicos sobre *H. pylori*

A) Técnica de absorbancia en microplaca con adición de MTT

Se contó con una microplaca de 96 pozos para el bioensayo y se realizó cada extracto por triplicado en una misma corrida, y además se llevaron a cabo tres eventos independientes, a manera de validación. En cada pozo se adicionaron 50 μ L de caldo Brucella. Al primer pozo se le agregaron 50 μ L de un cultivo de *H. pylori*, en su fase de crecimiento exponencial o logarítmica, la cual fue previamente incubada a 37 °C, durante aproximadamente 4 h; por último se adicionaron en este primer pozo, 50 μ L provenientes de una solución madre (saturada) de cada extracto. Se homogeneizó lo contenido en cada pozo con la misma puntilla y posteriormente se tomaron 50 μ L de cada primer pozo y se transfirieron al segundo pozo, los cuales contenían 50 μ L de caldo Brucella. Luego, se hizo lo mismo para el tercer pozo, y así sucesivamente, hasta tener 8 diluciones. En los últimos pozos se tomaron y eliminaron 50 μ L de la mezcla, con el fin de tener el mismo volumen final (100 μ L).

Las placas se incubaron por 4 h a 37 °C, posteriormente se agregaron en cada pozo 15 μ L del reactivo MTT (en una concentración de 5 mg/mL), y se dejaron incubar las placas durante 15 min en las mismas condiciones de temperatura, y transcurrido el tiempo, se añadieron 80 μ L de DMSO en cada pozo. Finalmente, con ayuda de un espectrofotómetro se determinó la absorbancia a 570 nm en cada una de las placas, cuidando de que no les diera la luz, después de haber añadido el DMSO.

Se empleó como control positivo de inhibición la droga ceftriaxona, a una concentración de 7.81 μ g/mL, como control de disolvente se utilizó metanol, realizando también una curva para determinar algún efecto de inhibición en el cultivo de *H. pylori*., y de igual manera se corrió una prueba utilizando únicamente los extractos vegetales, a

modo de control de color (por la presencia de pigmentos que pudieran influir en la medición).

B) Método turbidimétrico y recuento bacteriano en placa

Se dispusieron para cada tratamiento, 16 tubos de 13x100 mm, 4 para cada dosis evaluada (0.1, 1, 4 y 7 mg/mL), cada concentración se probó por cuatriplicado. Cada tubo contenía 3 mL de caldo Brucella y a éstos se les agregó el extracto. Luego se inocularon con 200 µL de un cultivo celular de *H. pylori*, en fase exponencial, se tomó la lectura de absorbancia mediante un espectrofotómetro, a 635 nm, y posteriormente, se dejaron incubar durante 6 h a 37 °C. Al final del tiempo, se midió nuevamente la absorbancia, graficando dichas lecturas. Después de realizar el análisis de datos y de seleccionar el o los tratamientos con mayor inhibición, así como la o las concentraciones, se procedió a tomar uno de los tubos correspondientes, y a llevar a cabo diluciones seriadas, desde 10⁻¹ hasta 10⁻¹⁵, en tubos con 9 mL de solución salina (0.85%). A partir de las últimas 8 diluciones se realizó el plaqueo, transfiriendo a cajas Petri, un mililitro de cada tubo, y enseguida se vació de 12 a 15 mL de agar Brucella en dichas cajas y se homogeneizaron suavemente haciendo movimientos circulares a manera de ochos; al solidificar el agar, se dejaron incubar las placas a 37 °C por 18 h. Transcurrido el tiempo, se contaron las colonias observadas en las placas, características de *H. pylori* en agar Brucella, y se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC/mL).

6.3.3. Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos con mayor actividad anti-*H. pylori* sobre linfocitos humanos

A) Obtención de muestras de sangre periférica

Se utilizaron muestras de sangre total periférica procedente de individuos sanos, que no tuvieran hábito de fumar, que no hayan ingerido bebidas alcohólicas, ni hayan consumido drogas días antes, ni que hubieran padecido alguna enfermedad infecciosa previo a la toma de muestra. La extracción de sangre de los donantes, en estado de ayuno, se llevó a cabo por la mañana, mediante la técnica de vacutainer y utilizando tubos que contenían ácido-etilendiamino tetra-acético (EDTA) como anticoagulante. La

toma de muestras se llevó a cabo de acuerdo a la Norma establecida para este procedimiento y con las medidas de Bioseguridad pertinentes (NOM-087-SSA-1997).

B) Aislamiento de linfocitos

Después de mezclar la sangre con el EDTA contenido en el tubo se procedió a la extracción de los linfocitos, en base a la técnica de gradiente de densidad. Para realizar esta metodología se utilizó la solución comercial de Histopaque (Sigma-Aldrich Inc), la cual consiste de una mezcla de polisucrosa y diatrizoato sódico ajustado a una densidad de $1,0077 + 0.001 \text{ g/mL}$ y que está diseñada para facilitar el aislamiento y obtención rápida de células mononucleares viables *in vitro*, a partir de volúmenes pequeños de sangre total.

Inicialmente, la sangre total obtenida fue diluida en solución salina en una relación 1:1, completando 1 L de la mezcla. Enseguida se transfirieron 20 mL de la mezcla de la sangre a un tubo de centrífuga de fondo cónico de 50 mL. Con ayuda de una jeringa, se tomaron 20 mL de la solución de Histopaque-1077 y se añadieron lentamente por las paredes del tubo cónico que contenía la mezcla de sangre, evitando que ambas fases se mezclaran. Se centrifugó a 3000 rpm y a temperatura ambiente por 30 min. Se observó claramente la formación de 3 capas, la superficial, consistente de plasma, la del fondo, que se observó de un color más oscuro, y la cual contenía los eritrocitos, y la interfase, era un anillo blanco y denso y como ésta contenía las células mononucleares, fue recuperada mediante una pipeta y cuidadosamente fue transferida a otro tubo de centrífuga. Para lavar las células se procedió a agregarles solución salina isotónica tamponada con fosfatos (PBS 1X, Tabla 6), y a centrifugar por 10 min a 2000 rpm. Al observar el pellet celular en el fondo, se decantó el sobrenadante y se agregó más solución salina; se volvió a centrifugar a 2000 rpm por un minuto y nuevamente se decantó el sobrenadante. Por otro lado, en un tubo eppendorf se añadió 3 mL de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) y se transfirió a éste, 50 μL del residuo celular, se homogeneizó adecuadamente y de la solución generada se tomó una alícuota de 12 μL , se colocó en cámara de Neubauer y se procedió a contar las células viables.

Tabla 6
Formulación de la solución salina isotónica
Tamponanda con fosfatos (pH 7.4)

Reactivo	Cantidad (g)
NaCl	8.00
KCl	0.20
Na ₂ HPO ₄	1.44
KH ₂ PO ₄	0.24
H ₂ O	100 mL

C) Determinación de la viabilidad celular por exclusión de azul de tripano

La determinación de la integridad, viabilidad y crecimiento celular de los linfocitos, se determinó por el método de exclusión del colorante azul de tripano, el cual es un colorante derivado de la toluidina que posee la capacidad de teñir a células y tejidos muertos (Ehrlich 1904). Se utiliza para evaluar la viabilidad de células por exclusión de captación, ya que no puede penetrar y teñir a las células vivas con membranas íntegras, a diferencia de las células muertas con disrupción membranal las cuales penetra fácilmente, viéndose al microscopio, células de color azul en su interior.

Para el conteo y ajuste de células, se llevó a cabo lo siguiente: de la solución que se realizó en el tubo eppendorf con el pellet celular y el azul de tripano, se tomó una alícuota de 12 μ L y se colocó en una cámara de Neubauer (figura 17a) en el espacio correspondiente. Se procedió a observar en un microscopio óptico los cuadrantes, y en el objetivo de 400X. Para hacer el conteo, se visualizaron únicamente los 4 cuadrantes de 4x4, ubicados en las esquinas de la retícula, A, B, C y D (Figura 16b).

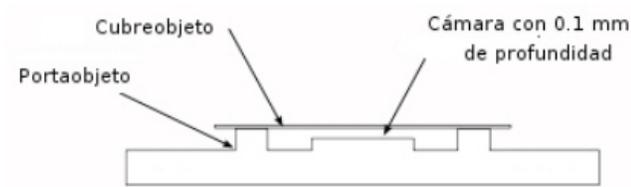


Figura 17a. Cámara de Neubauer. Imagen que ilustra la disposición de una cámara de Neubauer, la cual presenta una profundidad de 0.1 mm, donde se coloca la muestra

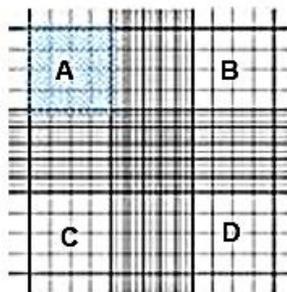


Figura 17b. Esquema de la cámara de Neubauer mostrando la disposición de los 4 cuadrantes que forman la retícula en donde se realizó el conteo de las células

D) Cuantificación de células vivas y muertas (viabilidad y densidad celular)

Después de contar las células en los 4 cuadrantes indicados, se calculó la media aritmética, y se multiplicó por el factor de la cámara (10 000) y por el factor de dilución, y de esta manera se obtuvo la concentración de células en la muestra (No. de células/mL).

$$\text{No. células/mL} = \left[\frac{\text{No. células A} + \text{No. células B} + \text{No. Células C} + \text{No. células D}}{4} \right] * 10,000 * 2$$

Después de haber obtenido este valor, se procedió a realizar las pruebas de toxicidad exponiendo los linfocitos a cierta concentración de los extractos vegetales considerados para este bioensayo.

E) Ensayo de toxicidad

El bioensayo para determinar la citotoxicidad de los extractos vegetales se realizó utilizando un cultivo de células extraídas y aisladas a partir de la técnica de Histopaque – 1077, anteriormente mencionada. Se prepararon las soluciones stock de los extractos con mejor actividad anti-*H. pylori* a una concentración de 20 mg/mL. Se utilizaron microplacas de 96 pozos, y cada extracto se corrió por triplicado, colocando 100 µL de medio DMEM en todos los pozos. Enseguida se agregaron 100 µL del extracto a los primeros 3 pozos y se homogeneizaron con la misma puntilla, realizando una dilución seriada hasta completar 8 diluciones. A cada pozo se le agregó 100 µL del medio que contenía los linfocitos.

Se utilizó como control, la concanavalina A, la cual es una proteína globular de origen vegetal, que debido a sus propiedades bioquímicas, se clasifica como una lectina. Se sabe que los linfocitos, al estar en contacto con un antígeno, inducen una transformación blástica, la cual puede ser también inducida de forma no específica gracias a la capacidad de los linfocitos de reaccionar con diferentes tipos de lectinas de origen vegetal, como la fitohemaglutinina o la concanavalina A. Las lectinas inducen una estimulación blástica de tipo inespecífico tanto en los linfocitos B como en los T. Así que estos pueden ser utilizados como control de la inmunoproliferación. Así también, estudios han demostrado que la CoA es un excelente inductor de mitosis en los linfocitos (Ganem y Martín 2000; Rubio et al. 2016).

Para esto, se llevó a cabo la adición a los pozos del medio DMEM y de los extractos, con los mismos volúmenes mencionados, pero se quitó un volumen de 20 µL en cada pozo, los cuales fueron sustituidos por 20 µL de reactivo de CoA. Además, se corrieron los controles del solvente (200 µL de metanol + 800 µL del medio DMEM) y del solvente con CoA.

Las microplacas, una vez llenadas se incubaron durante 4 h a 37 °C. Después de la incubación, se transfirió lo contenido en los pozos a tubos eppendorf (1 solo tubo por las 3 repeticiones), y se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 min. Al observar el pellet

celular en el fondo, se descartó el sobrenadante. Se agregó 500 μL de medio DMEM al mismo tubo eppendorf y se volvió a centrifugar a 10 000 rpm durante 10 min. Se decantó para eliminar el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular y se transfirió a microplacas (100 μL por cada pozo, teniendo nuevamente 3 repeticiones por concentración). A cada pozo se le agregó 20 μL del reactivo MTT y se dejaron incubar por 2 h. Luego, se colectó lo contenido en cada pozo y se transfirió nuevamente a un tubo eppendorf, se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y se agregaron 350 μL de DMSO; posterior a esto, se homogeneizó en un vórtex y se volvió a transferir a la microplaca, agregando 100 μL en cada pozo y finalmente se leyó la microplaca en un lector a 570 nm.

6.3.4. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos con actividad anti-*H. pylori*

Para determinar la capacidad antioxidante de los extractos, se llevó a cabo el método de DPPH. Los solventes utilizados durante el ensayo fueron grado analítico: el 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) marca SIGMA y el ácido ascórbico utilizado para realizar la curva de calibración fue marca CTR. Primeramente, se realizó una curva de calibración con el ácido ascórbico, para la cual se preparó una solución stock a una concentración de 1 mg/mL, posteriormente se tomaron alícuotas para obtener curva con rango de 10 a 120 $\mu\text{g/mL}$. La concentración de la solución de DPPH a utilizar se estandarizó a 40 ppm cuya absorbancia fue de 1.000.

Para determinar la capacidad antioxidante de los extractos, se preparó una solución madre a una concentración de 2 mg/mL, y a partir de ésta, se llevaron a cabo diluciones (20, 40, 80, 100 y 200). De cada dilución, se tomaron 100 μL y se colocaron en una celda de plástico para espectrofotómetro que contenía 1.9 mL de DPPH a 40 ppm (cada concentración fue probada por triplicado), las celdas fueron conservadas en obscuridad por 30 min a temperatura ambiente, y una vez transcurrido el periodo de incubación, se llevó a cabo la medición de las absorbancias en un espectrofotómetro a 519 nm. Los resultados se expresaron como % de inhibición, utilizando la fórmula siguiente, y finalmente se obtuvo la Concentración Media Inhibitoria (IC_{50}).

$$\% \text{ de Actividad Antioxidante} = (\text{Abs. inicial} - \text{Abs. final}) / (\text{Abs. inicial}) * 100$$

Donde:

% de actividad antioxidante = porcentaje de inhibición de la solución de DPPH al estar en contacto con el extracto evaluado después de 30 min.

Abs. Inicial = absorbancia a 519 nm de la solución de DPPH antes de estar en contacto con el extracto evaluado (control).

Abs. Final = absorbancia a 519 nm de la solución de DPPH al estar en contacto con el extracto evaluado después de 30 min.

6.3.5 Análisis morfométrico de *H. pylori* en presencia de extractos vegetales

Para la caracterización morfométrica de las muestras de *H. pylori* se utilizó un microscopio de fuerza atómica, modelo NTEGRA PRIMA, marca NT-MDT, el cual fue operado en el modo contacto y contacto intermitente. Las puntas que se utilizaron tanto para las micrografías como para las medidas elásticas fueron de un modelo CSG 10/10 de la misma marca, cuya constante de deflexión (kc) nominal especificada por el fabricante fue de 0.11 N/m aproximadamente; además, una longitud de $225 \pm 5.0 \mu\text{m}$ por $30 \pm 3.0 \mu\text{m}$ de ancho, un espesor de $1.0 \pm 0.5 \mu\text{m}$, con una frecuencia de resonancia de 22 kHz y un radio de curvatura de 6.0 nm.

El microscopio de fuerza atómica fue operado por el especialista Marco Mendoza, estudiante de Ingeniería Física Industrial de la Facultad de Ciencias Físico Matemáticas perteneciente a la Universidad Autónoma de Nuevo León.

A) Modos básicos de operación

A1) Colocación de la punta y ajuste de la señal del láser

Antes de realizar cualquier medida, en primer lugar, fue necesario colocar la punta y ajustar el láser. La punta se colocó en el soporte con la ayuda de unas pinzas, deslizándola por la ranura del soporte. Seguidamente se colocó el soporte con la punta dentro de la cabeza del MFA y se procedió al ajuste de la señal del láser.

A2) Alineación del láser

Para el alineamiento del láser se hizo uso de una lupa monocular, suministrada con el equipo para observar la posición del haz del láser sobre el cantiléver de la sonda de medida. Con ayuda de los dos botones de la cabeza del MFA, se posicionó el haz del láser encima del sustrato. Enseguida, se posicionó el haz en el borde del sustrato moviendo para ello el botón correspondiente al eje X. Con el botón de ajuste del eje Y se buscó el centro del cantiléver de la sonda de medida. Finalmente con los dos botones de ajuste en los ejes X y Y se terminó de posicionar la señal del láser en el centro del cantiléver, observando la intensidad de la señal que le llegaría al fotodetector. Si la intensidad de la señal era baja, ésta se podía aumentar variando ligeramente la inclinación del espejo que se encuentra dentro de la cabeza del microscopio hasta conseguir la intensidad adecuada.

A3) Obtención de las muestras

Las muestras que se analizaron por MFA, se obtuvieron de los ensayos biológicos de *H. pylori* en presencia de los tratamientos seleccionados.

A4) Preparación y adhesión de las muestras

En un portaobjetos se agregaron 20 μL de agua purificada y se colocó enseguida muestra de *H. pylori*, por asada o aproximadamente 10 a 20 μL , procedente de los bioensayos previamente realizados; se dejaron secar las muestras a temperatura ambiente y cubiertas adecuadamente para evitar cualquier tipo de contaminación y con el fin de lograr la adhesión de la muestra en el portaobjetos. Una vez terminado este procedimiento, se inició el análisis por MFA.

B) Observación de la muestra

B1) Modo de contacto

El modo contacto (Contact Mode) del MFA operó barriendo la punta en las direcciones X, y en contacto permanente con la muestra, aplicando una fuerza constante ($F = \text{constante}$) y sin levantar la punta de la superficie. La fuerza aplicada está relacionada con la deflexión que experimenta la punta mediante la constante de fuerza del

cantiléver; así $F = -k \cdot D$, donde F es la fuerza aplicada, k es la constante de fuerza del cantiléver y D la deflexión. Por tanto, trabajar a una determinada deflexión ($D = \text{cte.}$) es equivalente a trabajar a una fuerza constante, pues son proporcionales. Así, se fijó la deflexión de trabajo (D_{sp} ; $sp = \text{setpoint}$) y, a medida que se hacía el barrido, el escáner subía o bajaba (en Z) para mantener una deflexión constante ($D = \text{cte} \Rightarrow F = \text{cte}$). El movimiento vertical del tubo de barrido permitió obtener una imagen topográfica de la muestra que generalmente se llama Imagen de Alturas (Olmos y González 2009).

B2) Modo de contacto intermitente (tapping)

En el modo de contacto intermitente ("tapping mode") se aplica una señal sinusoidal, haciendo oscilar a la punta a su frecuencia de resonancia. Los barridos se efectuaron a una amplitud de oscilación constante, denominada amplitud de trabajo o A_{sp} ($sp = \text{setpoint}$). El escáner de barrido subió y bajó (en Z) para mantener esa amplitud constante en todo momento. El movimiento vertical del tubo de barrido, proporcionó, de nuevo la imagen topográfica (Imagen de Alturas). Por otra parte, por efecto de la interacción de la punta con los distintos constituyentes de la muestra, se produjo un cambio en la fase de la onda sinusoidal aplicada, esto fue, un desfase. El registro de este desfase, permitió obtener la denominada Imagen de Fase. El cambio en la fase de la señal sinusoidal está relacionado con las propiedades mecánicas y visco-elásticas del material bajo observación, es decir, a sus constituyentes (o fases) (Olmos y González 2009).

B3) Obtención de las curvas de fuerza-distancia

El principio básico mediante el cual se generaron las curvas de fuerzas, se basó en la capacidad de registrar la fuerza ejercida entre la punta "cantilever" y la muestra, a medida que éste se aproximó, tocó y retrajo en un punto sobre su superficie. Los mapas de volumen de fuerza contienen un arreglo de curvas de fuerza a lo largo del área o superficie de la muestra. Cada curva de fuerza fue medida en un único punto (x, y) del área de la muestra. Un arreglo de curvas de fuerza de muchos puntos x_n, y_n pertenecientes a distintos planos en el eje Z , se combinaron para formar un mapa tridimensional o volumétrico (x, y, z) de datos, que contenían la información acerca de

las propiedades mecánicas, químicas, magnéticas o electroestáticas de la superficie (Rosso 2012). Las gráficas se obtuvieron con el programa Excel 2007 de Microsoft Office y los datos fueron proporcionados por las micrografías obtenidas de las muestras de *H. pylori* bajo los efectos de los extractos.

6.4. Análisis estadísticos

A) Toxicidad de los extractos vegetales sobre *A. salina*

De los ensayos de toxicidad de los extractos vegetales, los resultados obtenidos (por triplicado) se analizaron mediante un análisis PROBIT, para obtener la Dosis Letal Media (DL₅₀), con ayuda del Paquete Estadístico SPSS.

B) Actividad biológica de los extractos vegetales sobre *H. pylori*

De los datos obtenidos de la absorbancia (por triplicado), y del conteo de UFC (por duplicado) se generó un promedio para cada uno y se comparó con los obtenidos por los datos del control, esto mediante un análisis de varianza con una $P < 0.05$, empleando una prueba de Dunnet, de dos colas, con ayuda del Paquete Estadístico SPSS.

7. RESULTADOS

7.1. Material vegetal

7.1.1. Determinación de grupos funcionales y metabolitos secundarios en los extractos metanólicos

Se realizó la extracción metanólica de las especies vegetales *T. foenum-graecum* (semilla), *P. americana* var. criollo (semilla), *M. piperita* (hoja), *G. glabra* (raíz), *S. marginatus* (tallo), *J. dioica* (raíz, hoja y tallo) y *A. ludoviciana* (parte aérea) y posteriormente se les realizaron pruebas fitoquímicas para identificar grupos funcionales (Tabla 7). Se determinó la presencia de alcaloides en todos los extractos vegetales; así también de esteroides, triterpenos, sesquiterpenlactonas, saponinas, insaturaciones y flavonoides en la mayoría de los extractos. Las especies con mayor presencia de grupos funcionales fueron *S. marginatus*, *G. glabra*, *A. ludoviciana* y *T. foenum-graecum*. También se observaron algunas diferencias de metabolitos presentes entre las fracciones u órganos de la planta, específicamente en el caso de *J. dioica*.

En cuanto a *A. ludoviciana*, se observó a excepción de los grupos aromáticos, la presencia de todos los grupos funcionales investigados. Por el contrario, la especie *M. piperita* presentó menor cantidad de metabolitos analizados, siendo los destacados, los alcaloides, lactonas, cumarinas y esteroides.

Como ya se mencionó, los extractos metanólicos evaluados poseen en su mayoría insaturaciones, oxhidrilos fenólicos, flavonoides, esteroides, triterpenos, cumarinas, lactonas, sesquiterpenlactonas, saponinas, y el grupo que predomina en todas las especies vegetales, es el de los alcaloides.

Tabla 7
Comparación de grupos fitoquímicos presentes en los extractos metanólicos estudiados

PRUEBAS FITOQUÍMICAS	SM	GG	TF	JD			AL	MP	PA	
	T	R	S	R	T	H	P	PA	FO	FNO
KMnO ₄ (Insaturaciones)	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
2,4-Dinitrofenilhidracina (Carbonilo)	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
FeCl ₃ (Oxidrilos fenólicos)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
H ₂ SO ₄ (Flavonoides)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Salkowski (Esteroles y triterpenos)	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Molish (Carbohidratos)	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+
Cumarinas	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Lactonas	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Baljet (Sesquiterpenlactonas)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Dragendorff (Alcaloides)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bicarbonato de Sodio (Saponinas)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
H ₂ SO ₄ - Formaldehído (Aromaticidad)	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+

T: Tallo; R: Raíz; S: Semilla; H: Hoja; P: Planta; PA: Parte Aérea; FO: Fracción Oleica; FNO: Fracción No Oleica;
SM: *S. marginatus*; GG: *G. glabra*; TF: *T. foenum-graecum*; JD: *J. dioica*; AL: *A. ludoviciana*; MP: *M. piperita*;
PA: *P. americana*

7.1.2 Determinación de la actividad tóxica de los extractos metanólicos de las especies vegetales sobre *A. salina*

Con respecto a la determinación de la DL₅₀ sobre *A. salina*, se observa en la Tabla 8 que todos los extractos utilizados tuvieron actividad biológica sobre dicho organismo. El extracto de *P. americana*, en sus fracciones oleica y no oleica, además de los extractos de *G. glabra* y *J. dioica* (raíz y tallo) mostraron niveles importantes de toxicidad (< 100 µg/mL) incluso en las dosis más bajas evaluadas; mientras que el resto de los extractos metanólicos (*T. foenum-graecum*, *M. piperita*, *A. ludoviciana*, hoja de *J. dioica* y *S. marginatus*) mostraron menor actividad a las mismas dosis, resultando ser moderadamente tóxicos, según la clasificación.

Tabla 8
Determinación de la toxicidad (DL₅₀) de extractos metanólicos sobre *A. salina*

Especie	Parte evaluada	DL ₅₀ [µg/mL]	Categoría de toxicidad		X ²	Significancia
			Rango [µg/mL]	Clasificación		
<i>T. foenum-graecum</i>	Semilla	714.75	100-1000	Moderadamente tóxico	30.756	0.043 ^a
<i>M. piperita</i>	Parte aérea	683.69	100-1000	Moderadamente tóxico	29.669	0.56 ^a
<i>A. ludoviciana</i>	Parte aérea	321.28	100-1000	Moderadamente tóxico	13.808	0.795 ^a
<i>J. dioica</i>	Hoja	197.62	100-1000	Moderadamente tóxico	73.722	0.000 ^a
<i>S. marginatus</i>	Tallo	131.06	100-1000	Moderadamente tóxico	16.217	0.643 ^a
<i>J. dioica</i>	Raíz	99.06	10-100	Muy tóxico	85.851	0.000 ^a
<i>G. glabra</i>	Raíz	64.92	10-100	Muy tóxico	29.095	0.065 ^a
<i>J. dioica</i>	Tallo	59.96	10-100	Muy tóxico	104.049	0.000 ^a
<i>P. americana</i> (criollo)	Semilla (fracción no oléica)	49.07	10-100	Muy tóxico	15.886	0.665 ^a
<i>P. americana</i> (criollo)	Semilla (fracción oléica)	44.59	10-100	Muy tóxico	44.415	0.001 ^a

A los datos obtenidos se les aplicó un análisis estadístico utilizando la prueba Probit, obteniendo la dosis letal media de cada uno de los tratamientos evaluados sobre *A. salina* (figura 18). En dicha gráfica se puede notar que los extractos de *T. foenum-graecum* y *M. piperita* llegan casi a los 1000 µg/mL, mientras que *A. ludoviciana*, la

hoja de *J. dioica* y *S. marginatus* se encuentran más bajo en su DL_{50} , sin embargo siguen estando dentro del rango de clasificación que los convierte en extractos moderadamente tóxicos; *A. ludoviciana* presentó una DL_{50} de 321.28 $\mu\text{g}/\text{mL}$; las fracciones de *J. dioica*, *G. glabra*, y *S. marginatus*, muestran una DL_{50} que va entre 50 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En el caso de *P. americana*, resultó ser el extracto con los valores más bajos, ya que ambas fracciones evaluadas mostraron una DL_{50} cercana a los 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, haciéndolos muy tóxicos. En la Tabla 8 se aprecian los valores de chi-cuadrada y la significancia estadística, presentando en todos los tratamientos un nivel de significancia mayor a una probabilidad de 0.05.

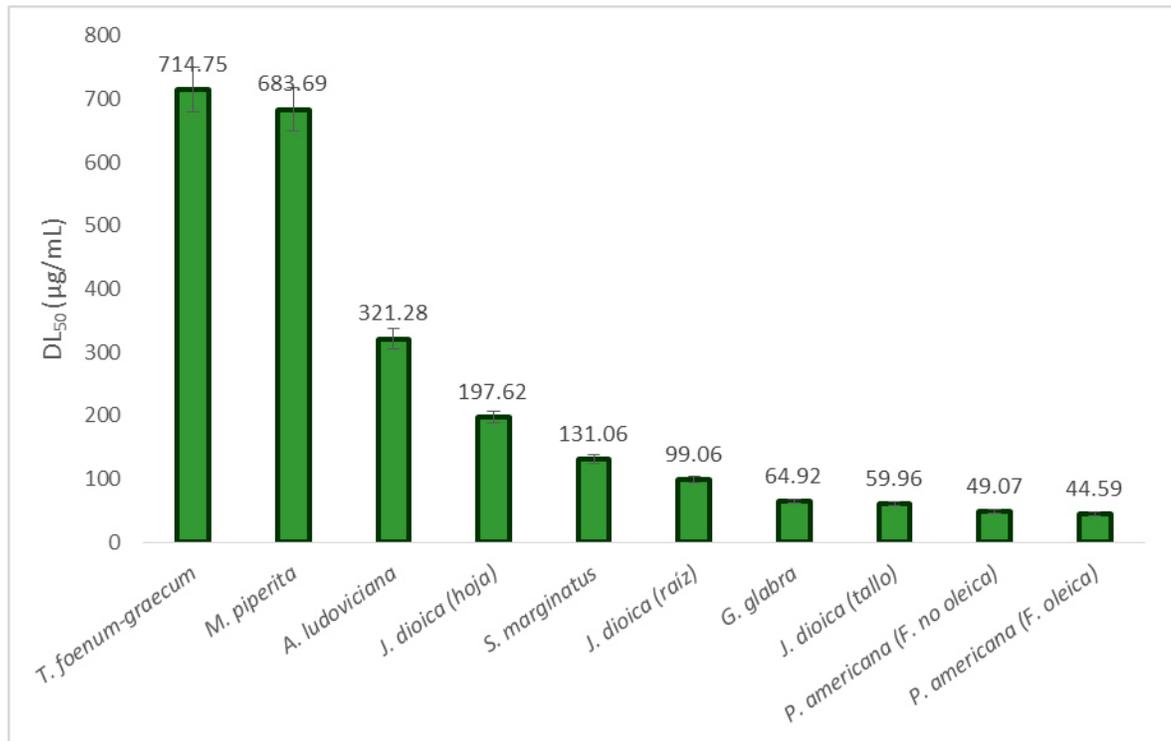


Figura 18. Comparación de la DL_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de los extractos metanólicos evaluados sobre *A. salina*.

Se observa que el extracto con mayor toxicidad corresponde al de la semilla de *P. americana* var. criollo (fase oleica), en tanto que el extracto que presentó menor toxicidad fue el de *T. foenum-graecum*, observando marcada diferencia.

7.2. *Helicobacter pylori*

7.2.1. Identificación

A) Caracterización macroscópica

Una vez obtenida la cepa ATCC 43504 de *H. pylori* se procedió a realizar la activación y resiembra en medio de cultivo Brucella para su mantenimiento. En caldo Brucella, incubada a 37 °C y aerobiosis, produjo biofilm en la parte superior del medio (Figura 19A), volviéndose muy notorio y denso a partir de los 3 ó 4 días de incubación. Al sembrarse en agar Brucella produjo colonias grandes, viscosas y con formación de gota. (Figura 19B).

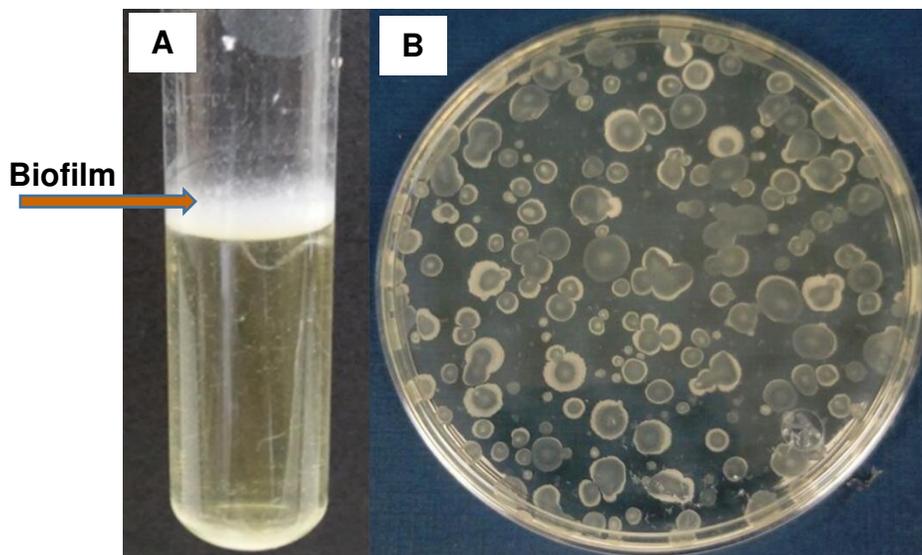


Figura 19. Aspecto de *H. pylori* a nivel macroscópico. (A) Biofilm producido por *H. pylori* en caldo Brucella y (B) colonias típicas de *H. pylori* en agar Brucella, las cuales muestran un punto central y crecimiento en forma de ámpula o de gota colgante

B) Caracterización microscópica

Enseguida se realizó tinción simple y tinción de Gram para poder observar al microscopio óptico la morfología típica del cultivo (Figura 20). Se puede distinguir claramente la morfología bacilo-helicoidal de la bacteria, además se comprueba su identificación como gram negativa, tal y como se describe en el manual de Bergey (1984) al mencionar las características morfológicas de *H. pylori*.

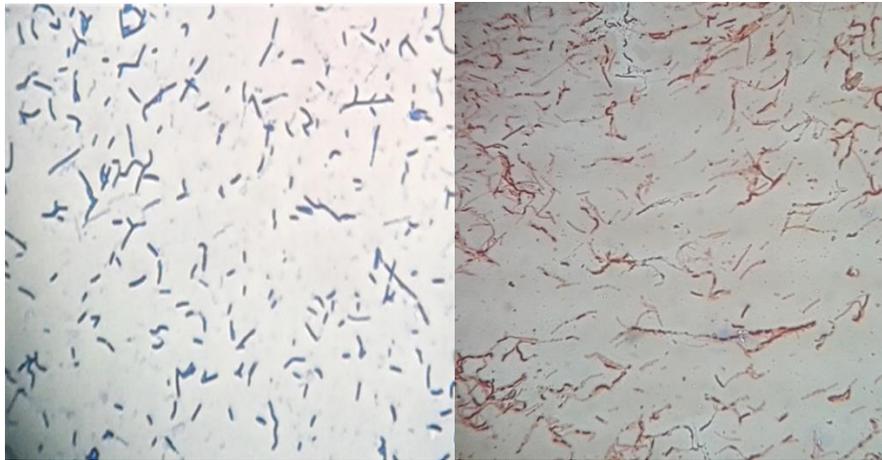


Figura 20. Observación de *H. pylori* en microscopio óptico (400X). Tinción simple (izquierda) y tinción de Gram (derecha)

C) Caracterización bioquímica

El Manual de Bergey también señala como características bioquímicas de *H. pylori* el ser catalasa y ureasa positivas. Tales pruebas bioquímicas se llevaron a cabo en este trabajo. Para la prueba de la catalasa, se añadieron varias gotas de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a un tubo con cultivo de *H. pylori* en caldo Brucella. La aparición de burbujas de O_2 indicó la positividad de la prueba (Figura 20). Para la prueba de la ureasa, se preparó agar urea en dos tubos, en uno de ellos se sembró por picadura una asada proveniente de un cultivo puro de *H. pylori*, y el segundo tubo se dejó como control negativo. Los tubos se incubaron a $37\text{ }^\circ\text{C}$, y se hicieron observaciones a las 24, 48 y 72 horas. El cambio en la coloración del medio, de amarillo a rosa, nos indicó la presencia de la enzima ureasa (Figura 21).

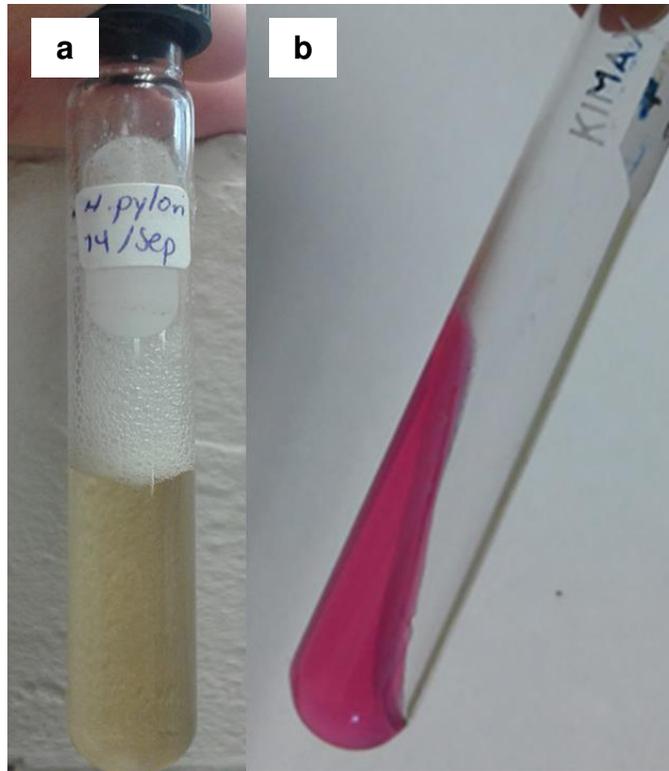


Figura 21. Pruebas bioquímicas para *H. pylori*. Se realizaron dos pruebas bioquímicas características para *H. pylori*: a) Prueba de la catalasa (+) y b) Prueba de la ureasa (+)

D) Caracterización molecular

Para comprobar la pureza de nuestro cultivo, se decidió correr una PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) con la revelación del ADN mediante un gel de electroforesis. Primeramente se diseñaron y obtuvieron los oligonucleótidos que codificaban para el gen *vacA* (Tabla 9), el cual es determinante para la cepa patógena de *H. pylori* y las condiciones de la extracción se muestran en la Tabla 10.

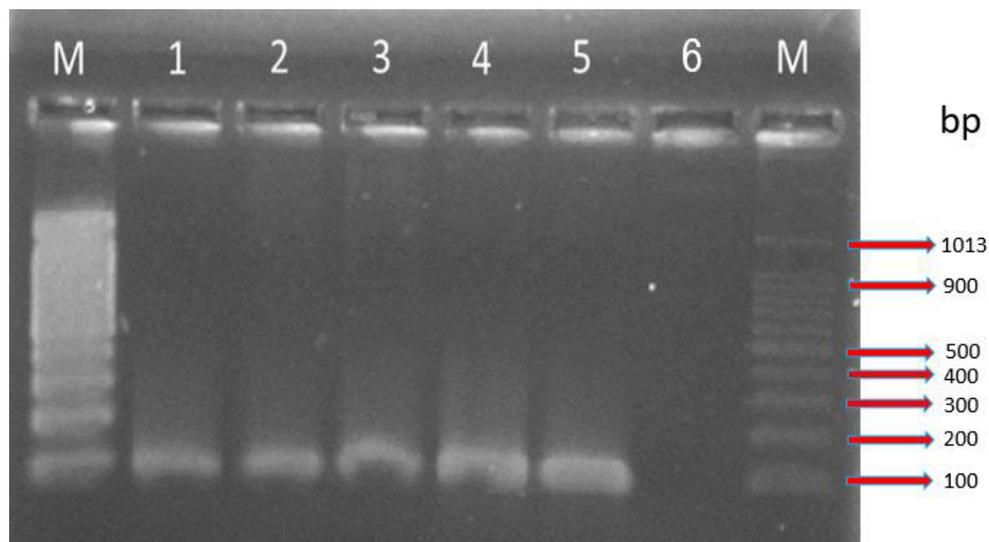
Tabla 9
Primers del gen *vacA*

Diseño de oligonucleótidos			
Gen	Forward	Reverse	Alineación (° C)
VacA	CCTACTGAGAATGGTGGCAATA	GTTCTTCACGAGAGCGTAGTT	55

Tabla 10
Condiciones en que se realizó la extracción del ADN de *H. pylori*

Condiciones del termociclador			
Programación	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95	8 min	1
Amplificación	95	30 s	35
	55	30 s	
	72	30 s	
Extensión	72	8 min	1
Enfriamiento	12	1 min	1

La purificación del ADN de *H. pylori* se comprobó mediante un gel de electroforesis, llevado a cabo en agarosa al 1%, con bromuro de etidio. El uso del transiluminador una vez teniendo el gel listo, nos reveló lo mostrado en la Figura 22.



M	Marcador	3,4 y 5	Cultivo de <i>H. pylori</i> en agar
1	Control cultivo de <i>H. pylori</i> (ATCC)	6	Control negativo
2	Cultivo de <i>H. pylori</i> en líquido		

Figura 22. Gel de agarosa que se reveló para evaluar la pureza del cultivo de *H. pylori*.
 Se puede identificar a M como marcador de peso molecular, los cuales nos indican el producto de ADN de *H. pylori*.

En la Figura 22 se observa que el ADN del cultivo de *H. pylori* (ATCC) muestra una banda de 100 pb de peso molecular, el mismo bandeo se observa en los cultivos de *H. pylori* cultivados en agar y caldo Brucella; se observa el mismo patrón en las

repeticiones (banda 3 a 5). Con esto se comprueba la pureza de la cepa de *H. pylori* con la cual se trabajó.

7.2.2 Cinética de crecimiento

En la Figura 23 se muestra la cinética de crecimiento de *H. pylori*; durante la primera hora de incubación se observa un ligero crecimiento, correspondiente a una fase de adaptación, y posteriormente se aprecia una fase exponencial o logarítmica, la cual continúa hasta la sexta hora después de incubación. El crecimiento de la bacteria se monitoreó durante 13 horas. Cada punto graficado corresponde a tres eventos independientes por triplicado.

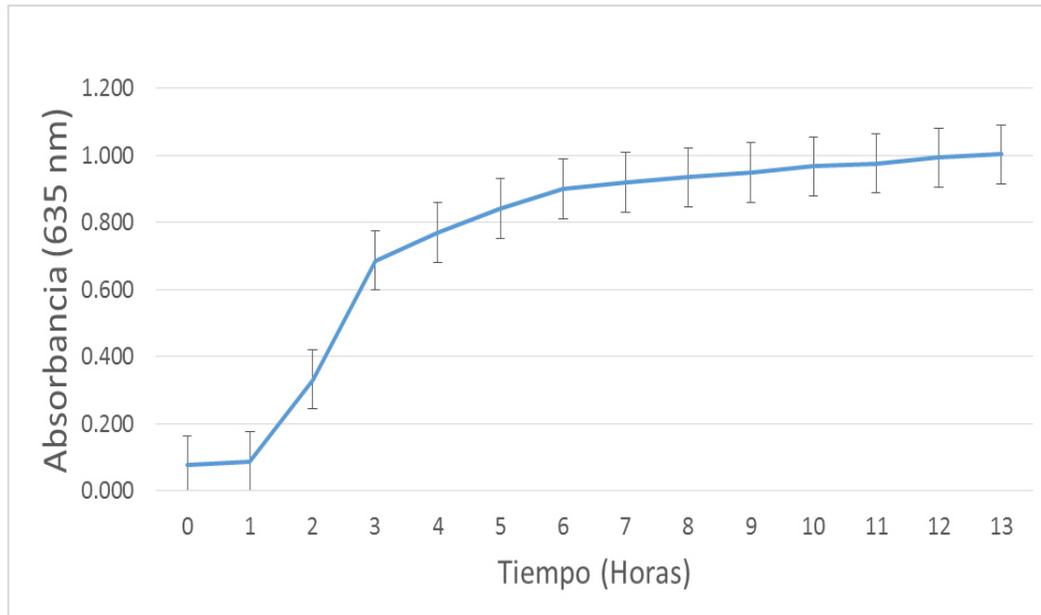


Figura 23. Cinética de crecimiento de *H. pylori*. En esta figura se muestra primeramente una fase de adaptación celular, seguida de una intensa fase exponencial, la cual da inicio en la hora 1 y empieza a decrecer aproximadamente a la hora 6. A continuación se aprecia una fase estacionaria hasta terminar dicha cinética.

7.3. Actividad biológica de los extractos metanólicos sobre *H. pylori*

A) Determinación de viabilidad celular mediante Técnica del MTT

Se evaluaron 8 concentraciones de los extractos *A. ludoviciana*, *S. marginatus*, *J. dioica* (raíz y hoja), *G. glabra* y *T. foenum-graecum* sobre *H. pylori*, mediante la determinación de viabilidad celular con el reactivo MTT. Los porcentajes de viabilidad e inhibición de todos los extractos se muestran en la Tabla 11, en donde se puede notar que *S. marginatus* inhibió a *H. pylori* aproximadamente 6 veces más que *A. ludoviciana* y que ésta última obtuvo una CI_{50} de 1.949 mg/mL. Además se observa que los demás extractos no tuvieron buena inhibición, ya que los porcentajes de viabilidad obtenidos estuvieron por encima del 80%. Así mismo, se muestran los valores de la CI_{50} (Concentración Media Inhibitoria), en mg/mL, mismos que se obtuvieron a partir del programa SPSS versión 20.0 (Figura 24).

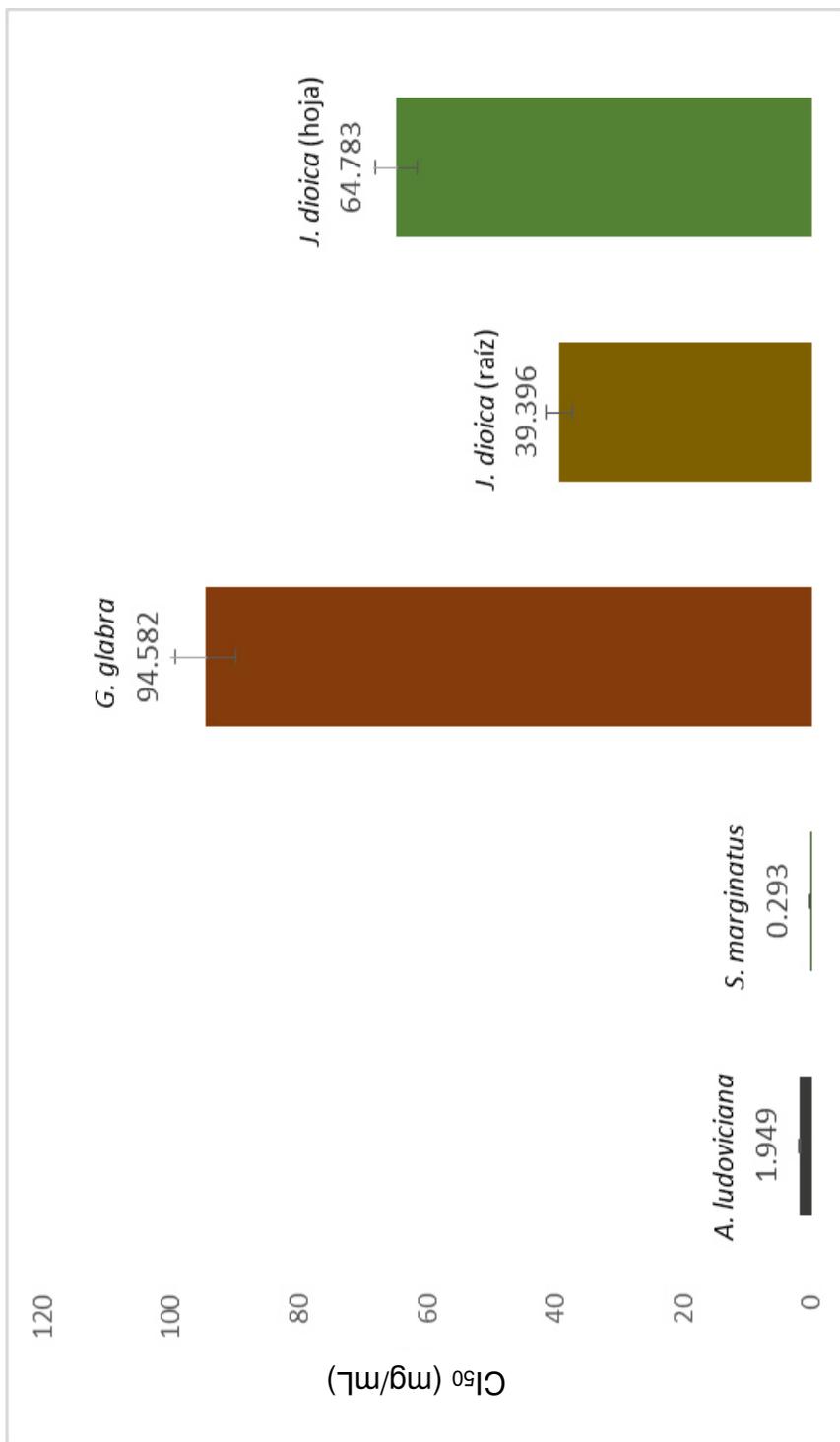


Figura 24. Comparación de los valores de CI₅₀ (mg/mL) de extractos metanólicos. Se muestra que la CI₅₀ del extracto metanólico de *S. marginatus* presenta un valor de 0.293 mg/mL, mientras que el extracto metanólico de *G. glabra* presenta un mayor valor. Con esto se puede determinar que el extracto *S. marginatus* posee mayor inhibición sobre *H. pylori*.

Tabla 11
Determinación de la inhibición porcentual de *H. pylori* por acción de los extractos metanólicos, así como valores de la Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀)

Extracto metanólico	Dosis (mg/mL)	% Viabilidad	% Inhibición	CI ₅₀ (mg/mL)
<i>A. ludoviciana</i>	10	25.77	74.23	1.949
	5	41.21	58.79	
	2.5	75.34	24.66	
	1.25	82.17	17.83	
	0.625	83.62	16.38	
	0.3125	79.1	20.9	
	0.156	84.47	15.53	
	0.078	79.35	20.65	
<i>S. marginatus</i>	10	65.1	34.9	0.293
	5	63.57	36.43	
	2.5	62.8	37.2	
	1.25	69.62	30.38	
	0.625	76.62	23.38	
	0.3125	78.24	21.76	
	0.156	78.33	21.67	
	0.078	74.74	25.26	
<i>G. glabra</i>	10	92.58	7.42	94.582
	5	94.37	5.63	
	2.5	93.77	6.23	
	1.25	92.66	7.34	
	0.625	88.65	11.35	
	0.3125	83.45	16.55	
	0.156	76.96	23.04	
	0.078	73.21	26.79	
<i>J. dioica</i> (raíz)	10	100	0	39.396
	5	100	0	
	2.5	100	0	
	1.25	96.5	3.5	
	0.625	95.05	4.95	
	0.3125	90.1	9.9	
	0.156	85.07	14.93	
	0.078	79.86	20.14	
<i>J. dioica</i> (hoja)	10	100	0	64.783
	5	100	0	
	2.5	100	0	
	1.25	95.39	4.61	
	0.625	91.81	8.19	
	0.3125	86.6	13.4	
	0.156	81.48	18.52	
	0.078	75.51	24.49	
<i>T. foenum-graecum</i>	10	86.26	13.74	27561.72
	5	93.52	6.48	
	2.5	95.39	4.61	
	1.25	96.59	3.41	
	0.625	91.72	8.28	
	0.3125	89.16	10.84	
	0.156	83.36	16.64	
	0.078	79.69	20.31	

En la Figura 25 y 26, se muestran los valores de absorbancia resultantes del bioensayo de inhibición de *H. pylori* por la técnica de MTT, mostrando la relación entre las dosis evaluadas de los extractos de *S. marginatus* y *A. ludoviciana*, respectivamente. En ambas gráficas se aprecia este decremento en el crecimiento del cultivo, siendo mayor en las dosis de 0.625 y 10 mg/mL.

El comportamiento del cultivo en presencia de los extractos *J. dioica* (hoja), *J. dioica* (raíz), *G. glabra* y *T. foenum-graecum* se muestra en las Figuras 27 a 30. Se comprueba que no existe inhibición a ninguna dosis evaluada.

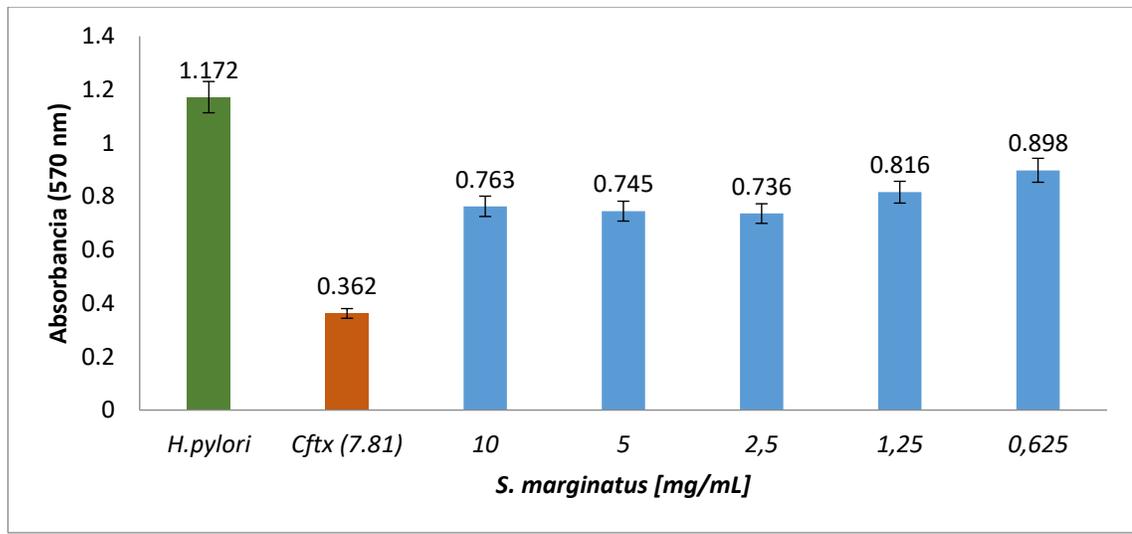


Figura 25. Comparación de valores de absorbancia por la técnica de MTT del extracto de *S. marginatus* sobre *H. pylori*. Se grafican las diferentes dosis evaluadas del extracto metanólico de *S. marginatus* sobre *H. pylori* en donde se observa que no hay diferencia entre dichos tratamientos, sin embargo se muestra que existe marcada inhibición sobre el cultivo de *H. pylori*.

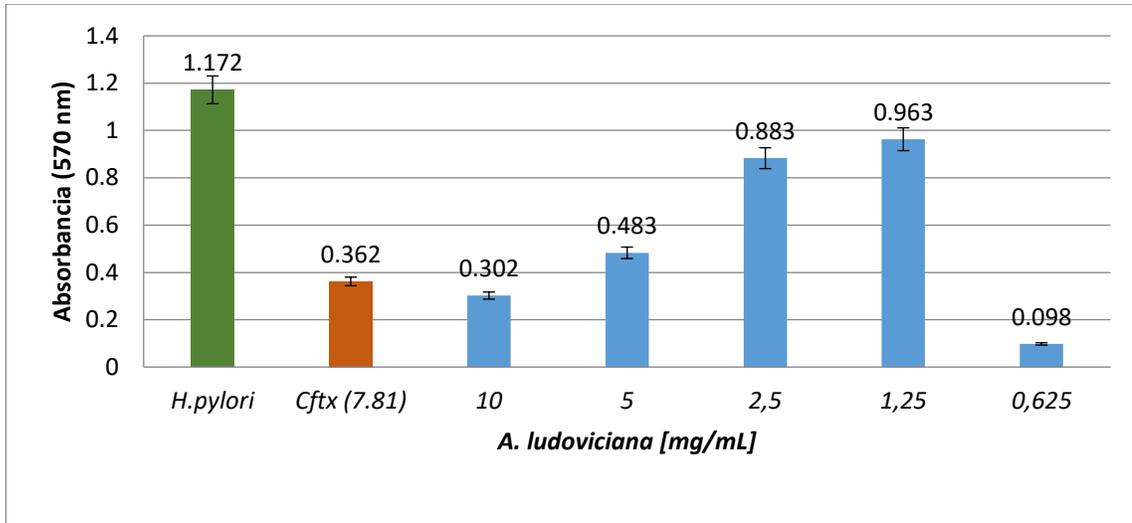


Figura 26. Comparación de valores de absorbancia por la técnica de MTT del extracto de *A. ludoviciana* sobre *H. pylori*. Se grafican las diferentes dosis evaluadas del extracto metanólico de *A. ludoviciana* sobre *H. pylori* en donde se observa que no hay diferencia entre dichos tratamientos, sin embargo se muestra que existe marcada inhibición sobre el cultivo de *H. pylori*.

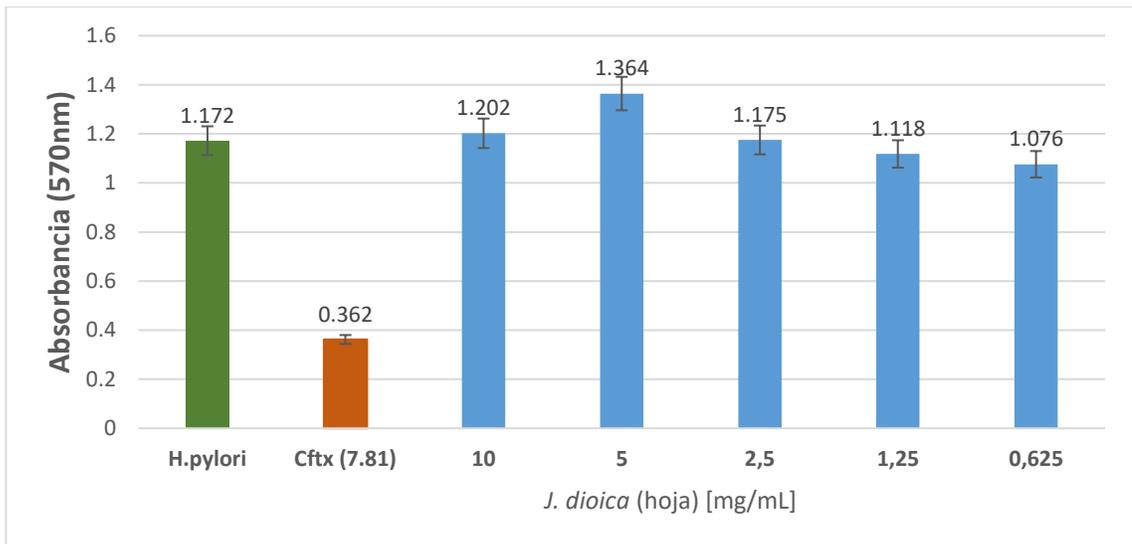


Figura 27. Comparación de valores de absorbancia por la técnica de MTT del extracto de hoja de *J. dioica* sobre *H. pylori*. Se grafican las diferentes dosis evaluadas del extracto metanólico de *J. dioica* sobre *H. pylori* en donde se observa que no existe inhibición sobre *H. pylori*.

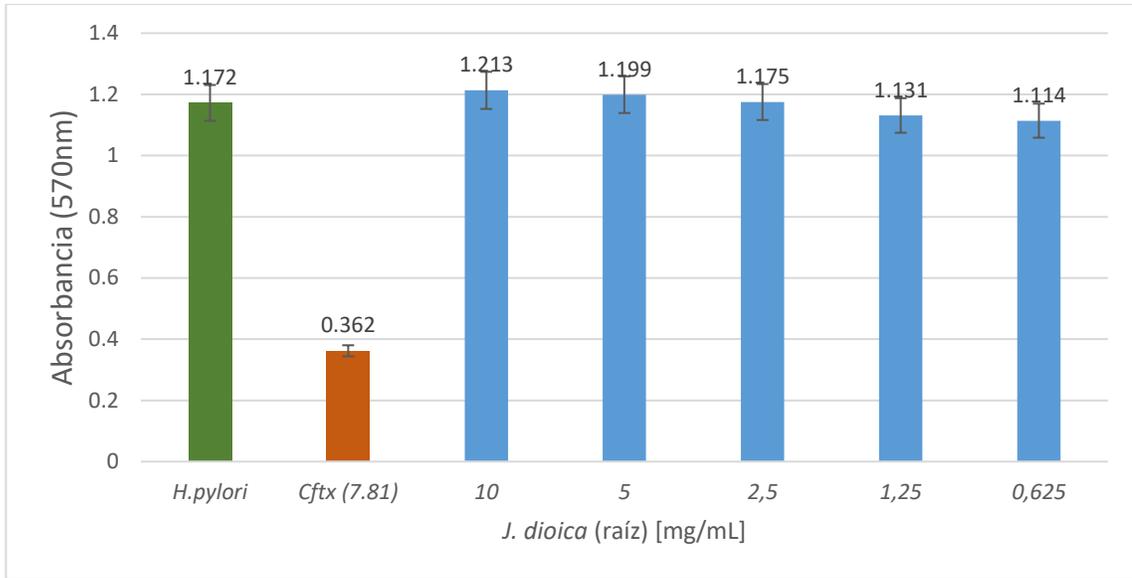


Figura 28. Comparación de valores de absorbancia por la técnica de MTT del extracto de raíz de *J. dioica* sobre *H. pylori*. Se grafican las diferentes dosis evaluadas del extracto metanólico de *J. dioica* sobre *H. pylori* en donde se observa que no existe inhibición sobre *H. pylori*.

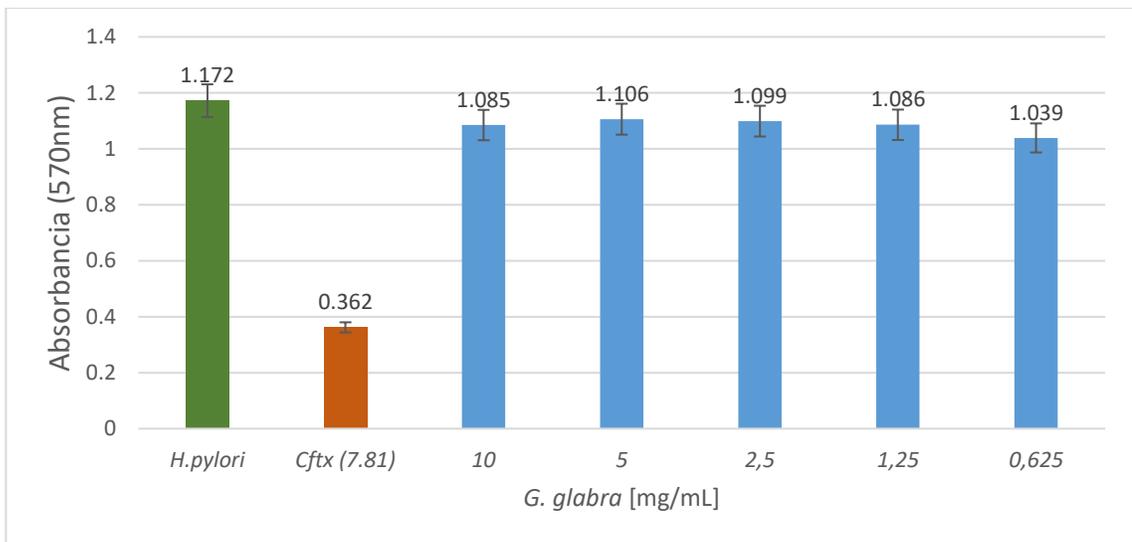


Figura 29. Comparación de valores de absorbancia por la técnica de MTT del extracto de *G. glabra* sobre *H. pylori*. Se grafican las diferentes dosis evaluadas del extracto metanólico de *J. dioica* sobre *H. pylori* en donde se observa que no existe inhibición sobre *H. pylori*.

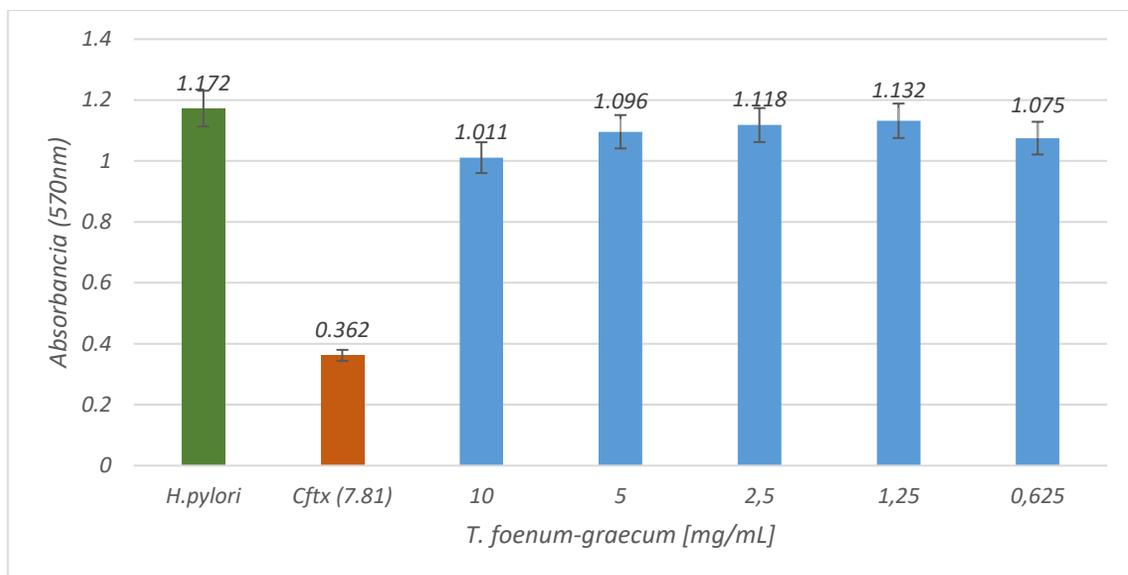


Figura 30. Comparación de valores de absorbancia por la técnica de MTT del extracto de *T. foenum-graecum* sobre *H. pylori*. Se grafican las diferentes dosis evaluadas del extracto metanólico de *J. dioica* sobre *H. pylori* en donde se observa que no existe inhibición sobre *H. pylori*.

B) Método turbidimétrico y recuento bacteriano en placa

Después de haber obtenido las absorbancias de los tratamientos y de graficar los datos por el método de microdilución con MTT, se eligieron los extractos metanólicos de *A. ludoviciana* y *S. marginatus* para trabajar en la técnica de recuento bacteriano en placa y así determinar las unidades formadoras de colonias (UFC/mL). En la Figura 31, se muestran los resultados de las UFC/mL de *H. pylori* en cultivo normal, así como de *H. pylori*, en presencia de los extractos metanólicos *A. ludoviciana* y *S. marginatus* a la dosis de 0.1 mg/mL y en la Figura 32 se observa la determinación de UFC/mL correspondiente a los tratamientos mencionados en la Figura 31.

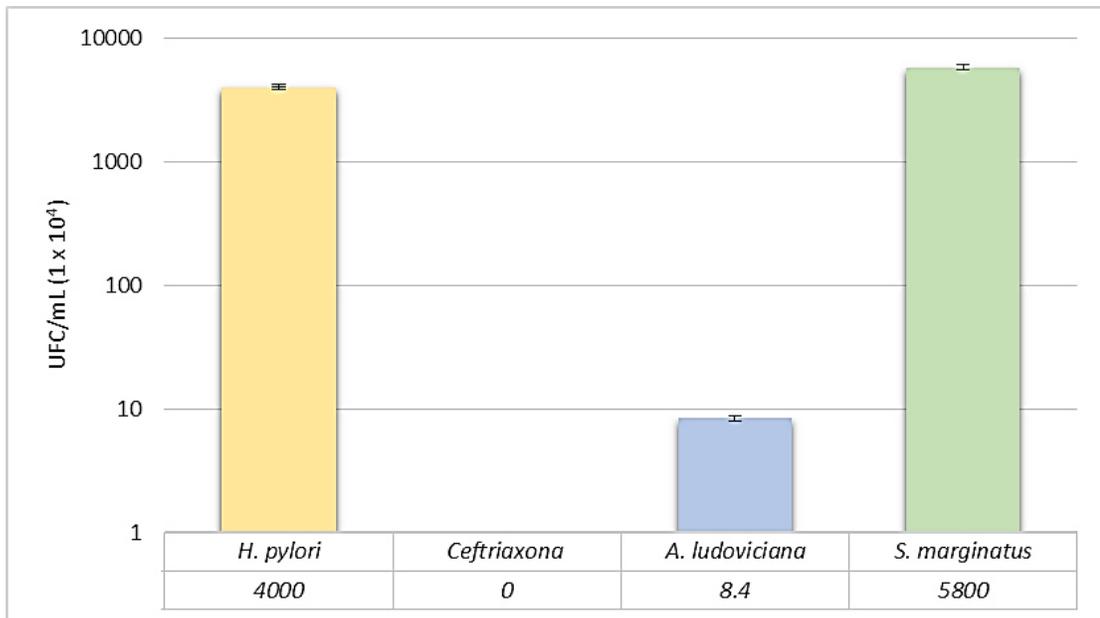


Figura 31. Resultados de las UFC/mL de *H. pylori* con tratamientos. En el gráfico se observa como control a *H. pylori* el cual arrojó un conteo de 4000×10^4 UFC/mL; enseguida se muestra al tratamiento elegido como control positivo de inhibición, es decir, la droga ceftriaxona, la cual no dio ningún crecimiento de la bacteria en placa. Enseguida se muestran ambos tratamientos.

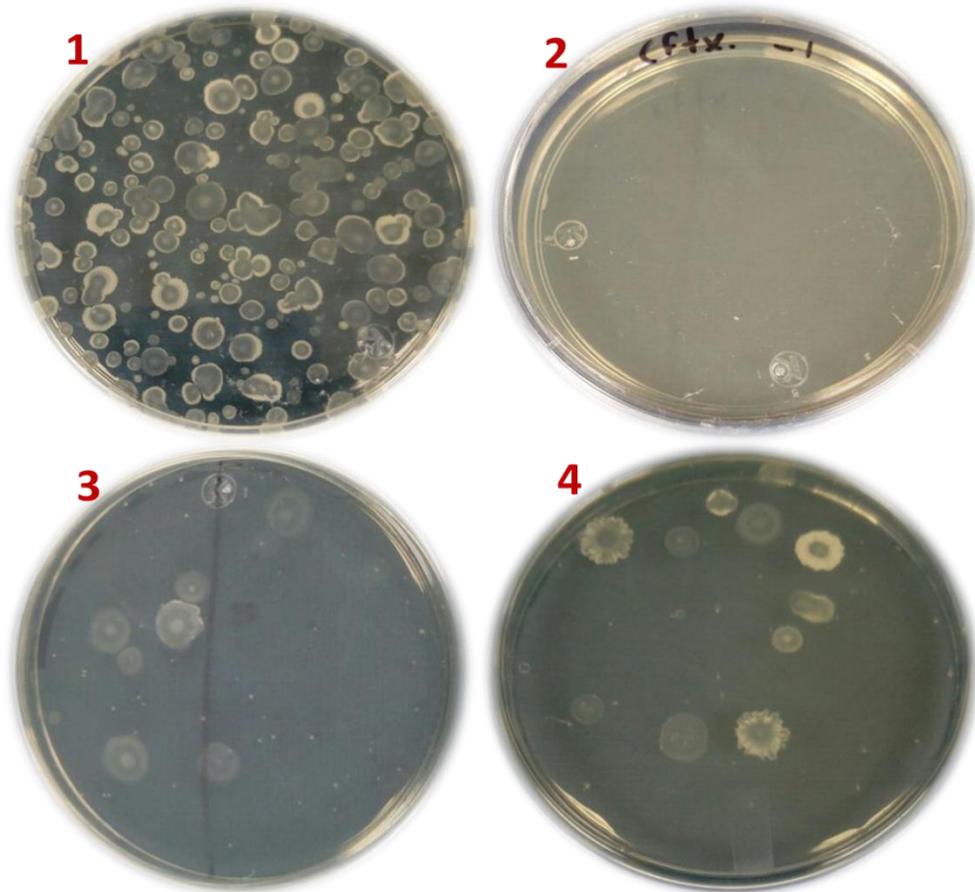


Figura 32. Aspecto de las UFC/mL de *H. pylori* en el medio Brucella. 1) aspecto general de las colonias de *H. pylori* caracterizada por la presencia de un cumulo central y bordeado de un halo o biofilm cubriendo a la colonia. 2) Cultivo de *H. pylori* en presencia de ceftriaxona, en la placa se observa inhibición total, 3 y 4) Aspecto del cultivo de *H. pylori* en presencia de *A. ludoviciana* y *S. marginatus* respectivamente.

7.4. Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos metanólicos con actividad anti-*H. pylori*

Se evaluó la citotoxicidad de los extractos metanólicos de *A. ludoviciana* y *S. marginatus* en concentraciones que fueron desde 0.078 hasta 10 mg/mL, sobre linfocitos humanos sanos, con el fin de determinar algún efecto en estas células que indicaran la toxicidad de dichas especies. Se compararon tales comportamientos con el efectuado por la concanavalina-A así como con el control, correspondiente a un cultivo normal de linfocitos y se puede observar en la Figura 33 los valores de absorbancia de cada uno de los tratamientos. Ningún tratamiento resultó ser tóxico, esto indicado por

las absorbancias mayores al control. Sin embargo se debe resaltar el hecho de que el extracto metanólico de *S. marginatus* a la dosis de 5 mg/mL presenta un valor inferior al control, aunque no presenta diferencia, sin embargo se ve incrementada la absorbancia de los linfocitos cuando estuvo en presencia del extracto metanólico de *S. marginatus* + CoA. De igual manera se observa un alto incremento de la absorbancia de los linfocitos en presencia del extracto metanólico de *S. marginatus*, notándose dicho incremento en dos terceras partes en comparación con el control, este valor es mayor incluso que cuando el bioensayo se realizó con el extracto metanólico + CoA (Figura 33).

En el caso de los ensayos realizados con el extracto metanólico de *A. ludoviciana* y los linfocitos, se observa que el valor de absorbancia con respecto al control no presenta diferencia significativa a las 8 dosis evaluadas. Este mismo bioensayo pero realizado en presencia de CoA muestra un incremento en el valor de la absorbancia a la concentración de 10 y 5 mg/mL, sin embargo entre ellos no se observa diferencia significativa y además se observa una marcada diferencia con respecto al valor obtenido solo con la CoA (Figura 33).

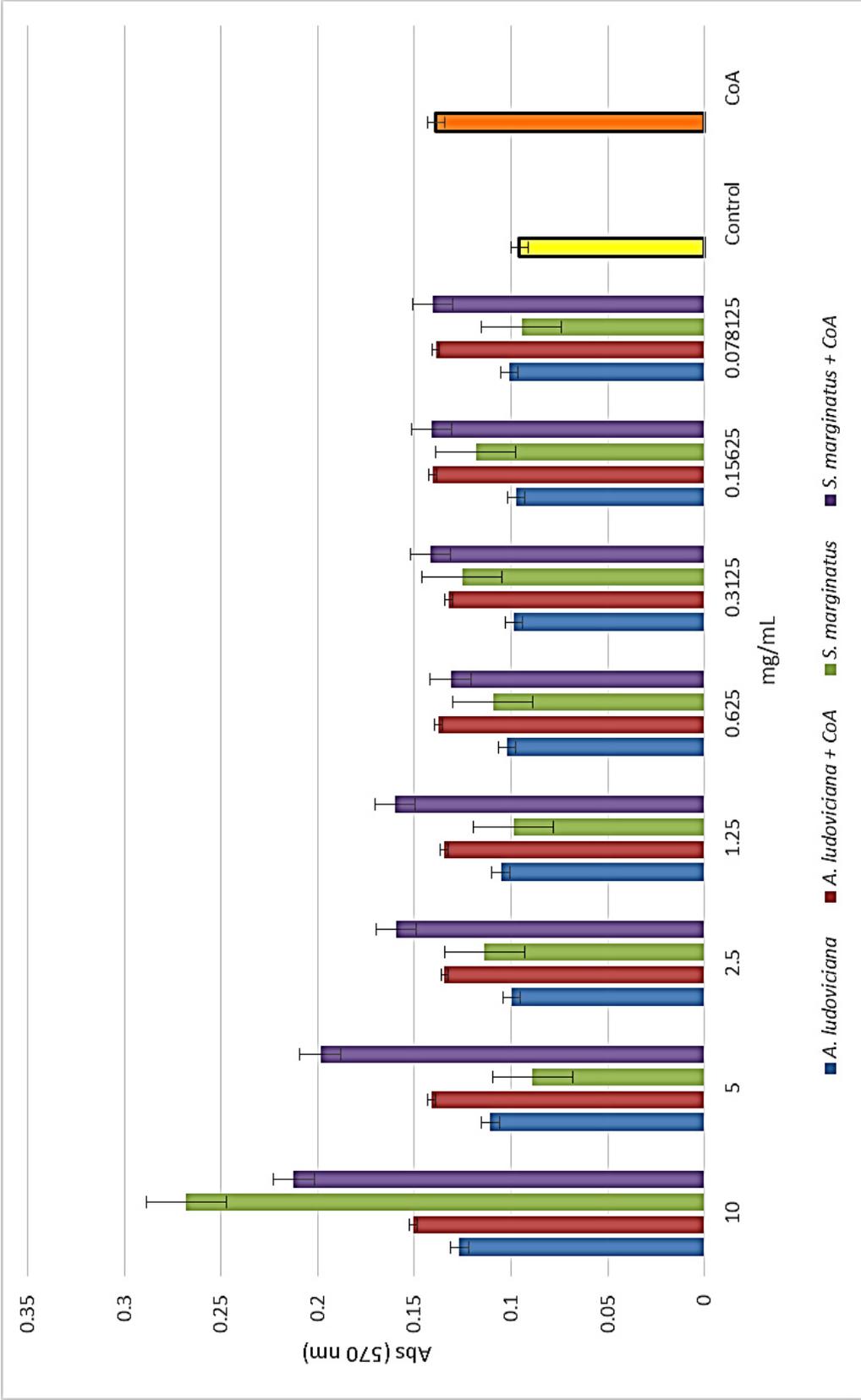


Figura 33. Resultados de las absorbancias a 570 nm de los tratamientos *A. ludoviciana* y *S. marginatus* en presencia de linfocitos humanos y concanavalina A

7.5 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos con mayor actividad anti-*H. pylori*

Se determinó la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de *A. ludoviciana* y *S. marginatus* mediante el método del DPPH (Tablas 12 y 13 respectivamente). Dicha actividad se expresa como el porcentaje de la actividad antioxidante, lo cual indica el porcentaje de inhibición del radical DPPH neutralizado por cada extracto a determinadas concentraciones, y también se obtuvieron los valores de la concentración antioxidante media (CA₅₀) de cada extracto, mediante un análisis Probit utilizando el paquete estadístico SPSS, los resultados obtenidos muestran que de los dos extractos evaluados, el de *A. ludoviciana* presenta mayor capacidad antioxidante, ya que se requiere una concentración de 0.086 µg/mL del extracto metanólico de *A. ludoviciana* para reducir el 50% del DPPH, presentando este extracto 8 veces más potencial antioxidante que el extracto metanólico de *S. marginatus*.

Tabla 12
Determinación de la actividad antioxidante de *A. ludoviciana*

Concentración (µg/mL)	Promedio de absorbancia	Desviación estándar	Actividad antioxidante [%]	Concentración antioxidante media (CA ₅₀)
DPPH	1.106	0.001	-	0.086 µg/mL
Metanol	0.04	0.021	-	
DPPH+Metanol	0.827	0.003	-	
0.02	0.866	0.017	2.41	
0.40	0.679	0.013	23.41	
0.08*	0.356	0.019	59.90	
0.10	0.228	0.017	74.33	
0.20	0.121	0.015	86.32	

Tabla 13
Determinación de la actividad antioxidante de *S. marginatus*

Concentración (µg/mL)	Promedio de absorbancia	Desviación estándar	Actividad antioxidante [%]	Concentración antioxidante media (CA ₅₀)
DPPH	1.106	0.001	-	0.692 µg/mL
Metanol	0.04	0.021	-	
DPPH+Metanol	0.827	0.003	-	
0.25	0.658	0.016	20.48	
0.50	0.564	0.009	31.84	
0.75*	0.311	0.015	62.35	
1.00	0.178	0.003	78.48	
1.25	0.153	0.003	81.46	
1.50	0.153	0.000	81.50	
2.00	0.154	0.008	81.42	

7.6. Microscopía de Fuerza Atómica

Se llevó a cabo la preparación de muestras de células de *H. pylori* cultivadas en presencia del extracto metanólico de *A. ludoviciana* y de *S. marginatus*, así como de la droga ceftriaxona, para la observación mediante microscopía de fuerza atómica (MFA) por el modo semi-contacto. El análisis morfológico de las células en presencia de los tratamientos fue estudiado mediante el software NOVA 1.1.0.1921.

7.6.1 Determinación de los parámetros morfométricos de *H. pylori*

1) Análisis de *H. pylori* (Control)

En la Figura 34 se observan las imágenes correspondientes al análisis de altura, longitud y ancho de *H. pylori* (control). En la imagen A se muestra la medida de longitud de una célula de *H. pylori* indicando un valor de 4.27 µm, además se interpreta en la imagen que la célula es alta indicado por el tono más claro, y por el contrario, las zonas oscuras de la imagen representan las partes más profundas. En la imagen B se observa la topología característica de *H. pylori* la cual es elevada en los bordes y de menor altura en la región media, el análisis de altura muestra un valor de 0.272 µm; en la imagen C se muestra el valor de 0.69 µm de ancho y en la imagen D se observa la topografía de *H. pylori* al realizar la lectura de ancho. Se realizaron diferentes mediciones de estos parámetros morfométricos en diversas muestras de *H. pylori*, y los promedios se observan en la Tabla 14.

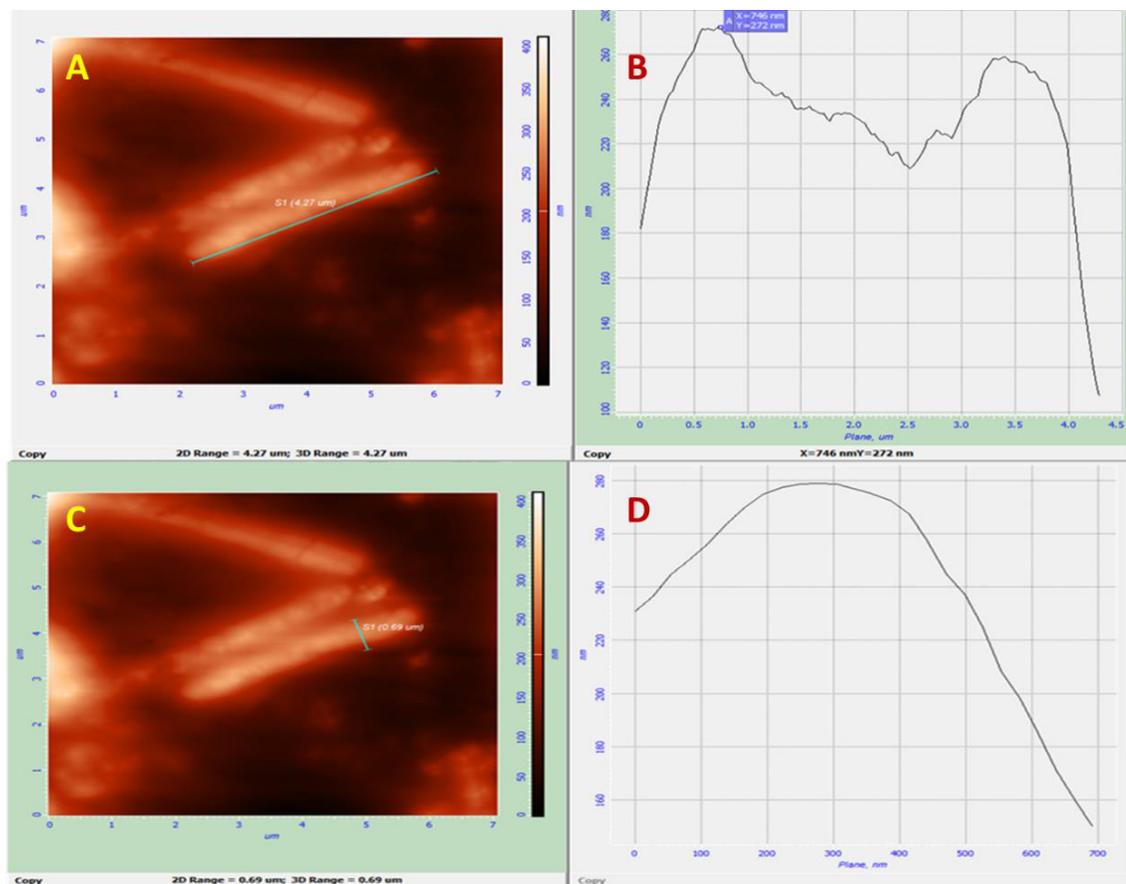


Figura 34. Análisis morfológico de *H. pylori* al MFA. La imagen A corresponde al análisis de longitud, la imagen B corresponde al análisis de altura y topológico, en la imagen C se observa la lectura del ancho de una célula y en D se observa la topología a nivel de la medición del ancho de esa misma célula

2) Análisis de *H. pylori* cultivada en presencia del extracto metanólico de *A. ludoviciana*

En la Figura 35 aparecen las células del cultivo de *H. pylori* en presencia del extracto metanólico de *A. ludoviciana* [0.1 mg/mL], en donde se muestra la imagen en un plano de las células obtenida al MFA; dichas células poseen diversa morfología y una de ellas fue analizada resultando con una longitud de 10.3 μm , mostrando el típico aspecto helicoidal de la bacteria, sin embargo no todas las células presentaron el mismo aspecto. En la imagen B se observa el análisis topológico y de altura, indicándose una altura de 2.2179 μm para una célula individual y una topología irregular, presentando zonas elevadas y zonas bajas. Se realizaron diversas mediciones en diferentes células llegando a obtener un dato promedio, el cual se encuentra registrado en la Tabla 14.

El análisis de ancho de la misma célula muestra un valor de 5.2 μm y en la imagen D se visualiza el aspecto topológico obteniendo un valor de altura de 2.17 μm . Este análisis topológico indica que la célula bajo este tratamiento presenta bordes muy regulares. Ver Tabla 14 para revisar la comparación de promedios obtenidos.

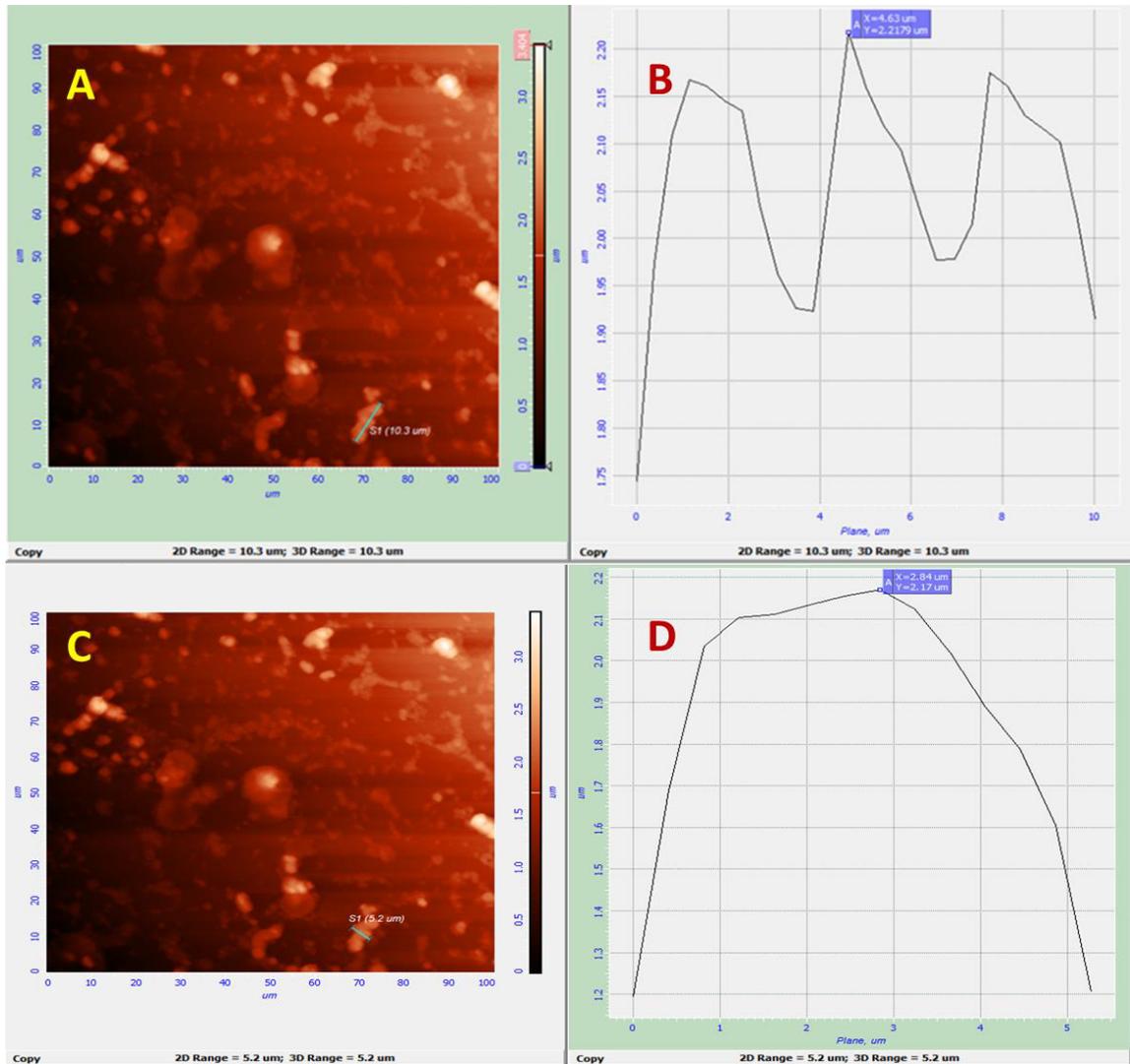


Figura 35. Análisis morfométrico de *H. pylori* cultivada en presencia del extracto metanólico de *A. ludoviciana* y analizada al MFA. La imagen A corresponde al análisis de longitud, la imagen B corresponde al análisis de altura y topológico, en la imagen C se observa la lectura del ancho y en D se observa la topología de la medición del ancho de la célula

3) Análisis de *H. pylori* cultivada en presencia del extracto metanólico de *S. marginatus*

En la Figura 36 se observan las células del cultivo de *H. pylori* en presencia del extracto metanólico de *S. marginatus* [0.1 mg/mL], en A se observa la imagen correspondiente a la medida de longitud al MFA, representando un valor de 4.45 μm ; el análisis topográfico (B) muestra daño en la forma de la célula, ya que los extremos no son elevados como se observó en el control (Figura 36B), además el cuerpo celular se observa muy elevado con bordes regulares.

El valor del ancho obtenido de la misma célula es de 1.10 μm y en la imagen D se observa el aspecto topológico mostrando una altura de 1.46 μm . Este análisis topológico indica que la célula bajo este tratamiento presenta bordes muy regulares y de aspecto elevado. Ver Tabla 14 para revisar la comparación de promedios obtenidos.

En la Tabla 14 se muestra el promedio de los valores obtenidos al analizar los parámetros de longitud, altura y ancho de *H. pylori* (control), *H. pylori* cultivada en presencia de los extractos metanólicos de *S. marginatus* y *A. ludoviciana*.

Tabla 14
Comparación de los parámetros morfométricos de *H. pylori* al AFM cultivada en presencia de extracto metanólico de *S. marginatus* y *A. ludoviciana*

Parámetros	<i>H. pylori</i>	<i>S. marginatus</i>	<i>A. ludoviciana</i>
Ancho (μm)	0.92	1.12	4.075
Largo (μm)	4.06	3.75	9.775
Altura (μm)	0.383	0.667	1.96

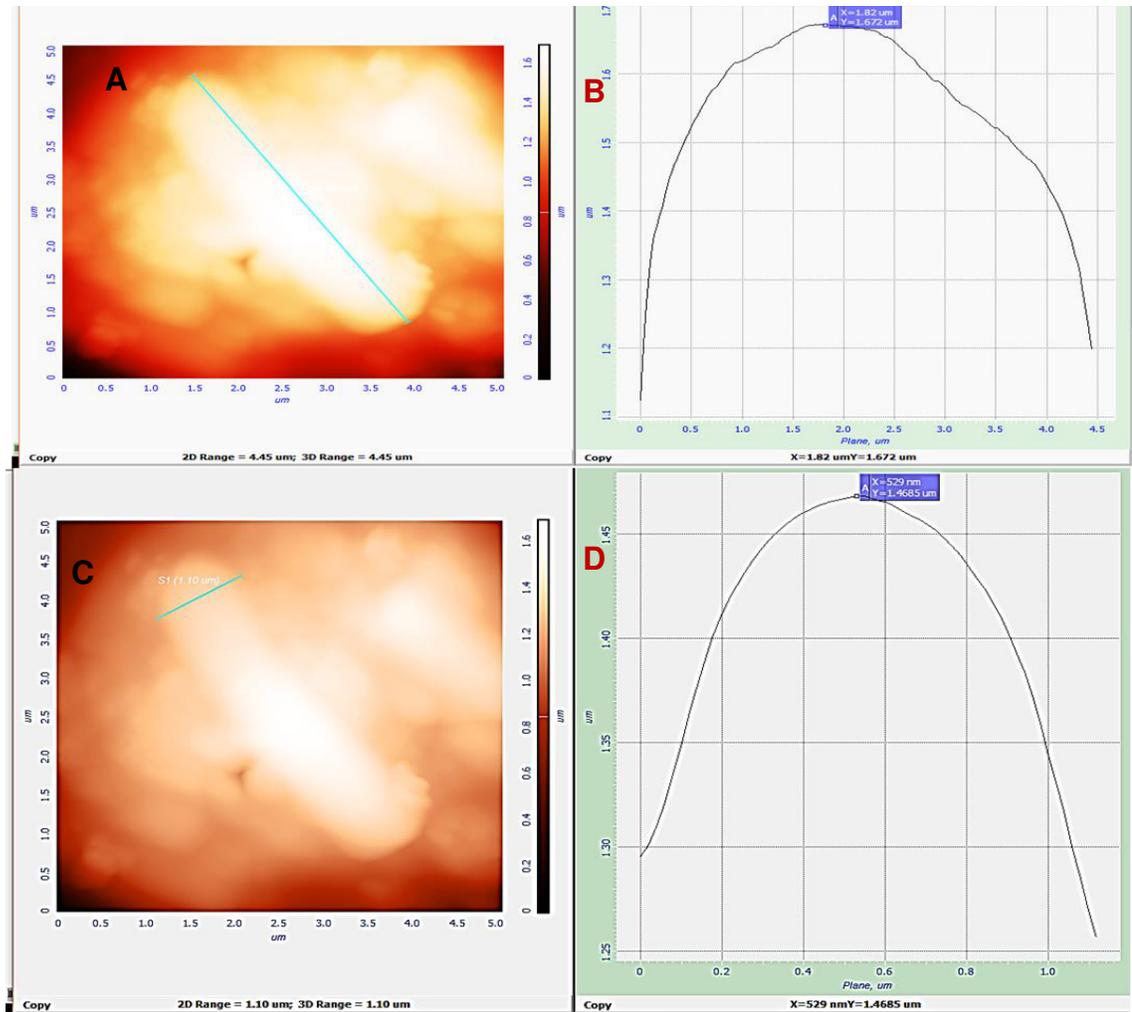


Figura 36. Análisis morfométrico de *H. pylori* cultivada en presencia del extracto metanólico de *S. marginatus* y analizada al MFA. La imagen A corresponde al análisis de longitud, la imagen B corresponde al análisis de altura y topológico, en la imagen C se observa la lectura del ancho y en D se observa la topología de la medición del ancho de la célula.

En la Figura 37 se muestra el promedio de los valores obtenidos de cada uno de los parámetros analizados (largo, ancho y altura). Se observa que *H. pylori* cultivada en presencia del extracto metanólico de *A. ludoviciana* modifica los 3 parámetros con respecto a *H. pylori* (control). La longitud de *H. pylori* tratada con el extracto metanólico de *A. ludoviciana* es mayor y presenta marcada diferencia con respecto al control, se observa el mismo comportamiento al evaluar los parámetros de altura y ancho.

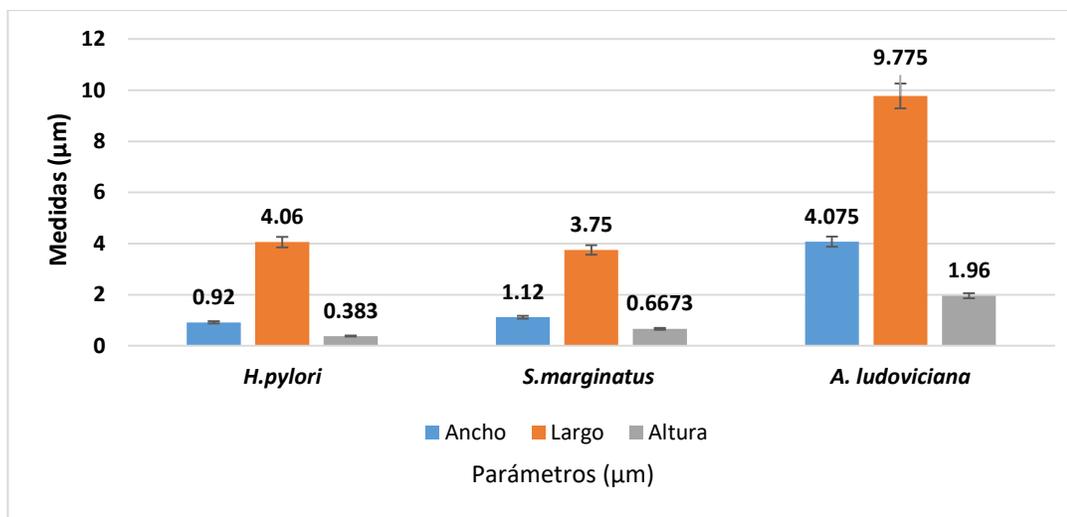
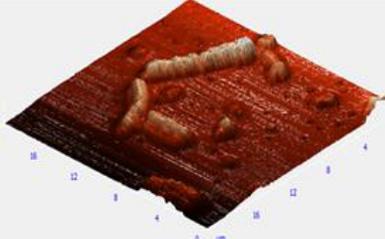
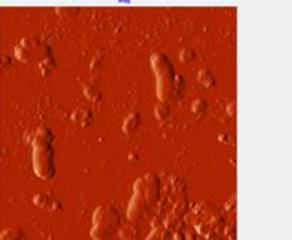
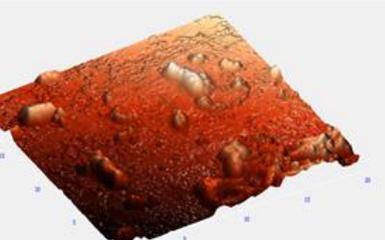
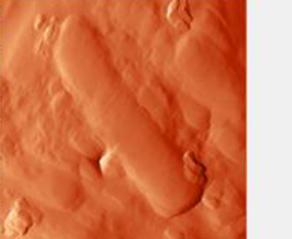
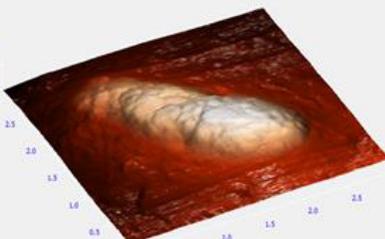


Figura 37. Comparación de los parámetros morfométricos de *H. pylori*. Se observa diferencia significativa entre los parámetros del cultivo control y del cultivo en presencia del extracto metanólico de *A. ludoviciana*.

En la Tabla 15 se presenta un resumen de los diferentes tratamientos *H. pylori* (control, y extractos), en la cual se aprecian las imágenes correspondientes a la magnitud de *H. pylori*, así como también imágenes en 3D de cada tratamiento.

Respecto a la magnitud, se aprecia en las imágenes la misma composición del material celular; en sus correspondientes imágenes en 3D, se observa la morfología de *H. pylori* y su topología celular, tanto en el control como en ambos tratamientos. En la imagen de *H. pylori* control se observa la morfología típica en forma de bacilo curvado, la imagen de *H. pylori* con el extracto metanólico de *A. ludoviciana* muestra alteraciones en la morfología celular, ya que se observan bacilos cortos, y algunos curvados, es decir se aprecia mayor diversidad morfológica. En la imagen correspondiente a *H. pylori* con el extracto metanólico de *S. marginatus* se aprecia un bacilo largo, no curvado y sin elevaciones en los extremos de la célula, indicando así una diferencia respecto al control.

Tabla 15
Comparación de la magnitud e imagen en 3D de *H. pylori* (control) y en presencia de los extractos metanólicos de *A. ludoviciana* y *S. marginatus*

TRATAMIENTO	MAGNITUD	IMAGEN 3D
<p align="center"><i>H. pylori</i> (control)</p>		
<p align="center"><i>H. pylori</i> + Extracto metanólico de <i>A. ludoviciana</i></p>		
<p align="center"><i>H. pylori</i> + Extracto metanólico de <i>S. marginatus</i></p>		

8. DISCUSIONES

La elección de las plantas estudiadas en este trabajo se deriva de que existen antecedentes que hablan sobre su actividad antimicrobiana, además que son utilizadas por la medicina tradicional contra padecimientos gastrointestinales, como es el caso del istafiate, el fenogreco y el regaliz. Además, la mayoría de las especies se encuentran distribuidas en la región, principalmente en los estados del norte de México.

Posterior a la obtención de los extractos metanólicos se procedió a realizar una serie de pruebas químicas colorimétricas, que permitieron un análisis cualitativo con base en la presencia de varios grupos funcionales; esto lo indica Cannell en 1998, con respecto a las mezclas de productos naturales que han sido extraídos con solventes, mencionando que cuando un reactivo reacciona con un metabolito se produce un compuesto colorido.

Las diferentes partes de una planta están desigualmente provistas de principios activos. Las que llegan a tener una aplicación en la medicina, se denominan drogas vegetales. La hoja, asiento de todas las síntesis químicas vegetales, es la parte más empleada, ya que contiene una gran cantidad de heterósidos, compuestos que se emplean como medicamentos, y además de poseer la mayor parte de los alcaloides. El tallo es sólo una vía de tránsito entre las raíces y las hojas, pero puede contener principios activos; en especial la corteza y la albura, parte del tallo situada entre la médula y la corteza, tienen, a veces, virtudes terapéuticas. El tallo termina en una yema, donde se localizan las células meristemáticas que determinan el crecimiento de la planta. Algunas yemas poseen propiedades antisépticas, siendo utilizadas para eliminar ciertos microorganismos. La raíz extrae el agua con sales minerales del suelo y la bombea hacia las hojas. Por lo tanto, acumulan a menudo azúcares, vitaminas e incluso alcaloides. La flor es encargada de transmitir el mensaje hereditario, sin embargo, puede tener presente algunos principios activos, por lo que puede llegar a ser apreciada en fitoterapia. Los pétalos coloreados son ricos en pigmentos, de los cuales se conoce actividad antioxidante. Por último, la semilla o grano es un depósito de reserva de alimentos para

la futura planta, por lo cual está provista principalmente de proteínas, glúcidos y lípidos (Muñoz 2002).

Un estudio previo, relacionado a la etnobotánica medicinal, liderado por Domínguez y colaboradores, en el 2015, encontró que las familias botánicas con mayor número de especies con un fin terapéutico son Asteraceae, Lamiaceae, Euphorbiaceae y Fabaceae, coincidiendo con nuestras plantas al pertenecer casi todas las evaluadas, a dichas familias. Entre las familias registradas, la Asteraceae fue la más diversa, y ocupó el primer sitio en cuanto a usos medicinales se refiere. Dentro de esta familia se destaca *A. ludoviciana*, la cual se evaluó en nuestro trabajo, misma que resultó como una de las principales plantas utilizadas para aliviar problemas en el sistema digestivo e hígado.

Alonso et al. 2008, realizaron un estudio fitoquímico a numerosas especies de esta misma familia (Asteraceae), colectadas en algunas zonas de México, y encontraron que los metabolitos predominantes en la mayoría son flavonoides, saponinas, taninos, sesquiterpenos, glucoalcoholes, aceites esenciales, alcaloides estéricos, compuestos terpénicos, lactonas, glucósidos y ácidos fenólicos, por citar algunos de los más representativos. Esto también concuerda con nuestro trabajo, en el cual se encontró que *A. ludoviciana*, miembro de esta familia, posee saponinas, lactonas, alcaloides, azúcares, flavonoides, triterpenos y sesquiterpenlactonas, resultando ausentes los grupos aromáticos (Ver Tabla 7), y demostrando que esta amplia variedad de compuestos químicos con acciones fisiológicas importantes le confieren a la planta sus propiedades medicinales para el tratamiento de enfermedades relacionadas al tracto digestivo principalmente, así como en cuestiones alimentarias.

Respecto a las partes vegetales de las plantas, Domínguez et al. 2015 determinaron que la hoja es usada con más frecuencia en los preparados herbolarios (54.1 %), seguida de la raíz (10.2 %), el tallo (9.2 %), la flor (8.2 %), la corteza (6.1 %), el fruto (5.1 %), la semilla (4.1 %), la resina (2 %) y la planta completa (1 %).

Extractos hidrometanólicos de *G. glabra* fueron sometidos a análisis fitoquímico, por Varsha et al. 2013, encontrando que la raíz de esta planta posee saponinas, flavonoides, alcaloides, esteroides, terpenoides, taninos y glicósidos, mismos que fueron encontrados en nuestro extracto metanólico también de raíz (Ver Tabla 7).

Se han realizado análisis fitoquímicos de la especie *T. foenum-graecum* y se ha encontrado que el extracto etanólico crudo de las semillas, posee metabolitos como alcaloides, esteroides, flavonoides, carbohidratos y glicósidos (Mowla et al. 2009). En nuestro trabajo se encontró que esta misma especie, posee en su semilla compuestos como oxhidrilos fenólicos, sesquiterpenlactonas, y de igual manera, los mencionados anteriormente, esto en el extracto metanólico analizado (Ver Tabla 7).

Los grupos funcionales encontrados en *S. marginatus*, concuerdan con los reportados por Moreno et al. 2015, quienes indican la presencia en el tallo de la planta, de insaturaciones, grupo carbonilo, oxhidrilos fenólicos, esteroides, triterpenos, azúcares, lactonas, sesquiterpenlactonas, flavonas y alcaloides, a excepción de las saponinas, encontradas en este trabajo. Si bien, Bravo y Sánchez 1978, mencionan que las cactáceas son un grupo de vegetales que presentan un gran número de compuestos diversos debido a sus complicados procesos metabólicos. Tiene diversos grados de contenido de azúcares que pueden usarse para formar ácidos, éstos cuando están en solución, pueden formar ésteres internos denominados lactonas. Las saponinas triterpénicas o esteroideas son glucósidos que con el agua producen una sustancia jabonosa. Se han encontrado 18 triterpenos en las cactáceas. Los principales pigmentos de las cactáceas están dentro de los grupos de clorofílicos, carotenoides y fenólicos. Los principales compuestos nitrogenados en esta familia son aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos y alcaloides, siendo estos los más estudiados. Los alcaloides son importantes por sus efectos fisiológicos y sus usos farmacológicos. Además, se han aislado tres alcaloides de *S. marginatus*, denominados cereína, pachicereína y ochoterenina (Ver Tabla 7).

En el perfil fitoquímico de *J. dioica*, se detectó de manera general, es decir, en las tres fracciones evaluadas, raíz, tallo y hojas, la presencia de oxhidrilos fenólicos, flavonoides, esteroides, triterpenos, sesquiterpenlactonas, saponinas y alcaloides. Las fracciones que poseen más metabolitos resultaron ser la de raíz y la de tallo. Martínez et al. 2014, realizaron un tamizaje fitoquímico de los extractos hexánico, acuoso y metanólico de la raíz de *J. dioica*, determinando una mayor presencia de alcaloides en el extracto metanólico. Estos son compuestos que resultaron presentes en las tres fracciones. Sabandar et al. 2013, mencionan que los alcaloides han sido aislados de varias especies del género *Jatropha* específicamente del látex, la cual es una sustancia que se encuentra tanto en el tallo como en la raíz de *J. dioica*. Nuestros resultados concuerdan con los encontrados por Martínez et al. 2014, en cuanto a la presencia de triterpenos, fenoles y flavonoides. Asimismo, coinciden con los estudios previos de Cortez 2005, quien menciona la presencia de alcaloides, triterpenos y saponinas; y con los de Barrón et al. 2011, quienes demostraron la presencia de alcaloides, cumarinas, carbohidratos, lactonas, saponinas, flavonoides, fenoles y triterpenos (Ver Tabla 7).

En otras especies del género *Jatropha*, también se han realizado investigaciones fitoquímicas, y se ha determinado la presencia de cumarinas, flavonoides y terpenos, resultando metabolitos comunes en especies como *Jatropha curcas* (Pabón y Hernández 2012; Ebuehi y Okorie 2009) y *Jatropha gossypifolia* (Narwade et al. 2010).

Sánchez et al. 1996, analizaron partes aéreas de la especie *M. piperita* proveniente de algunas localidades de Cuba, encontrando taninos, fenoles, esteroides, triterpenoides, aminos, flavonoides, aceites esenciales, quinonas, lactonas, azúcares reductores, saponinas, y principios amargos. Los resultados de nuestro trabajo (Ver Tabla 7), sólo coinciden con lo reportado por Sánchez, en la presencia de triterpenoides, pudiendo ser la causa de esta notable variación la distinta procedencia de las plantas estudiadas. Sabemos que la menta que vemos hoy en día en muchos lugares, se trata de un híbrido, es decir, de la cruce de algunas especies, y que además por el tipo de planta, es muy dada a ser domesticada. La domesticación vegetal es un proceso evolutivo que resulta

de manipular los genotipos de las plantas, o selección genética continua ejercida por los humanos o el ambiente que ellos generan, durante la adaptación de dichas plantas a condiciones de cultivo o manejo. Este proceso genera cambios morfológicos, fisiológicos y genéticos. Una de las afectaciones en este proceso es el contenido y composición de metabolitos secundarios (Bautista et al. 2012; Casas, et al. 1997; Gepts y Papa 2002; Gepts 2004).

En el perfil fitoquímico realizado a la semilla de *P. americana* var. criollo se encontraron como principales compuestos a los esteroides, triterpenos, cumarinas, lactonas y alcaloides (Ver Tabla 7). No así, en la investigación realizada por Teran et al. 2000 quienes demostraron por este mismo análisis, la presencia de taninos y flavonoides y que en este caso fueron ausentes en ambas fracciones (oleica y no oleica). Por otra parte, el estudio fitoquímico llevado a cabo por Quispe y Suazo 2014 indica una mayor presencia de saponinas y alcaloides, coincidiendo en este último grupo de compuestos con nuestros resultados. Algunos autores han mencionado a lo largo de diversas investigaciones, que la semilla de *P. americana* presenta una alta concentración de metabolitos secundarios como saponinas, taninos, alcaloides, flavonoides y fenoles (Arukwe et al. 2012; Carita 2005; Hunter y Becerra 1974). En otra investigación (Borella et al. 2009) realizada únicamente a las hojas de esta misma especie, pero otra variedad, se encontró de igual manera la presencia de taninos y flavonoides, difiriendo nuevamente con nuestra investigación.

En general, los resultados de este bioensayo se muestran favorables para los extractos de *T. foenum-graecum*, *M. piperita*, *A. ludoviciana*, *J. dioica*, *S. marginatus* y *G. glabra*, los cuales se consideran de moderada y baja toxicidad en este modelo, de acuerdo a la categoría de toxicidad indicada por Valdez et al. 2003. Por otro lado, la elevada acción tóxica exhibida por el extracto metanólico de la semilla de *P. americana* var. criollo (en ambas fracciones) obligó a descartar la posibilidad de continuar estudios de inhibición contra *H. pylori*. En el caso de *M. piperita*, a pesar de su inocuidad en este modelo, se descartó de igual manera para estudios de inhibición contra *H. pylori*, ya que la planta utilizada no pudo ser identificada como tal.

Krishnaraju, *et al.* (2005) determinaron, en una investigación realizada con plantas medicinales de la India, la DL₅₀ de extractos acuosos, hidroalcohólicos y alcohólicos provenientes de las especies *T. foenum-graecum* y *G. glabra*, encontrando para la primera un valor de 60 µg/mL, y para la segunda, un valor de 350 µg/mL. Vega, *et al.* 2013, han realizado estudios en *A. salina* para evaluar la toxicidad de diversas plantas, incluyendo *J. dioica*, encontrando que dicha especie no resulta tóxica. Moreno, *et al.* (2015) evaluaron de igual manera un extracto metanólico de *S. marginatus*, encontrando una DL₅₀ de 164.118 µg/mL. Para *M. piperita*, Mirzaei y Mirzaei (2013) determinaron una DL₅₀ de 388 µg/mL en un extracto metanólico. Giffoni *et al.*, 2009; comprobaron una DL₅₀ de 24.13 µg/mL en un extracto metanólico de la semilla de *P. americana* (var. mill), y siendo este valor aún menor, en un extracto hexánico de la misma parte de la planta.

Respecto a la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos, Castillo *et al.*, 2009; determinaron una CMI de 250 µg/mL correspondiente a un extracto metanólico de *A. ludoviciana* subs. mexicana evaluada contra *H. pylori*. Así mismo se evaluó el extracto metanólico de *A. absinthium* obteniendo el mismo comportamiento inhibitorio contra *H. pylori*. Por otra parte también evaluaron los extractos etanólicos de *G. glabra* y de la semilla de *T. foenum-graecum* encontrando valores de CMI de 250 y 500 µg/mL respectivamente.

Sánchez 2012, realizó una investigación con extractos metanólicos de *J. dioica*, tanto de tallo como de rizoma, provenientes de Cadereyta Jiménez, Nuevo León y de Querétaro, para determinar su actividad antimicrobiana sobre microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus typhi*, *Streptococcus faecalis*, encontrando buena actividad en el caso de *S. aureus* (CMI de 3 g/mL).

Moreno *et al.* 2015, reportan que el extracto metanólico de *S. marginatus* muestra una inhibición significativa con respecto a la ceftriaxona, encontrando una CMI de 7 mg/mL.

Por otra parte se evaluó la actividad citotóxica de los extractos metanólicos con actividad anti-*H. pylori* sobre linfocitos humanos, siendo *A. ludoviciana* y *S. marginatus* los evaluados, encontrando que ninguna de las especies exhibieron actividad citotóxica, proporcionando evidencia de que ambas plantas pueden ser utilizadas para consumo humano de manera inocua, como alternativa contra diversas afecciones. De esta manera, podemos defender lo encontrado en el bioensayo de toxicidad con *A. salina*, en donde ambas especies resultaron ser ligeramente y moderadamente tóxicas, respectivamente, pudiendo existir esta diferencia por las concentraciones evaluadas de los extractos o por el tipo de modelo utilizado, en este caso, células altamente específicas y con una función definida.

Quizá el factor más importante es la permeación a la membrana; los compuestos lipofílicos son permeables a la membrana en tanto que los hidrofílicos no. Esto puede explicar al menos en parte el poco efecto de los extractos hidrofílicos sobre las líneas celulares.

En cuanto al estudio para determinar la actividad antioxidante de los extractos metanólicos con mayor actividad anti-*H. pylori*, se puede mencionar que la capacidad antioxidante de los extractos de *A. ludoviciana* y *S. marginatus* fue determinada en base a la actividad del radical libre DPPH. El poder antioxidante de un extracto se puede expresar en función del porcentaje de DPPH que se reduce durante la reacción (Villanueva et al. 2010).

Estudios realizados por López en 2008, demuestran una débil actividad para reducir el radical DPPH por parte de un aceite esencial extraído de diversas especies del género *Artemisia*. Específicamente hablando de *A. ludoviciana*, se encontró un porcentaje de captación del radical de aproximadamente 10% y una actividad antioxidante de alrededor del 20%.

Por su parte, Kordali et al. 2005, evaluaron el aceite esencial de *Artemisia dracuncululus* y determinaron de igual manera, porcentajes bajos de captación del radical DPPH, no mayores a 20%, en concentraciones que iban desde 100, 200, 400 y 1000 µg/mL.

Otra investigación (García et al. 2012) encontró porcentajes altos de reducción del DPPH, para dos tipos de fruto en la especie *Stenocereus griseus*, la pitaya roja, dando un valor de 76% y la pitaya naranja con un valor de 67%.

Otras variedades de pitaya (roja, cereza, amarilla y blanca) fueron evaluadas en cuanto a poder antioxidante utilizando una técnica con DMPD (Dimethyl-4-phenylenediamine) como radical, encontrando valores de 2763.2, 3047.1, 4202.1 y 4336.8 mg/g, respectivamente, expresados como equivalentes de Trolox (Beltrán et al. 2009).

Respecto a la caracterización del daño celular de los extractos con mayor actividad anti-*H. pylori* mediante microscopía de fuerza atómica (MFA), el análisis morfométrico indica que el extracto metanólico de *A. ludoviciana* altera significativamente la morfología de *H. pylori*, los parámetros analizados fueron: altura, largo y ancho. Se observa que al analizar el largo de *H. pylori* cultivada en presencia del extracto metanólico de *S. marginatus* se modifica, obteniendo un valor de 3.75 µm, en cambio el control presentó un valor de 4.06 µm, aunque entre estos valores no existe diferencia significativa; sin embargo al cultivar *H. pylori* en presencia del extracto metanólico de *A. ludoviciana* se muestra un valor de 9.775 µm presentando alta diferencia significativa con respecto al control y al tratamiento con *S. marginatus* (Figura 37).

Con respecto al parámetro del ancho, se observa el mismo comportamiento de la descripción correspondiente a la longitud, es decir, el tratamiento con el extracto metanólico de *S. marginatus* no presenta diferencia significativa con respecto al control, observándose valores de 1.12 µm y 0.92 µm respectivamente (ver Figura 35).

En cuanto a la evaluación del parámetro de altura, *H. pylori* (control) presentó un valor de 0.383 μm ; el microorganismo en presencia del extracto metanólico de *S. marginatus* presentó un valor de 0.667 μm , y en presencia del extracto metanólico de *A. ludoviciana* presentó un valor de 1.96 μm . Estos valores presentan diferencia significativa entre ellos (Figura 37).

Se sabe que el compuesto activo de *A. ludoviciana* es la santonina, descrita como una sustancia neutra, cristalizable, incolora, amarga y acre que produce el ácido santónico como vermífugo. Por otra parte, se han reportado diversos trabajos en donde se muestra la actividad antihelmíntica de extractos alcohólicos de *A. ludoviciana*, así como actividad hipoglucémica (Anaya et al, 2014) y antimalárica atribuyendo dicha actividad a la fracción correspondiente a triterpenos y alcaloides. Así mismo, se reporta su actividad antiinflamatoria, la cual se adjudica a las sesquiterpenlactonas (Bora y Sharma 2011).

La alteración morfológica de *H. pylori* en presencia de los extractos metanólicos de *S. marginatus* y de *A. ludoviciana* se muestran en la Tabla 15. El análisis de la magnitud mediante MFA nos indica la composición de la superficie celular, siendo que las imágenes correspondientes al control y a los dos tratamientos nos muestran una composición semejante en todo el plano. En cuanto a la imagen en 3D se puede observar que *H. pylori* cultivada en presencia del extracto metanólico de *A. ludoviciana* sufre alteraciones de superficie o topográficas, sin embargo no se llega a apreciar dicha alteración por la altura a la cual se realizó el escaneo microscópico.

Una de las ventajas de trabajar y analizar con el equipo de microscopía de fuerza atómica, es que las muestras no reciben ningún tratamiento de fijación, tinción deshidratación, ni son sometidos a recubrimiento con algún compuesto químico. La preparación de las muestras para análisis al MFA es un proceso muy fácil, ya que sólo se debe colocar el material para analizar en un portaobjetos y enseguida se alinea la punta del cantiléver del equipo; esta punta hará contacto con los átomos de la muestra y producirá una imagen de la superficie de la célula, es decir se realizará un análisis

topográfico, de altura, largo y ancho. Este análisis se realizó empleando el programa NOVA Tech-1.1.0.1921, permitiendo obtener cada una de las imágenes tal como se observa en las figuras 34, 35, 36 y 37.

Otra de las ventajas de emplear este tipo de microscopios, es que se pueden obtener imágenes de buena calidad y realizar el análisis de las mismas en corto tiempo, con relación a otras técnicas para análisis de células como lo puede ser el procedimiento de preparación, en el caso del microscopio de barrido (MEB) o microscopio electrónico de transmisión (MET). Además se pueden realizar análisis en células vivas y estructurar una comparativa de parámetros morfométricos entre tratamientos aplicados a las células, obteniendo mayor certeza en los datos morfométricos obtenidos.

9. CONCLUSIONES

La especie *A. ludoviciana* posee los siguientes metabolitos secundarios: sesquiterpenlactonas, alcaloides, esteroides, triterpenos, flavonoides, azúcares y saponinas.

Los extractos de *A. ludoviciana* y *S. marginatus* inhiben el cultivo *in vitro* de *H. pylori*.

Los extractos metanólicos de *A. ludoviciana* y *S. marginatus* no presentan citotoxicidad sobre linfocitos humanos.

Los extractos menos tóxicos para *A. salina* fueron *T. foenum-graecum*, *M. piperita*, *A. ludoviciana*, la fracción de la hoja de *J. dioica* y *S. marginatus*. Tanto *A. ludoviciana* como *S. marginatus* resultaron moderadamente tóxicos.

El extracto metanólico de *A. ludoviciana* posee alta capacidad antioxidante con respecto a *S. marginatus*.

Al ser cultivada *H. pylori* en presencia de *A. ludoviciana* y *S. marginatus* presenta alteraciones en su morfología bacilar, las cuales se ven reflejadas en su altura, ancho y longitud.

8. PERSPECTIVAS

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se observa que de los extractos evaluados, el extracto metanólico de *A. ludoviciana* presentó mayor actividad inhibitoria sobre el cultivo de *H. pylori*, además presentó mayor capacidad antioxidante, lo cual lo convierte en un extracto de interés comercial farmacéutico. Se visualiza en un futuro realizar trabajos encaminados a la obtención del compuesto activo responsable del potencial antioxidante del extracto de *A. ludoviciana*, y por esto se sugiere llevar a cabo el aislamiento de dicho compuesto a través de cromatografía en capa delgada, seguido del análisis espectroscópico y análisis de Espectrometría de masas (EM). Una vez obtenido el compuesto activo se podría evaluar sobre otros microorganismos de interés en el área de la salud, e incluso sobre células cancerosas o diferentes líneas celulares. El trabajar con dicha planta representa una ventaja desde el punto de vista de la sostenibilidad ecológica, ya que la planta es perenne y posee la capacidad de crecer en un amplio rango de temperaturas y condiciones atmosféricas como las que se encuentran en México. El extracto metanólico de *S. marginatus* también presentó eficiente actividad inhibitoria de *H. pylori*, sin embargo presenta 8 veces menor capacidad antioxidante; en cuanto a la actividad citotóxica presenta un comportamiento muy similar al del extracto metanólico de *A. ludoviciana*, aún así, la desventaja desde el punto de vista económico, de trabajar con esta planta, es su tipo de crecimiento y madurez, el cual es más largo, por lo que la obtención y purificación del principio activo se vería retrasado.

9. BIBLIOGRAFÍA

Artículos en revistas

- Abdulhamid M, Alkout M, Blackwell CC. 2000. Increases inflammatory responses of persons of blood group-O to *Helicobacter pylori*. *Journal Infections Diseases*. 181:1364-1369.
- Abrante L, Reyes N, García M, Suárez P, Romero R, Michelangeli F, Contreras M. 2012. Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* por PCR en jugo gástrico y biopsias gastroesofágicas de pacientes dispépticos. *Investigación Clínica* 53(2): 168-177.
- Alviano DS, Alviano CS. 2009. Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 10 (1):106–121.
- Amieva MR. & El-Omar EM. 2008. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 134: 306-323.
- Anaya Eugenio GD, Rivero-Cruz I, Rivera-Chávez J, Mata R. 2014. Propiedades hipoglucemiantes de algunas preparaciones y compuestos de *Artemisia ludoviciana* Nutt. *Journal of Ethnopharmacology*. 155(1):416-25.
- Antolovich M, Prenzler P, Patsalides E. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *The Royal Society of Chemistry* 127:183-198
- Arukwe U, Amadi BA, Duru MKC, Agomuo EN, Adindu E, Odika PC. 2012. Chemical composition of *Persea americana* leaf, fruit and seed. *International Journal of Recent Research and Applied Studies*. 11(2): 346-349.
- Aspinall GO, Monteiro MA. 1996. Lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori* strains P466 and MO19: structure of the O antigen and core oligosaccharide strains. *Biochemistry*. 35:2498-2504.

- Bayona, M. 2013. Condiciones microbiológicas para el cultivo de *Helicobacter pylori*. Revista Colombiana de Gastroenterología. 28 (2):94-99.
- Bazzoli F. 2001. Key points from the revised Maastrich consensus Report: the impact general practice. European Journal of Gastroenterology and Hepatology. 13: S3-S7.
- Beltran OM, Oliva CC, Tzatzil G, Gallardo VT, Osorio RG. 2009. Ascorbic acid, phenolic content, and antioxidant capacity of red, cherry, yellow and white types of pitaya cactus fruit (*Stenocereus stellatus* Riccobono). Agrociencia 43(2):153-162.
- Bernard A, Papini E, Filoppis V, Gottardi E. 1995. Low pH activates the vacuolating toxin of *Helicobacter pylori*, which becomes acid and pepsin resistant. Journal Biology and Chemistry. 270:23937-23940.
- Binning G, Quate CF y Gerber Ch. 1986. Atomic Force Microscope. Physical Review Letters. 56(9): 930-933.
- Bliss CM, Golenblock DT, Kates S, Linevsky JK. 1998. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide binds to CD14 and stimulates release of interleukin-8, epithelial neutrophil-activating peptide 78, and monocyte chemoattractant protein 1 by human monocytes. Infection Immunology. 66:5357-5363.
- Bondesson I, Ekwall B, Hellberg S, Romert L, Stenberg K. y Walum E. 1989. MEIC A new international multicenter project to evaluate the relevance to human toxicity of *in vitro* cytotoxicity tests. Cell Biology and Toxicology 5:331-348.
- Bora KS, Sharma A. 2011. The genus *Artemisia*: A comprehensive review. Pharmacology and Biology. 49:101-109.
- Borella J, Alana Cristina Dorneles Wandscheer¹, Luziana Cassol Bonatti¹ e Lindamir Hernandez Pastorini. 2009. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Persea americana* Mill. sobre *Lactuca sativa* L. Revista Brasileira de Biociências Brazilian Journal of Biosciences. R. Bras. Bioci., Porto Alegre, 7(3): 260-265.

- Borenfreund E. and Borrero O. 1984: *In vitro* cytotoxicity assays potential alternatives to the Draize ocular irritancy test. *Cell Biology and Toxicology*. 1:33–39.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technology*. 22:25-30.
- Casas, A., Caballero, J., Mapes, C. y Zárata, S. 1997. Manejo de la vegetación, domesticación de plantas y origen de la agricultura en Mesoamérica. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 61:31-47.
- Cammarota G, Sanguinetti M, Gallo A, Posteraro B. 2012. Biofilm formation by *Helicobacter pylori* as a target for eradication of resistant infection. *Aliment. Pharmacology Therapy*. 36(3):222-230.
- Cannell, Richard J. P., 1998. *Methods in biotechnology. Natural products isolation*. Glaxo Wellcome & Development, Stevenage, UK. Humana Press Inc. Totowa, N.J. Vol. 4. 1-285.
- Carron MA, Tran VR, Sugawa C, Coticchia JM. 2006. Identification of *Helicobacter pylori* biofilms in human gastric mucosa. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 10(5):712-717.
- Castillo-Juárez I, González V, Jaime-Aguilar H, Martínez G, Linares G, Bye R, Romero I. 2009. Anti *Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*. 122:402-405.
- Cellini L, Grande R, Artese L, Marzio L. 2010. Detection of *Helicobacter pylori* in saliva and esophagus. *New Microbiology*. 33(4):351-357.
- Charras GT, Horton MA. 2002. Single cell mechanotransduction and its modulation analyzed by atomic force microscope indentation. *Biophysics Journal*. 82:2970-81.

- Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*. 284:1328-1333.
- Cover TL, Puryear W, Perez-Peres GI, Blaser MJ. 1991. Effect of urease on HeLa cell vacuolating induced by *Helicobacter pylori*. *Journal Medicine Microbiology*. 37:123-127.
- Cruz MC, Santos PO, Barbosa Jr AM, de Mélo DL, Alviano CS, Antonioli AR, Alviano DS, Trindade RC. 2007. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. *Journal of Ethnopharmacology*. 111 (2):409–412.
- Czajkowsky DM, and Shao Z. 1998. Submolecular resolution of single macromolecules with atomic force microscopy. *Federation of European Biochemical Society. Letters*. 430(1-2):51-4.
- Dahanukar SA, Kulkarni RA and Rege NN. 2000. Pharmacology of medicinal plants and natural products. *Indian Journal of Pharmacology*. 32: 81-118.
- Domingo D, y López M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*. 16(4):385-393.
- Dorman HJ, Deans SG. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88(2):308–316.
- Dunn B, Campbell G, Pérez Perez G. 1990. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *Journal of Biological Chemistry*. 265:9464-9468.
- Eaton KA, Morgan DR, Krakowka S. 1992. Motility as a factor in the colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology*. 37:123-127.
- Ebuehi OA, Okorie NA. 2009. Phytochemical screening and quantification of flavonoids from leaf extract of *Jatropha curcas* Linn. *Nigerian Quarterly Journal of Hospital Medicine*. 19:200–205

- Ekwall B. 1980. Preliminary studies on the validity of *in vitro* measurement of drug toxicity using HeLa cells III. Lethal action to man of 43 drugs related to the HeLa cell toxicity of the lethal drug concentrations. *Toxicological Letters*. 5: 319-331.
- Evans D, Quiroz D, Mendes E. 1998. *Helicobacter pylori* CagA status and s and m alleles of VacA in isolates from individuals with a variety of *H. pylori*: Associated Gastric Disease. *Journal Clinical Microbiology*. 36:3435-3437.
- Fauci A. 1998. New and reemerging diseases: The importance of biomedical Research. *Emerging Infectious Diseases*. 4(3):374-378.
- Fotiadis D, Scheuring S, Müller SA, Engel A, Müller DJ. 2002. Imaging and manipulation of biological structures with the AFM. *Micron*. 33:385-97.
- Fox JG, Correa P, Taylor NS, Thompson N, Fontham E. 1992. High prevalence and persistence of cytotoxin-positive *Helicobacter pylori* strains in a population with high prevalence of atrophic gastritis. *American Journal of Gastroenterology*. 87:1554-1560.
- Fukui K, Onishi H. and Iwasawa Y. (1997). *Physical Review Letters*. 79(21):4202-4205.
- Ganem Báez, Félix Antonio y Odalys Martín González. 2000. Lectina concanavalina A: obtención y purificación. *Universo Diagnóstico* 2000; 1(1):1-41.
- Garza González Elvira, Perez-Perez GI, Maldonado-Garza HJ, Bosques-Padilla FJ. 2014. A review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment and methods to detect eradication. *World Journal of Gastroenterology*. 20(6):1438-1449.
- Geis G, Surebaum S, Forsthoff B, Leying H. 1993. Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology*. 38:371–377.

- Germano F, Bramanti E, Arcuri C, Cecchetti F, Ciccì M. 2013. Atomic force microscopy of bacteria from periodontal subgingival biofilm: Preliminary study results. *European Journal of Dentistry*. 7:152-158.
- Giffoni Leite JJ; Érika Helena Salles Brito; Rossana Aguiar Cordeiro; Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante; José Júlio Costa Sidrim; Luciana Medeiros Bertini; Selene Maia de Moraes; Marcos Fábio Gadelha Rocha. 2009. Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana*(avocado) seed extracts. *Revista de la Sociedad Brasileira de Medicina Tropical*. 42(2) Uberaba Mar./Apr. 2009 <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822009000200003>
- Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T. 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen.nov.as *Helicobacter pylori* comb.nov. and *Helicobacter mustelae* comb.nov., respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 39:397-405.
- Graham DY, Adam E, Reddy GT, Agarwal JP, Evans DJ, Malaty HM. 1991. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in India Comparison of developing and developed countries. *Digestive Diseases and Sciences*. 36:1084-1088.
- Graham DY, Malaty HM, Evans DG, Evans DJ Jr, Klein PD, Adam E. 1991. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. Effect of age, race, and socioeconomic status. *Gastroenterology*. 100(6):1495-1501.
- Hansma HG, Kim KJ and Laney DE. 1997. Properties of biomolecules measured from Atomic Force Microscope images: A review. *Journal of Structural Biology*. 119:99-108.
- Háud M. Leticia A. 2010. Utilización del nopal y otras cactáceas en la elaboración de fitofármacos y su importancia en salud. *RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición* 5: 182-190.

- Hernández Triana M. 2001. *Helicobacter pylori*. La bacteria que más infecta al ser humano. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*. 15(1):42-54
- Holcombe C, Omotara BA, Eldridge J, Jones DM. 1992. *Helicobacter pylori*, the most common bacteria infection in Africa: a random serological study. *American Journal of Gastroenterology*. 87:28-30.
- Hulten K, Han SW, Enroth H, Klein PD. 1996. *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterology*. 110:1031-5.
- Hunter M. y Becerra A. 1974. Estudio químico y aspectos farmacológicos de un anticonceptivo vegetal. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 2(4): 5-35.
- Jones DM, Curry A, Fox AJ. 1985. An ultrastructural study of the gastric Campylobacter-like organism "*Campylobacter pyloridis*". *Journal of General Microbiology*. 131: 2335-41.
- Joo J, Park K, Song J, Kim Dk, Lee K, Kwon Y, Kim J, Kim K, Youn H, Kang H, Baik S, Lee W, Cho M, Rhee K. 2010. Thin-layer liquid culture technique for the growth of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 15(4):295-302.
- Josenhans C, Labigne A, Suyrebaum S. 1995. Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: Both flagellin subunits, FlaA and FlaB are necessary for full motility in *Helicobacter* species. *Journal of Bacteriology*. 177:3010-3020.
- Koleva I, Van Beek T, Linssen J, Groot A, y Evstatieva L. 2002. Screening of plants extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemistry Analysis* 13:8-17.
- Kordali S, Recep Kotan, Ahmet Mavi, Ahmet Cakir, Arzu Ala, and Ali Yildirim. 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia*

santonicum, and *Artemisia spicigera* Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(24):9452–9458.

Krishnarajua AV , Tayi V. N. Raoa , Dodda Sundararajua , Mulabagal Vanisreeb , Hsin-Sheng Tsayb , and Gottumukkala V. Subbarajua. 2005. Assessment of Bioactivity of Indian Medicinal Plants Using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay. *International Journal of Applied Science and Engineering* 2: 125-134

Lara LF, Cisneros G, Gurney M. 2003. One-day quadruple therapy compared with 7-day triple therapy for *Helicobacter pylori* infection. *Archives of Journal of Medicine*; 163:2079-2084.

Lind T, Megraud F, Unge P, Bayerdorffer E, O'morain C, Spiller R. 1999. The MACH2 study: role of omeprazol in eradication of *H. pylori* with one week triple therapies. *Gastroenterology*. 116:248-253.

Mahdavi J, Sondén B, Hurtig M, Olfat FO. 2002. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*: 297:573-578.

Majalca C, Rivera J, Ochoa S, Giono S. 2001. Transporte, aislamiento, identificación y conservación de cepas de *Helicobacter pylori*. *Bioquímica*. 26(4):105-110.

Mapstone NP, Lynch DA, Lewis FA, Axon AT, 1993. Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR. *Journal of Clinical Pathology*. 46:540–3.

Martínez N, Georgina Almaguer, Patricia Vázquez-Alvarado, Ana Figueroa, Clara Zúñiga & Alejandra Hernández-Ceruelos. 2014. Análisis fitoquímico de *Jatropha dioica* y determinación de su efecto antioxidante y quimioprotector sobre el potencial genotóxico de ciclofosfamida, daunorrubicina y metilmetanosulfonato evaluado mediante el ensayo cometa. © 2014 Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 13 (5): 437-457.

- Mazari-Hiriart M, López Vidal Y, Calva JJ. 2001. *Helicobacter pylori* water systems for human use in Mexico city. *Water Science Technology*. 43:93-98.
- McGee DJ, Mobley, HL. 1999. Mechanisms of *Helicobacter pylori* infection: Bacterial factors. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 241:155-180.
- McKay, D. L., & Blumberg, J. B. 2006. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research*. 20(8):619-633.
- Meincken M., Holroyd D. and M. Rautenbach. 2005. Antimicrobial agents and chemotherapy, American Society for Microbiology; p. 4085–4092.
- Mirzaei M. and Ali Mirzaei. 2013. Comparison of the *Artemia salina* and *Artemia uramiana* bioassays for toxicity of 4 Iranian medicinal plants. *International Research Journal of Biological Sciences*. 2(3): 49-54
- Mitscher, L.A. 1975. Antimicrobial agents from higher plants. *Recent Advances in Phytochemistry*. 9:243-282.
- Moran AP. 1999. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-mediated gastric and extragastric pathology. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 50:787-805.
- Mowla A, M. Alauddin, Md. Atiar Rahman and Kabir Ahmed. Antihyperglycemic Effect of *Trigonella Foenum-Graecum* (Fenugreek) Seed Extract in Alloxan-Induced Diabetic Rats and Its Use in Diabetes Mellitus: A Brief Qualitative Phytochemical and Acute Toxicity Test on the Extract. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2009; 6(3): 255–261.
- Narwade VT, Waghmare AA, Ladda RG, Rathod GM. 2010. Detection of flavonoids from *Jatropha gossypifolia* L. var. *elegans* Muell. *Argentina Journal of Ecobiotechnology*. 2:14-16.
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002, *Journal of Natural Products*. 66 (7):1022-1037.

- Nomura A, Stemmarman G, Chyan P, Perez-Perez GI. 1994. *Helicobacter pylori* infection and risk for duodenal and gastric ulceration. *Annals of Internal Medicine*. 120: 977-981.
- Pabón LC y Hernández-Rodríguez P. 2012. Importancia química de *Jatropha curcas* y sus aplicaciones biológicas, farmacológicas e industriales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 17: 194-209.
- Pajares J. M. y J. P. Gisbert. 2006. *Helicobacter pylori*: its discovery and relevance for medicine. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* Vol. 98 (no. 10). Madrid.
- Palacios, Espinosa, Francisco, Wendy Escobedo Hinojosa e Irma Romero. 2011. Panorama actual del estudio de las plantas con actividad anti-*Helicobacter pylori*. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 14(1):51-61.
- Parsonnet J, Shmueli H, Haggerty T. 1999. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *Journal of the American Medical Association*. 282: 2240-5.
- Paterson DL. 2008. Impact of antibiotic resistance in gram-negative bacilli on empirical and definitive antibiotic therapy. *Clinical Infectious Diseases*. 47(1):S14-S20.
- Pelling AE, Sehati S, Gralla EB, Valentine JS, Gimzewski JK. 2004. Local nanomechanical motion of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. 305:1147-50.
- Pérez-Pérez GI, Rothenbacher D, & Brenner H. 2004. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 9:1-6.
- Pimienta-Barrios E, Nobel PS. 1994. Pitaya (*Stenocereus* spp., Cactaceae): An ancient and modern fruit crop of Mexico. *Economic Botany*. 48(1):76-83.
- Pueyo A. M., M. P. Huarte, C. Jiménez. 1998. Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*. *ANALES Sis San Navarra* 21(2):9-17.

- Quispe Yucra, J. A., & Suazo Pinedo, F. 2014. Efecto anticonceptivo del extracto etanólico de la semilla de *Persea americana* (palta) en ratones hembras durante el periodo enero-marzo 2014.
- Rabinovich Y, Esayanur M, Daosukho S, Byer K, El-Shall H, Khan S. 2005. Atomic force microscopy measurement of the elastic properties of the kidney epithelial cells. *Journal of Colloid and Interface Science*. 285(1):125-35
- Raskin I. 2003. Elicitation, a new window into plant chemo diversity and phytochemical drug discovery. *Journal of Medicine Chemistry*. 46:2542-2547.
- Rivas TF, Hernández F. 2000. *Helicobacter pylori*: factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Revista Biomedica*. 11:187-205.
- Ruberto G, Baratta MT, Deans SG, Dorman HJ. 2000. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. *Planta Medica*. 66 (8):687–693.
- Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Kick D. 1998. Diversity of *Helicobacter pylori* vacA and cagA genes and relationship to vacA and protein expression cytotoxin production and associated diseases. *Journal of Clinical Microbiology*. 36:944-948.
- Sabandar CW, Ahmat N, Jaafar FM, Sahidin I. 2013. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): A review. *Phytochemistry*. 85:7-29.
- Sánchez E., García D, Caridad Carballo y Maritza Crespo. 1996. *Mentha piperita*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 1(3):40-45.
- Sanjuero JL, Pérez J, Hidalgo H, Geyne A. 1999. Eficacia y seguridad entre diferentes dosis de nitazoxanida + subcitrate de bismuto + lanzoprazol para la erradicación de *Helicobacter pylori*. *Revista Médica del Hospital General de México*. 14: 172-175.

- Scheuring S, Fotiadis D, Moller C, Muller SA, Engel A, Muller DJ. 2001. Single proteins observed by atomic force microscopy. *Single Molecules*. 2:59-67.
- Schwartzmann G, Mans DRA, Rocha AB. 2002. Anticancer drug discovery and development throughout the world”, *Journal of Clinical Oncology*. 20:475-595.
- Segal ED, Falkow S, Tompkins LS. 1996. *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangement and tyrosine phosphorylation of host cells protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93:1259-1264.
- Segal I, Ally R, Mitchell H. 2001. *Helicobacter pylori*: an african perspective. *Quarterly Journal of Medicine*. 94:561-565.
- Sherif M, Mohran Z, Fathy H, Rockabrand DM, Rozmajzl PJ, Frenck RW. 2004. Universal high-level primary metronizadole resistance in *Helicobacter pylori* isolated from children in Egypt. *Journal of Clinical Microbiology*. 42:4832-4834.
- Siavoshi F, Saniee P, Atabakhsh M, Pedramnia S, Tavakolian A, Mirzaei M. 2012. Mucoid *Helicobacter pylori* isolates with fast growth under microaerobic and aerobic conditions. *Helicobacter*. 17:62-67.
- Sierra F, Forero FJ, Rey M. 2014. Extract in alloxan-induced diabetic rats and its use in diabetes mellitus: a brief qualitative phytochemical and acute toxicity test on the extract. *African Journal of Traditional, complimentary and Applied Microbiology*. 6 (3): 255 –261
- Sokolov I. Atomic Force Microscopy in Cancer Cell Research [Internet]. *Cancer Nanotechnology*; 2007. [cited 2011 Aug 22]. Available from: people.clarkson.edu/~isokolov/Cncr-01.pdf
- Souto R, Vieira AP. 2008. Detection of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction in the subgingival biofilm and saliva of non-dyspeptic periodontal patients. *Journal of Periodontology*. 79(1):97-103.

- Stevenson T, Lucia L, Acuff G. 2003. Development of a selective medium for isolation of *Helicobacter pylori* from cattle and beef samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:723-727.
- Talib WH, Mahasneh AM. 2010. Antimicrobial, cytotoxicity and phytochemical screening of Jordanian plants used in traditional medicine. *Molecules*. 15(3):1811-1824.
- Tang H., Joachim C. and Devillers J., *J.Vac.Sci.Technol. B* 12(3), May Jun 1994.
- Taylor, D. & Parsonnet, J. 1995. Epidemiology and natural history of *H. pylori* infections of the gastrointestinal tract. En: Blaser, M.J., Smith, P.F., Ravdin, J., Greenberg, H. & Guerrant, R.L. 551- 564 (Raven Press, New York, 1995).
- Teran E, Cortez J, Angelo A, Cubillos P, Carvajal R. 2000. Evaluación de un efecto anticonceptivo de la *Persea americana* en un modelo experimental en ratas. *Biofarbo*. 8(8): 57-62.
- Torres, J. 1998. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in México. *The Journal of Infectious Diseases*. 178:1089-1094.
- Varsha S., Agrawal R.C. and Pandey Sonam. 2013. Phytochemical screening and determination of anti-bacterial and anti-oxidant potential of *Glycyrrhiza glabra* root extracts. *Journal Environmental Research Development*. Vol. 7 (No. 4A); . Pp. 1552 – 1558.
- Villanueva-Tiburcio J E, Condenzo-Hoyos LA, Asquieri ER. 2010. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante en la cáscara de camucamu (*Myrciaria dubi* (H. B. K.) McVaugh). *Ciência e Tecnologie Alimentos*. 30:151-160.
- Wadstrom T, Hirno S, Boren T. 1996. Biochemical aspects of *Helicobacter pylori* colonization of human gastric mucosa. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 10:17-27.

- Webb PM, Knight T, Greaves S, Wilson A. 1994. Relation between infection with *Helicobacter pylori* and living conditions in childhood: evidence for person to person transmission in early life. *British Medical Journal*. 308:750–753.
- Williams E, Okoye R, Ollier B, Festenstein H. 1983. A simple box method for freezing lymphocytes. *Journal of Immunology Methods*. 65(1-2):265-8.
- Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Teleford JL. 1995. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two mayor types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating toxin. *Infection and Immunity*. 63: 94-98.
- Yadegarinia D, Gachkar L, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, & Rasooli I. 2006. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry*. 67(12):1249-1255.
- Yajes R. 1997. Animal ethics committees and the implementation of the Three Rs. Animal alternatives, welfare and ethics. In: Van Zutphen LFM, Balls M, editors. *Developments in Animal and Veterinary Sciences*. Elsevier; 1997. p. 367-71
- Yang SM, Sokolov I, Coombs N, Kresge CT, Ozin GA. 1999. Formation of Hollow Helicoids in Mesoporous Silica: Supramolecular Origami. *Advances Materials*. 38(1-2):56-77.
- Zahra Hosseininejad, Sodaif Darvish Moghadam, Farzaneh Ebrahimi, Mohammad Abdollahi, Mohammad Javad Zahedi, Mahdieh Nazari, Mehdi Hayatbakhsh, Saeed Adeli y Fariba Sharififar. 2011. *In vitro* screening of selected Iranian medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *International Journal of Green Pharmacy*. Vol. 5(4). Pp. 282-285.
- Zhang R, Eggleston K, Rotimi V, Zeckhauser RJ. 2006. Antibiotic resistance as a global threat: evidence from China, Kuwait and the United States. *Global Health*. 2:6.

Zhao L, Schaefer D, Marten MR. Assessment of elasticity and topography of *Aspergillus nidulans* spores via atomic force microscopy. *Applied Environmental Microbiology*. 2005;71:955-60. doi: 10.1128/AEM.71.2.955-960.2005.

Zullo A, Vaira D, Vakil N. 2003. High eradication rates of *Helicobacter pylori* with a new sequential treatment. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 17:719-726.

Libros

Alonso, T. M. G., Ibarra, M. C. M. y Martínez, D. S. M. 2008. Estudio fitoquímico de plantas medicinales propias del estado de Querétaro. *Memorias del verano de la ciencia*. [En línea]. Disponible en: <http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2008/10VeranoRegionCentro/34UAZAlonsoTorresIbarraMartinez.pdf>. Fecha de consulta: 12 de agosto de 2013

Argueta A., Cano, L., Rodarte, M. E. (Coord). 1994. *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional*. Tomo I. Instituto Nacional Indigenista. México.

Argueta, Villamar A., Cano Asseleih L. M., Rodarte M. L. 1994. *Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. México: Instituto Nacional Indigenista.

Bautista Lozada A, Fabiola Parra Rondinel Y Francisco Javier Espinosa-García. 2012. Efectos de la Domesticación de Plantas en la Diversidad Fitoquímica. A. Bautista Lozada, F. Parra Rondinel y F. J. Espinosa-García. 2012. Efectos de la Domesticación de Plantas en la Diversidad Fitoquímica, 253-267. En: J. C. Rojas y E. A. Malo (eds.). *Temas Selectos en Ecología Química de Insectos*. El Colegio de la Frontera Sur. México. 446 p.

- Blanchard, T.; Nedrud, J. 2012. Laboratory maintenance of *Helicobacter* species. *Current Protocols in Microbiology*. Suppl. 24, 23p.
- Bravo - Hollis H. y M.H. Sánchez . 1978 . Las Cactáceas de México. Vol. I Universidad Autónoma de México, México D.F. pp 446-453.
- Chávez J, Chire T, Loaysa L. 2002. Curso Principios bioactivos de plantas andinas y amazónicas del Perú. Capacidad antioxidante de compuestos bioactivos. Facultad de Ciencias, Departamento de Química. UNALM.
- Cervantes García, 2006. Estrella. *Helicobacter pylori* e infecciones asociadas. Monografía. UNAM.
- Domínguez Barradas, Consuelo, Gerardo Eliseo Cruz Morales y Carlos González Gándara. 2015. Plantas de uso medicinal de la Reserva Ecológica “Sierra de Otontepec”, municipio de Chontla, Veracruz, México. Área II. Biología y Química. Pp. 41 – 52.
- Domínguez X. A. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. Ed. Limusa. México.
- Gepts, P. 2004. Plant and animal domestication as human-made evolution. En: J. Cracraft and R. W. Bybee. Eds. *Evolutionary Science and Society: Educating a New Generation*. American Institute of Biological Science. Washington, D.C. 180-186.
- Gepts, P. y Papa, R. 2002. Evolution during domestication. En: *Encyclopedia of Life Sciences*. Macmillan Publishers Ltd. 1-7.
- Gil-Loyzaga, Pablo E. 2011. Cultivo de células animales y humanas. Aplicaciones en medicina regenerativa. Editorial Visión Libros.
- Gonsebatt, M. E., L. A. Herrera y P. Ostrosky–Wegman. 1995. Lymphocyte proliferation as a biomarker in environmental biomonitoring for genotoxic pollutants. En *Biomnitors and Biomarkers as indicators of Environmental*

- Change. Butterworth F. M., L. D. Corkum and J. Guzmán Rincón. Ed. Plenum Press. New York. Pp. 81-94.
- Goodman y Gilman. 2006. Las bases farmacológicas de la Terapéutica. Brunton L., Parker K. ISBN 9701057392.
- Guillot Ortiz, Daniel. 2009. Flora ornamental española: aspectos históricos y principales especies. Monografías de la Revista Bouteloua. No. 8. Pp. 192.
- Iwu, M. M., A. R. Duncan y C. O. Okunji. 1999. New antimicrobial of plant origin. In: Janick, J. (Ed). Perspectives on new crops and uses. ASHS press. Alexandria. P 457-462.
- Jena, B.P., Hörber, J.K.H. 2002. Atomic Force Microscopy in Cell Biology. Academic Press, San Diego.
- Koneman EW, Allen SD, Schreckenberger PC, Winn WC. 1997. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Lippincott William and Wilkins, Fifth edition, 1997:335-339.
- Mann J., R. S. Davidson, J. B. Hobbs, D. V. Banthorpe, J. B. Harborne. 1994. Natural Products: their chemistry and biological significance. Prentice Hall, Harlow, England.
- Marshall BJ. 2002. The discovery that *Helicobacter pylori*, a spiral bacterium, caused peptic ulcer disease. In: Marshall B, editor. Helicobacter Pioneers (Firsthand account from the scientists who discovered helicobacters. 1892-1982). Blackwell Science Asia. p. 165-202.
- Morris, V.J., Kirby, A.R., Gunning, A.P. 2001. Atomic Force Microscopy for Biologists. Imperial College Press, London.
- Muñoz F. 2002. Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado. Ediciones Mundi-Prensa.

- Ostrosky P., Gonsebatt M. 1998. Biomarcadores moleculares en la determinación de efectos xenobióticos. *Gaceta Médica Mexicana*. Volumen 133(1).
- Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. 2ª ed. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 1974.
- Rzedowski, J. y Rzedowski, G. C. 1990. Flora fanerogámica del Valle de México. Vol. III. Instituto de Ecología. Centro Regional del Bajío. Pátzcuaro, Mich.
- Rubio Campal, Faustina, Benjamín García Espinosa y Remedios Romero Burguillos. 2016. Técnicas de inmunodiagnóstico. Ediciones Paraninfo. 1ª. Ed. Madrid, España. Pp. 278.
- Schultes, R.E. The kingdom of plants. 1978. En: Thomson, W. A. E. (Ed). *Medicines from the Earth*. McGraw-Hill Book Co., New York, p. 208.
- Vanaclocha B. y Cañigueral S. 2003. Fitoterapia. *Vademecum de prescripción*. 4ª. Ed.

Tesis

- Carita, M. S. Estudios preliminares hacia la estandarización para la valoración hepatotóxica y nefrotóxica de extractos vegetales (*Persea americana*) en ratones. Tesis para optar al título de licenciatura en bioquímica, Universidad Nacional de San Andrés. La Paz-Bolivia. 2005. Recuperado de <http://bibliotecadigital.umsa.bo:8080/rddu/bitstream/123456789/490/1/TN929.pdf> (Acceso de 28 de noviembre).
- Cortez J. 2005. Actividad biológica de extractos de plantas usadas para el tratamiento de cáncer e infecciones en Tepatepec, Hidalgo. Tesis de Licenciatura del Área académica de Biología, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca, Hidalgo, México.

- Forero, G.A. 2002. Estudio Fitoquímico del extracto etanólico de la madera de "*Virola carinata*" (Myristicaceae). Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia.
- Gualdrón, V. R y López, P. S. 1994. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre larvas de *Artemia Salina* de algunas plantas superiores colombianas. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia.
- López E. 1996. Análisis microestructural de cerámicos utilizando Microscopía de Fuerza Atómica. Universidad Autónoma de Nuevo León, Tesis de maestría, pp. 21-25.
- Martínez, C. y Beltrán, M. 1999. Estudio Fitotoxicológico Preliminar de diez especies vegetales utilizadas en medicina natural. Tesis (Químico Farmacéutico). Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia.
- Olmos, Dania y Javier González Benito. 2009. Microscopía de Fuerza Atómica. Práctica 1. Modos Básicos de Operación. Curso 2008-2009. Máster en Ciencia e Ingeniería de Materiales. Pp. 1-16.
- Rosso G. 2012. Análisis topográfico, mecánico y molecular de fibras nerviosas periféricas de ratones Trembler J (modelo animal de la neuropatía humana CMT1A) por microscopía de fuerza atómica y confocal. Enero 19 de 2012: Tesis de Maestría.
- Treviño-Tamez, R. 2001. Estudio fitoquímico de *Piper amalago*. Tesis (Licenciatura). Universidad Autónoma de Nuevo León. México.

Páginas electrónicas

(<http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM24sanluispotosi/index.html>)

Otros

Barrón-González MP, Corrujedo-Morales N, Garza Padrón R, Morales-Rubio M, Neavéz-Treviño F, Morales-Vallarta M, Rodríguez-Garza R. 2011. Tamizaje fitoquímico y determinar la actividad amebicida, antioxidante y tóxica de los extractos metanólicos de *Jatropha dioica* y *Eucalyptus calmadulensis*. Trabajo científico presentado en el III Congreso Internacional de Cambio Climático y Desarrollo Sustentable: Economía, Producción y Tecnología. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

González M. y Uribe J. 2005. Microscopio de Fuerza Atómica. Encuentro de Investigación en IE, Encuentro de Investigación en Ingeniería Eléctrica Zacatecas, pp. 10-13.

NOM-087-SSA-1997. Norma Oficial Mexicana para disposición de Manejo de RPBI (Residuos Peligrosos Biológicos Infecciosos) SSA-1997.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Karla Ivette Leal López

Candidato para el Grado de

Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: ACTIVIDAD ANTI-*Helicobacter pylori* DE EXTRACTOS VEGETALES Y CARACTERIZACIÓN DEL DAÑO CELULAR AL MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA

Campo de estudio: Ciencias Biológicas / de la Salud

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León, el día 30 de Septiembre de 1989, hija de Humberto Leal Lozano y Juana López Elicero, con tres hermanos, Luis Humberto, Erika Yazmín y Juan José.

Educación: Egresada de la carrera de Licenciado en Ciencias de Alimentos, de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, siendo primer lugar de generación.

Experiencia profesional: He trabajado en 3 empresas en el área de alimentos, específicamente en el Departamento de Calidad, como químico analista, en el área de microbiología y de fisico-química. Actualmente trabajo realizando muestreos de alimentos, aguas, medio ambiente y superficies así también como analista, en un laboratorio de servicios.