

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE
PINPINELLA ANISUM SOBRE *HELICOBACTER PYLORI***

POR

Q.B.P. FRANCISCO JAVIER HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA
DE PRODUCTOS NATURALES**

JUNIO, 2018

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**Actividad biológica de extractos etanólicos de
Pinpinella anisum sobre *Helicobacter pylori***

POR

Q.B.P. FRANCISCO JAVIER HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA
DE PRODUCTOS NATURALES**

JUNIO, 2018

**Actividad biológica de extractos etanólicos de *Pimpinella anisum*
sobre *Helicobacter pylori***

COMITÉ DE TESIS



Dra. Yadira Quiñones Gutiérrez

Director de Tesis



Dra. María Porfiria Barrón González

Secretario



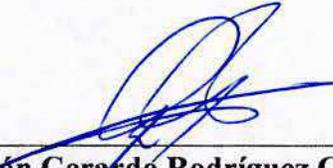
Dra. María Julia Verde Star

Vocal



Dra. Catalina Leos Rivas

Vocal



Dr. Ramón Gerardo Rodríguez Garza

Vocal

DEDICATORIA

Para quienes en todo momento están a mi lado:

A mi Padre Celestial, quien escucha y contesta mis oraciones, por darme la fuerza necesaria para seguir adelante y no desfallecer, enseñándome a enfrentar las adversidades con dignidad.

A mi hermosa y adorable esposa Amada Dávalos Leal, quien ha creído en mí, por su sacrificio y esfuerzo por hacer de nuestra vida el paraíso, por sus palabras de aliento y su incansable apoyo en levantarme cada vez que sentía que no podía, por ese eterno y gran amor que tiene por mí y por sus hijos.

A mis hijos Libertad y Jake Andrés quienes son el porqué de mi vida, mi motivación e inspiración para poder superarme día con día, les amo y agradezco su gran apoyo y su paciencia por los días que no estuve con ustedes.

A mis padres Andrés y Oralia por su siempre preocupación de su hijo más pequeño, por sus consejos y por siempre apoyarme en todos mis proyectos dándome sus palabras de aliento.

A mis hermanas Guadalupe y Alma Rosa quienes son mis segundas madres, por su ayuda y gran cariño, a mi hermano Andrés que aunque lejos sé que estoy siempre en sus oraciones.

AGRADECIMIENTOS

Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Departamento de Biología y Genética: Laboratorio de Biología Celular

A los directivos de esta honorable Institución al Dr. Antonio Guzmán Velasco y el Dr. José Ignacio González Rojas, Director y Subdirector respectivamente, por su gran apoyo a todo el alumnado y que con gran profesionalismo y entusiasmo en alentar al desarrollo estudiantil, han encontrado los recursos e instancias necesarias para lograr nuestras metas.

Para los directivos de la Subdirección de Posgrado la Dra. Diana Reséndez Pérez y el Dr. Pablo Zapata Benavides, por su incansable atención que nos brindan y por su paciencia en apoyarnos y orientarnos en nuestra estancia en ésta Institución.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Yadira Quiñones Gutiérrez por darme la oportunidad de comenzar este proyecto, por guiarme, por siempre estar al pendiente de los requerimientos, por siempre tener esas palabras de aliento de enseñanza y de buena voluntad, por impulsarme cada vez que decaía, por todo esto y más le estaré siempre agradecido.

A la Dra. María Porfiria Barrón González, por todas sus enseñanzas, por su profesionalismo, por mostrarme con el ejemplo que si se puede, por todo el tiempo que dedico a este trabajo, por cambiar mi perspectiva de lo que es ser realmente investigador, por su paciencia, su alegría, su buen humor, su deseo de mostrarle a todos que la ciencia es algo bello, mil gracias.

A la Dra. Ma. Julia Verde Star, por su gran deseo de servir, por ser tan profesional, porque siempre tiene tiempo para quien la necesite, por ser una gran persona, por su buen ánimo y su incomparable sonrisa, muchas gracias Doctora Julia.

A la Dra. Catalina Leos Rivas por su disposición para este trabajo siempre con una actitud de profesionalismo y servicio.

Al Dr. Ramón Gerardo Rodríguez Garza, por su apoyo y por su disposición a este trabajo muchas gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
RESUMEN.....	11
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES.....	15
2.1 Material vegetal.....	15
2.1.1. <i>Pimpinella anisum</i>	15
2.1.2 Efectos de los extractos de plantas sobre bacterias.....	16
2.1.3 Metabolitos secundarios.....	16
2.2.1 <i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>)	16
2.2.2. Patogénesis y virulencia.....	19
2.2.3 Tratamiento.....	20
2.3 Cromatografía de gases-masas.....	21
3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. HIPÓTESIS.....	24
5. OBJETIVO GENERAL.....	24
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
6. MATERIAL Y METODOLOGÍA.....	25
6.1 <i>Helicobacter pylori</i>	25
6.1.1. Cultivo bacteriano.....	25
6.2 Material vegetativo	25
6.2.1 Preparación de solución madre del extracto etanólico de <i>P. anisum</i> (EEPa)	26
6.2.2 Perfil fitoquímico del extracto etanólico de <i>P. anisum</i> (EEPa).....	26
6.2.3 Evaluación de la actividad biológica del extracto etanólico sobre <i>H. pylori</i>	28
6.2.4 Análisis estadístico.....	29
6.2.5 Identificación parcial los compuestos que presentan actividad biológica sobre <i>H. pylori</i> mediante análisis espectroscópicos.....	29
7. RESULTADOS	31
Se realizó la extracción etanólica de las semillas de <i>P. anisum</i> y posteriormente se le realizaron pruebas fitoquímicas para identificar grupos funcionales presentes en la muestra (Tabla 1). Se determinó la presencia de saponinas, alcaloides, flavonas, sesquiterpenlactonas, aromaticidad, insaturaciones, oxhidrilos fenólicos, esteroides, triterpenos así como carbohidratos.	31
7.2.1. Morfología macroscópica	32

7.2.2 Cinética de crecimiento.....	33
7.3. Actividad biológica del extracto etanólicos de <i>P. anisum</i> sobre <i>H. pylori</i>	34
7.4. Actividad biológica de las fracciones del extracto etanólicos de <i>P. anisum</i> .	36
sobre <i>H. pylori</i>.....	36
8. DISCUSIONES	42
9. CONCLUSIONES	45
10. PERSPECTIVAS	45
11. BIBLIOGRAFÍA	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Etapas del procesamiento de <i>P. anisum</i> para la obtención del extracto etanólicos-----	27
2	Descripción de las pruebas para detectar los grupos funcionales presentes en los extractos etanólicos -----	28
3	Condiciones del instrumental para realizar la cromatografía GC-MS-----	30
4	Grupos funcionales presentes en el extracto etanólico de <i>P. anisum</i> -----	31
5	Determinación de la actividad anti- <i>H. pylori</i> del EEPa-----	34
6	Grupos funcionales presentes en el extracto etanólico de <i>P. anisum</i> total y fracción 3-----	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Descripción	Página
1	Aspecto de <i>H. pylori</i> a nivel macroscópico-----	32
2	Cinética de crecimiento de <i>H. pylori</i> -----	33
3	Absorbancia de <i>H. pylori</i> en presencia del EEPa total-----	34
4	Resultados de las UFC/mL de <i>H. pylori</i> con tratamientos-----	35
5	Resultados de la absorbancia de <i>H. pylori</i> en presencia de tres fracciones obtenidas del EEPa-----	36
6	Aspecto del cultivo de <i>H. pylori</i> en presencia de tres fracciones obtenidas del EEPa -----	37
7	Resultados de las UFC/mL de <i>H. pylori</i> cultivado en presencia de la fracción 3 del extracto etanólico de <i>P. anisum</i> -----	37
8	Espectro ampliado del compuesto obtenido de la fracción tres del extracto etanólico de <i>P. anisum</i> -----	39
9	Identificación en la fracción 3 del EEPa de la molécula Benzene, 4- ethenyl-1,2-dimethoxy-----	40
10	Identificación en la fracción 3 del EEPa de la molécula Benzene, 1,4- dimethoxy-2-methyl-----	40
11	Identificación en la fracción 3 del EEPa de la molécula Butanoic acid, 2-methyl-, 4-methoxy-2-methy-2-(3-methyloxiranyl)phenylester-----	41
12	Producción de biofilm de <i>H. pylori</i> -----	44

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
CDC	Centros de Prevención y Control de Enfermedades
EEPa	Extracto Etanólico de <i>Pimpinella anisum</i>
ERMN	Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
KMnO ₄	Permanganato de Potasio
LPS	Lipopolisacárido
nm	Nanometros
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
OMS	Organización Mundial de la Salud
WHO	World Health Organization

RESUMEN

Debido al uso indiscriminado de medicamentos para el control de enfermedades causadas por microorganismos patógenos al hombre, éstos han desarrollado drogo-resistencia, por lo que los productos naturales de plantas representan una alternativa para su control, la Organización Mundial de la Salud registra que un 80% de la población mundial depende de la medicina tradicional para su atención primaria. *Helicobacter pylori* es una bacteria que aqueja al humano ya que ocasiona afecciones gastrointestinales de severa importancia tales como gastritis, cáncer de estómago, cáncer de esófago e incluso puede llegar a ocasionar la muerte. El tratamiento para *H. pylori* consiste en estrecho grupo de drogas, sin embargo y de acuerdo a la OMS es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas antibacterianas debido a la resistencia que desarrollan los microorganismos patógenos a las drogas de elección. Diferentes especies conocidas han sido consideradas plantas de vital importancia desde hace muchos años por sus diversas propiedades. El objetivo de este trabajo es evaluar la actividad biológica del extracto etanólico de *Pimpinella anisum* (EEPa) sobre *Helicobacter pylori*. Para llevar a cabo esta determinación, se obtuvieron los metabolitos secundarios totales presente en la semilla de *P. anisum*, posteriormente se determinó el perfil fitoquímico, y posteriormente se evaluaron cuatro dosis del EEPa sobre el cultivo en fase log de *H. pylori*, posteriormente se obtuvieron tres fracciones del EEPa y se evaluaron sobre el cultivo de *H. pylori*, llegando a determinar en ambos bioensayos las UFC/mL y posteriormente a la fracción del EEPa se analizó por GC-MS para identificar la o las moléculas con actividad *H. pylori*. Los resultados obtenidos muestran que el EEPa inhibe el cultivo de *H. pylori* en un 76.39%, sólo la fracción tres inhibió el cultivo de *H. pylori* en un 41.4; y los metabolitos presentes en el EEPa-total fueron: saponinas, alcaloides, flavonas, sesquiterpenlactonas, aromaticidad, insaturaciones, oxhidfrilos fenólicos, esteroides y triterpenos así como carbohidratos, y el EEPa-Fracción 3 presentó: saponinas, flavonas, aromaticidad, carbohidratos, grupo carbonilo e insaturaciones; el análisis de cromatografía gases-masas de la fracción 3 se determinó la presencia de las siguientes moléculas: Benzene, 4-ethenyl-1,2-dimethoxy, Benzene, 1,4-dimethoxy-2-methyl, Butanoic acid, 2-methyl-, 4-methoxy-2-(3-methyloxiranyl)phenyl ester. En futuros trabajos se podrían purificar las 3 moléculas identificadas y evaluarlas sobre el cultivo de *H. pylori* e incluso sobre otros microorganismos de importancia médica.

ABSTRACT

Microorganisms pathogenic to humans have created a drug-resistance due to the indiscriminate use of medicines for diseases control, natural plant products are an alternative for such control. The World Health Organization (WHO) reports that 80% of the world's population depends on traditional medicine as their primary care. The bacteria *Helicobacter pylori* has a harmful effect on humans, it can cause gastritis, stomach cancer, esophagus cancer and can even cause death. A handful number of drugs are used to treat *H. pylori*, however, because of the resistance that pathogenic microorganisms have develop to the drugs the WHO suggests that new antibacterial alternatives are needed. Because of their properties, the use of plants for treating disease has been used for thousands of years. The objective was to evaluate the biological activity of the ethanolic extract of *Pimpinella anisum* (EEPa) on *Helicobacter pylori*. We obtained the total secondary metabolites present in the *P. anisum* seed; and its phytochemical profile; we evaluated four doses of the EEPa on the log phase *H. pylori* culture; the three fractions of the EEPa were evaluated on the *H. pylori* culture, determining the CFU / mL in both bioassays; finally the fraction of the EEPa was analyzed in the GC-MS to identify the molecule or molecules with *H. pylori* activity. Results showed that 76.39% EEPa inhibits *H. pylori* cultures, only fraction three inhibited the *H. pylori* culture 41.4%; and the metabolites present in the total EEPa were: saponins, alkaloids, flavones, sesquiterpenlactones, aromaticity, unsaturations, phenolic oxhydrils, sterols and triterpenes as well as carbohydrates, and Fraction 3 EEPa-presented: saponins, flavones, aromaticity, carbohydrates, carbonyl group and unsaturations; The gas-mass chromatography analysis of fraction 3 determined the presence of the following molecules: Benzene, 4-ethenyl-1,2-dimethoxy, Benzene, 1,4-dimethoxy-2-methyl, Butanoic acid, 2-methyl -, 4-methoxy-2- (3-methyloxiranyl) phenyl ester. In future studies, the 3 identified molecules can be purified and evaluated on the *H. pylori* culture and even on other microorganisms of medical importance.

1. INTRODUCCIÓN

México es uno de los países que aún mantiene la cultura de la herbolaria, es decir aún se utiliza el conocimiento popular sobre plantas con propiedades curativas, utilizándolas en infusiones y algunas otras formas para curar algunas afecciones de salud. Es por esto que los investigadores usan estos antecedentes etnobotánicos de diferentes culturas para enriquecer el conocimiento en materia de medicinas naturales, con la ayuda de la tecnología y avances que la ciencia ofrece actualmente. La posibilidad de encontrar compuestos activos dentro de los productos naturales que ofrezcan a los seres humanos tratamientos que no sean tóxicos para los órganos del ser humano.

La infección por *Helicobacter pylori* es muy frecuente en el ser humano. Se estima que la mitad de la población mundial está infectada y que la prevalencia varía dependiendo de factores socioeconómicos que inciden directamente en las condiciones sanitarias de las diversas comunidades. *H. pylori* es un bacilo gram negativo, curvo o espirilado, microaerófilico, 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).

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 Organización Mundial de la Salud (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 productos antibióticos que se necesitan para la población (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 evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Pimpinella anisum* sobre *H. pylori*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Material vegetal

Las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo. Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global de plantas medicinales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos (Akerlele, 1993).

El descubrimiento de nuevas sustancias sintetizadas de manera natural es uno de los aspectos de mayor interés en la comunidad científica. La búsqueda de compuestos químicos de origen natural que igualen o rebasen el efecto de los fármacos convencionales se ha convertido en una necesidad. Sobre todo con el descubrimiento del desarrollo de resistencia a antibióticos por parte de los microorganismos a una velocidad más elevada que la capacidad de generar y probar nuevos compuestos, ha impulsado esta búsqueda (Sheldon *et al.*, 1997).

2.1.1. *Pimpinella anisum*

Es una de las más antiguas plantas utilizadas en la industria alimentaria, perfumería y medicina como estimulante digestivo, antiparasitaria y antifúngica (Soliman 2002) y antipirético (Afifi, *et al.*, 1994). Además, la planta y, especialmente, el aceite esencial de la fruta se ha utilizado para el tratamiento de algunas enfermedades como la epilepsia y convulsiones (Abdul-Ghani *et al.*, 1987), para tratar el estreñimiento (Chicouri 2000) y tiene una actividad como relajante muscular (Albuquerque *et al.*, 1995). Recientemente, se ha informado que este aceite se ha utilizado como un sustituto de los antibióticos en pollos (Mehmet *et al.*, 2005). Sin embargo, hasta hoy existen pocos estudios de actividad antibacteriana de *P. anisum* (Singh *et al.*, 2002 y Tabanca *et al.*, 2003).

2.1.2 Efectos de los extractos de plantas sobre bacterias

Se han realizado diversos estudios de los extractos de plantas sobre los efectos inhibitorios del crecimiento de diversas bacterias. En 1995 se estudiaron los extractos metanólicos de *Camellia sinensis L* y de *Euphorbia hirta L*, donde se observó que estos extractos presentaron efecto contra la disentería causada por *Shigella spp*, además de no ser citotóxicos sobre el hospedero. Posteriormente en 1996 se estudiaron 20 extractos metanólicos de plantas contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* y *Candida albicans*, los resultados mostraron que los extractos de *Eucaliptus globulus*, *Punica granatum*, *Artemisia mexicana* y *Bocon arbórea* poseen actividad contra estas bacterias. En 1997, se investigaron 15 extractos de plantas de la familia Chenopodiaceas donde analizaron alcaloides, antraquinonas, cumarinas, flavonoides, saponinas, esteroides y/o terpenos y taninos, y se encontró que en la mayoría de los extractos tienen actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *P.aeruginosa*, *S. aureus* y *Bacillus subtilis* (Navarro *et al.*, 1996).

2.1.3 Metabolitos secundarios

Las plantas producen sustancias químicas que no se encuentran relacionadas con su metabolismo básico, pero que le otorgan una ventaja con respecto a las demás, el conjunto de estas sustancias químicas se denominan como metabolitos secundarios. Se han identificado varios grupos de compuestos tales como saponinas, flavonoides, quinonas, cumarinas, terpenos, taninos y alcaloides (González M, 1997). Los metabolitos secundarios identificados en plantas son: saponinas y sapogeninas, flavonoides, quinonas, cumarinas, terpenos, taninos y alcaloides.

2.2 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)

Evidencias recientes apoyan el concepto de que *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ha colonizado el estómago humano desde hace por lo menos 58,000 años (Linz *et al*, 2007); sin embargo, hace solo 30 años (abril 1984) fue definitivamente cultivado por Warren y Marshall y asociado a gastritis crónica y úlceras pépticas (Marshall y Warren, 1984). Desde ese momento, consistentemente se ha ratificado su papel etiológico en diversas patologías digestivas superiores. *H. pylori* infecta por lo menos

a la mitad de la población mundial adulta y 80 a 90% de la población de los países en vías de desarrollo (Dunn *et al*, 1997).

Diez años después de su descubrimiento, la agencia internacional para la investigación en cáncer de la OMS (IARC) lo catalogó como carcinógeno tipo I o carcinógeno definido (IARC-Lyon 1994). Hoy día es considerado la principal causa demostrada de gastritis crónica, úlceras pépticas, linfoma MALT (Tejido Linfoide Asociado a Mucosas) gástrico y cáncer gástrico (CG). En todos los infectados produce gastritis crónica sin embargo, en la mayoría de los pacientes es asintomática y en menos de 20% se produce una entidad clínica: úlceras pépticas en 15-18%, CG en 2-3%, cáncer gástrico y linfoma MALT gástrico en menos de 0.1%. Las consecuencias finales de la infección dependen de factores genéticos del individuo infectado, de la virulencia de la bacteria y de factores ambientales (Otero *et al* 2009).

Estudios epidemiológicos han estimado a *H. pylori* con un 75% de los cánceres gástricos (CG) (Herrera y Parsonnet 2009), esto equivaldría a que de los 988,000 casos nuevos de CG ocurridos en 2008, según GLOBOCAN (Ferlay *et al* 2008), casi 750,000 no hubieran sucedido si *H. pylori* no existiera. Desde cuando la IARC lo consideró un carcinógeno definido, muchos estudios se han realizado para determinar si la erradicación puede contribuir a la disminución del CG.

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).

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, pero luego aumenta progresivamente a partir de los 40 o 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 de *H. pylori* es probablemente por 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 organismo 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).

2.2.1. 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 humano.

Durante el proceso de penetración primeramente, la bacteria utiliza 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).

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).

Condiciones como gastritis atrófica, dispepsia, úlcera péptica, y adenocarcinoma gástrico, son usualmente asociadas con una infección de *H. pylori* (Covacci et al. 1999).

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.

2.2.2 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 varios antibióticos, dos o tres, ha sido usada para la erradicación de la infección. Estos incluyen claritromicina, amoxicilina, metronidazol, tetraciclina, fluoroquinolonas, 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 antisecretor 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 el antibiótico ceftriaxona, 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).

2.3 Cromatografía de gases-masas GC-MS

La Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS, por sus siglas en inglés) es una técnica analítica dedicada a la separación, identificación y cuantificación de mezclas de sustancias volátiles y semivolátiles. La separación de dichas sustancias depende de la diferente distribución de las sustancias estudiadas entre las fases móvil y estacionaria que conforman el sistema. Una vez separadas las sustancias son fragmentadas y analizadas en función de su patrón de fragmentación, el cual puede ser comparado con información contenida en una base de datos de espectros de masas para su identificación preliminar. La identificación definitiva, así como la cuantificación de cada sustancia debe hacerse mediante el empleo de sustancia de referencia.

La cromatografía de gases con espectrometría de masas o GC-MS, también conocida como detector selectivo de masas, se está convirtiendo en una técnica de cromatografía de gases de gran potencia y uso extendido. Se utiliza en muchos mercados, incluidos el medioambiental, el forense, el judicial, el de alimentos y bebidas, el del aceite y el

del gas natural, y puede analizar concentraciones muy bajas y aportar información adicional sobre el peso molecular.

La elección del gas portador a la hora de utilizar la GC-MS es fundamental, ya que el espectrómetro de masas es muy sensible a las impurezas de oxígeno, agua e hidrocarburos. Los daños del espectrómetro de masas o de la fase estacionaria del cromatógrafo de gases pueden provocar problemas significativos, como un elevado ruido de línea base y purga de la columna en el cromatograma de gases de salida, lo que reduciría la sensibilidad del analizador y reduciría la vida útil de la columna.

La elección del portador para la GC-MS-MS o la espectrometría de masas en serie son incluso más crítica, ya que es aún más sensible a las impurezas. En ambas técnicas, es común la calibración rutinaria del analizador usando una mezcla de calibración.

3. JUSTIFICACIÓN

Helicobacter pylori es una bacteria patógena que afectan al humano causando afecciones gastrointestinales. Actualmente existen drogas de elección para el tratamiento de afecciones ocasionadas *H. pylori*, sin embargo, existen reportes relacionados a la drogo-resistencia desarrolladas por ésta bacteria, por lo cual la OMS conmina a nivel mundial a la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos, que tengan potencial antibacteriano ante *H. pylori*. 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 seleccionó la especie vegetal de *Pimpinella anisum* con el propósito de obtener el extracto etanólico a partir de las semillas correspondientes, determinar los grupos funcionales o metabolitos secundarios presentes y evaluar su actividad anti-*Helicobacter pylori* y teniendo como control la droga comercial ceftriaxona; así mismo, se realizó la obtención de la fracción activa con actividad antibacteriana y finalmente se realizará una caracterización parcial mediante la técnica de Cromatografía de Gases- Masa.

4. HIPÓTESIS

Metabolitos secundarios de *Pimpinella anisum* presentan actividad biológica sobre *Helicobacter pylori* (ATCC: 43504).

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad biológica del extracto etanólicos de *Pimpinella anisum* sobre *Helicobacter pylori* y caracterizar los compuestos activos por cromatografía de gases-masas.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener y procesar las semillas de *Pimpinella anisum* para realizar la obtención del extracto etanólico (EEPa)
- Determinar el perfil fitoquímico del extracto etanólico de las semillas *P. anisum*.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólicos de *Pimpinella anisum* sobre *H. pylori* (ATCC: 43504) y obtener e identificar parcialmente las fracciones activas contra dichos microorganismos patógenos.
- Realizar la caracterización parcial mediante la Cromatografía de Gases -Masa de la fracción del EEPa con actividad anti-*H. pylori* (ATCC: 43504)

6. MATERIAL Y METODOLOGÍA

6.1 *Helicobacter pylori*

Cepa de bacteria: En este trabajo se utilizó la cepa *Helicobacter pylori* (ATCC: 43504), la cual se mantuvo en cultivo en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

6.1.1. Cultivo bacteriano

a) Mantenimiento: La cepa de *H. pylori* se mantuvo en el cepario del Laboratorio de Biología Celular en refrigeración y cuando se ocupó la cepa se retiró del refrigerador y se activó en caldo de cultivo MPT (Barrón y Quiñones, 2018) por 24 h a 37°C y se realizaron tres resiembras sucesivas para activar la cepa.

b) Cinética de crecimiento: Se prepararon 27 tubos que contenían caldo MPT (Barrón y Quiñones, 2018) 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 14 h. Se midieron además como control negativo, 3 tubos que contenían únicamente caldo MPT. Al final, se tomaron las absorbancias, se obtuvo promedio de las 3 lecturas y se graficó para obtener la curva de crecimiento.

6.2 Material vegetativo

En este trabajo se utilizó el extracto etanólico de las semillas, *P. anisum* L. Las especies de *P. anisum* L. se adquirieron en mercados locales del área metropolitana de la ciudad de Monterrey Nuevo León y se identificó en el Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. El procesamiento para la obtención del extracto etanólico se describe en la Tabla 1.

Tabla 1
Etapas del procesamiento de *P. anisum* para la obtención del extracto etanólicos

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 etanólico a partir de la semilla de la planta, se realizó agregando a matraces Erlenmeyer, una tercera parte de semillas del total del volumen del matraz y posteriormente se agregó etanol absoluto hasta cubrir tres tercios del volumen total del matraz. Los matraces se cubrieron con papel aluminio 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 etanol). 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.

6.2.1 Preparación de solución madre del extracto etanólico de *P. anisum* (EEPa)

La solución madre o stock se preparó disolviendo una cantidad conocida del extracto etanólico obtenido, en cierto volumen de etanol, y a partir de ésta 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 MPT, se incubó a 37°C por 24 h y una vez obtenida la prueba de esterilidad positiva para esterilidad, se procedió a su utilización.

6.2.2 Perfil fitoquímico del extracto etanólico de *P. anisum* (EEPa)

Al extracto etanólico 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, cada prueba se describe en la Tabla 2.

Tabla 2

Descripción de las pruebas para detectar los grupos funcionales presentes en los extractos etanólicos (de acuerdo con 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 esteroides 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 1.0 mL de ácido sulfúrico, se desarrollaron colores amarillo o rojo para esteroides y metilesteroides.
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.

Continuación Tabla 4.....

Grupo funcional	Prueba de	Procedimiento
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-Cepeda, 2000)
Aromaticidad	ácido sulfúrico-formaldehído	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.

6.3 Evaluación de la actividad biológica del extracto etanólico sobre *H. pylori*

Método turbidimétrico y recuento bacteriano en placa: Se dispuso para cada tratamiento, 16 tubos de 13x100 mm, 4 para cada dosis evaluada (1, 3, 7 y 10 mg/mL). Cada tubo contenía 3 mL de caldo MPT y se les agregó el extracto en el volumen adecuado, se inocularon con 200 µL del cultivo celular de *H. pylori*, en fase exponencial, se tomó la lectura de absorbancia mediante un espectrofotómetro, a 635nm, y posteriormente, incubaron por 6 h a 37° C. 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 fisiológica (0.85%). A partir de las últimas 8 diluciones se realizó el plaqueo, transfiriendo a cajas Petri, un mililitro de cada dilución, y enseguida se vertieron de 12 a 15 mL de agar MPT y se homogeneizaron, al solidificar el agar, se incubaron a 37° C por 18h. Transcurrido el tiempo, se contaron las colonias observadas en las placas y se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC/mL).

6.4 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental estadístico completamente al azar en donde los datos de cuantificación se sometieron a un Análisis de Varianza mediante el paquete de software estadístico SPSS versión 17.0, para determinar la diferencia significativa entre los métodos utilizados ($P < 0.05$), posteriormente se obtuvo la diferencia significativa entre métodos, los datos se sometieron a una prueba de comparación múltiple de medias de Dunnet.

6.5 Identificación parcial los compuestos que presentan actividad biológica sobre *H. pylori* mediante análisis espectroscópicos.

Para llevar a cabo la identificación parcial de los metabolitos secundarios con actividad antibacteriana sobre *H. pylori* se realizó en dos eventos:

a) Cromatografía de capa delgada: Consiste en una placa de vidrio con una fase estacionaria de sílica-gel, la cual está mezclada con sulfato de calcio como fraguante. La mezcla a separar, se disolvió en una pequeña cantidad de solvente, se colocó mediante un capilar en uno de los extremos de la cromatoplaca. Ésta se introdujo a en una cámara cromatográfica la cual contiene una cierta cantidad de la fase móvil o eluente (etanol). El eluente subió por capilaridad a través de la cromatoplaca lográndose la separación de los componentes de la mezcla en base al equilibrio (Dzido y Tuzimski, 2008), entre la adsorción de los componentes sobre la sílica y la solución de los mismos en el eluente. Ya terminado el proceso de separación, la cromatoplaca se reveló mediante una lámpara de luz (254 nm) o utilizando una cámara de yodo, con ambos métodos se observaron manchas representando a los diferentes compuestos distribuidos a lo largo de la cromatoplaca. Se utilizarán cromatoplacas “Merck” (Silica

gel 60 F254, 5x10cm, 250µm de grosor de capa) y los extractos y fracciones analizadas se colocaron utilizando un capilar de vidrio.

Se obtuvieron tres fracciones, las cuales se les evaluó la actividad anti-*H. pylori* en tres eventos independientes por triplicado, empleando la metodología turbidimétrica y recuento bacteriano en placa (RBP), tal como se describió en el apartado 6.2.3. Una vez que se tuvieron los resultados, la fracción que presentó actividad inhibitoria sobre *H. pylori* se le realizó la identificación de grupos funcionales de acuerdo con el punto 6.2.2 y Tabla 4, posteriormente se les realizó un análisis espectroscópico y cromatografía de gases-masas.

b) Análisis Espectroscópico:

-El análisis espectroscópico de la fracción con actividad inhibitoria sobre *H. pylori* se realizó de acuerdo con Macomber 1998.

-El análisis de Espectrometría de masas (EM) de la fracción con actividad inhibitoria sobre *H. pylori* se realizó de acuerdo con Silverstein *et al.*, 2005).

c) Cromatografía de Gases – Masas

- Las condiciones del instrumental necesario para llevar a cabo la cromatografía GC MS se describen en la Tabla 3.

Tabla 3
Condiciones del instrumental para realizar la cromatografía GC-MS

Instrumental	Condiciones Instrumentales
• Cromatógrafo	Agilent. GC 6890, MSD 5973N
• Columna	HP-5 (30 m *0.25 mm x 0.25 µm)
• Inyector	Split 1:10
• Gas acarreador	Helio
• Flujo de gas acarreador	1mL/min
• Temperatura del inyector	250°C
• Temperatura de Fuente y Detector	230 y 250 °C, respectivamente.
• Temperatura Inicial	70°C, 1.0 min
• Programa de Temperaturas	70° a 200°C a 10°C/min, 2min 200°C a 320°C a 10°C/min.
• Temperatura Final	320°C, 4 min.
• Fuente de Ionización	Impacto Electrónico
• Analizador	Cuadropolo

7. RESULTADOS

7.1 Material vegetal

7.1.1 Determinación de grupos funcionales y metabolitos secundarios en el extracto etanólico de *P. anisum*

Se realizó la extracción etanólica de las semillas de *P. anisum* y posteriormente se le realizaron pruebas fitoquímicas para identificar grupos funcionales presentes en la muestra (Tabla 4). Se determinó la presencia de saponinas, alcaloides, flavonas, sesquiterpenlactonas, aromaticidad, insaturaciones, oxhidrilos fenólicos, esteroides, triterpenos así como carbohidratos.

Tabla 4
Grupos funcionales presentes en el extracto etanólico de *P. anisum*

Prueba fitoquímicas	Grupo Funcional	Reacción
KMnO ₄	Insaturaciones	+
2,4-Dinitrofenilhidracina	Carbonilo	-
FeCl ₃	Oxhidrilos fenólicos (taninos vegetales)	+
H ₂ SO ₄	Flavonoides	Flavonas
Lieberman-Buchard	Esteroides y triterpenos	+
Salkowski	Esteroides y triterpenos	-
Molish	Carbohidratos	+
Cumarinas	Carbohidratos	+
Lactonas	Carbohidratos	-
Baljet	Sesquiterpenlactonas	+
Dragendorff	Alcaloides	+
Bicarbonato de Sodio	Saponinas	+
H ₂ SO ₄ -Formaldehído	Aromaticidad	+

7.2 *Helicobacter pylori*

7.2.1. Morfología macroscópica

Una vez obtenida la cepa ATCC43504 de *H. pylori* se procedió a realizar la activación y resiembra en medio de cultivo MPT para su mantenimiento. En caldo MPT, incubada a 37° C, produjo biofilm en la parte superior del medio (Figura 1A), volviéndose muy notorio y denso a partir de los 3 ó 4 días de incubación. Al sembrarse en agar MPT produjo colonias grandes, viscosas y con formación de gota. (Figura 1B).

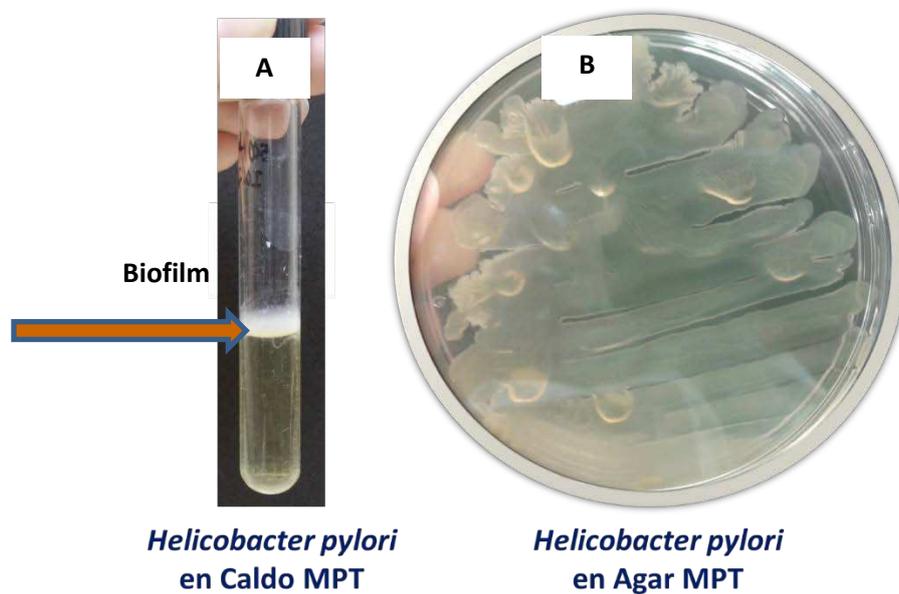


Figura 1. Aspecto de *H. pylori* a nivel macroscópico. En la imagen A se observa el biofilm producido por *H. pylori* en caldo MPT y en la imagen B se observan las colonias típicas de *H. pylori* en agar MPT, las cuales muestran un punto central y crecimiento en forma de ámpula o de gota colgante

7.2.2 Cinética de crecimiento

En la Figura 2 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 las 12 horas de incubación. El crecimiento de la bacteria se monitoreó durante 14 horas. Cada punto graficado corresponde al promedio de tres eventos independientes por triplicado. Obteniendo en su hora 6 de la fase logarítmica como la más recomendable para utilizarla en el proceso.

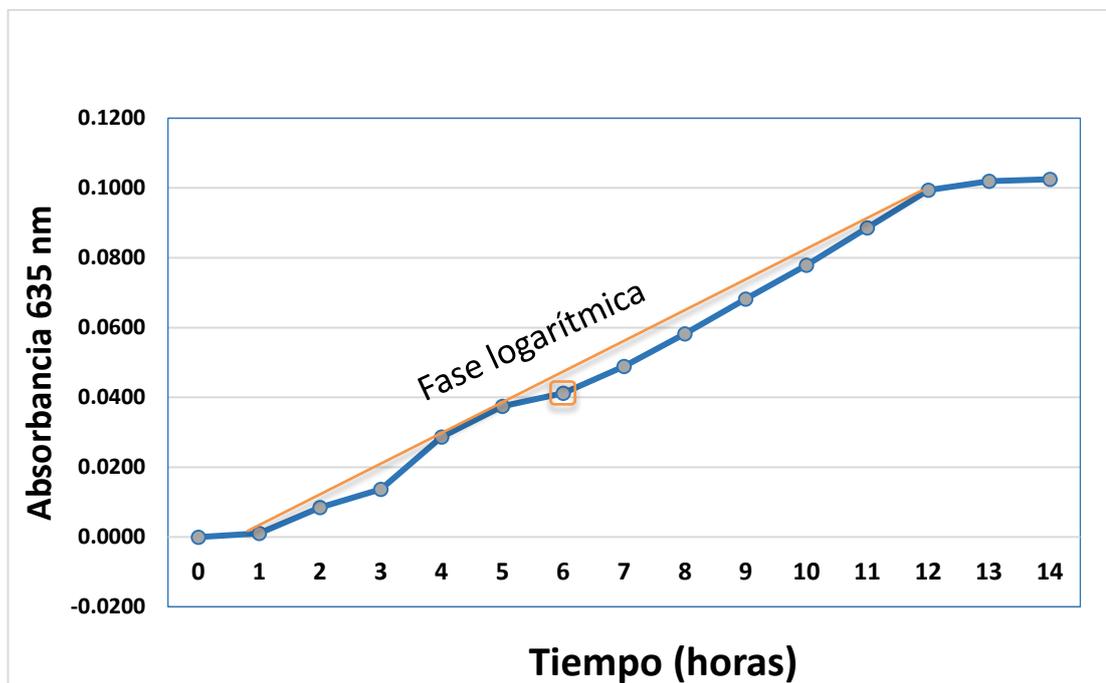


Figura 2. Cinética de crecimiento de *H. pylori*. En esta figura se muestra primeramente una fase de adaptación celular, seguida de una intensa fase exponencial, la cual da inicio en la hora 1 y empieza a decrecer aproximadamente a las 12 horas. A continuación se aprecia una fase estacionaria hasta terminar dicha cinética.

7.3. Actividad biológica del extracto etanólicos de *P. anisum* sobre *H. pylori*

Se evaluaron cuatro concentraciones (1, 3, 7, 10 mg/mL) del extracto etanólico de *P. anisum* (EEPa) sobre *H. pylori*, mediante la técnica turbidimétrica y a través de la técnica de recuento bacteriano en placa (RBP). Los porcentajes de viabilidad e inhibición de las dosis del EEPa se muestran en la Tabla 5 y Figura 3.

De acuerdo a los resultados observados, en la Tabla 6, se observa que a la dosis de 7 mg/mL del extracto etanólico de *P. anisum* presenta una inhibición del 44.38% sobre el cultivo de *H. pylori*.

Tabla 5
Determinación de la actividad anti-*H. pylori* del EEPa

Dosis evaluados [mg/mL] del EEPa	Absorbancia (635 nm)	<i>H. pylori</i>	
		Viabilidad (%)	Inhibición (%)
Control	0.971	100	0
1	0.89	91.65	8.34
3	0.78	80.33	19.67
7	0.54	55.61	44.38
10	0.49	50.46	49.54

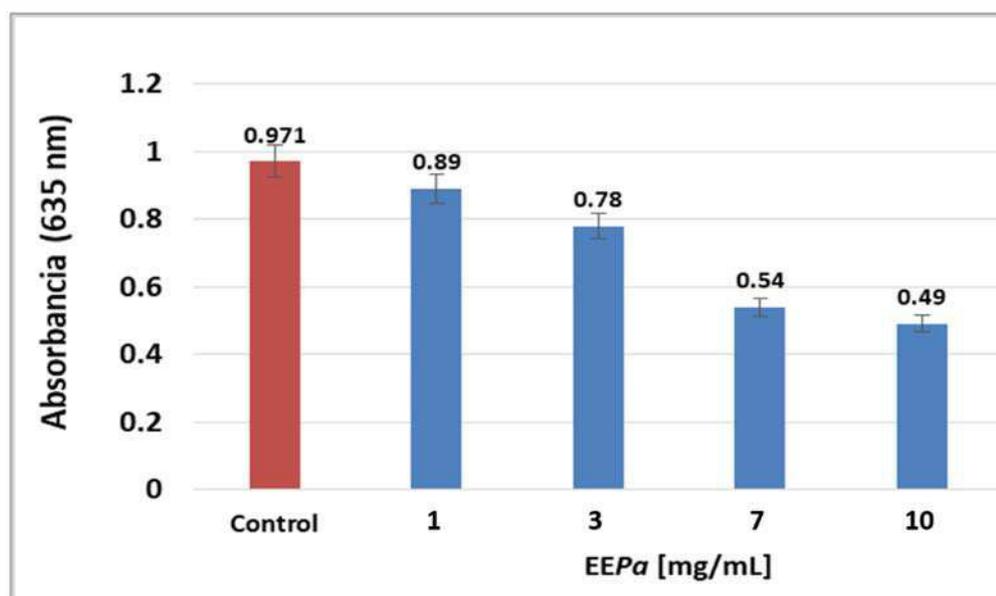


Figura 3. Absorbancia de *H. pylori* en presencia del EEPa total. En esta imagen se observa la absorbancia que presentó el cultivo de *H. pylori* en presencia del extracto etanólico de *P. anisum* total.

En la Figura 3 se observa que la dosis de 7 mg/mL del extracto etanólico de *P. anisum* (EEPa) total inhibe significativamente la lectura de absorbancia del cultivo de *H. pylori*, la dosis de 10 mg/mL del EEPa presenta inhibición significativa con respecto al resto de los tratamientos, pero no con respecto a la dosis de 7 mg/mL del EEPa, por tal motivo fue la dosis que se seleccionó para determinar las UFC/mL.

En la Figura 4 se observa que en el control se obtuvieron 144×10^5 UFC/mL colonias de *H. pylori* y las colonias de *H. pylori* obtenidas en presencia del extracto etanólico de *P. anisum* a la dosis de 7 mg/mL sólo se obtuvieron 34×10^5 UFC/mL colonias de *H. pylori*, lo cual indica que el extracto etanólico de *P. anisum* total inhibió un 76.39% el cultivo de *H. pylori*. La droga de elección empleada fue la ceftriaxona a la dosis de 0.1 mg/mL, el cual inhibió el 100% del cultivo de *H. pylori*.

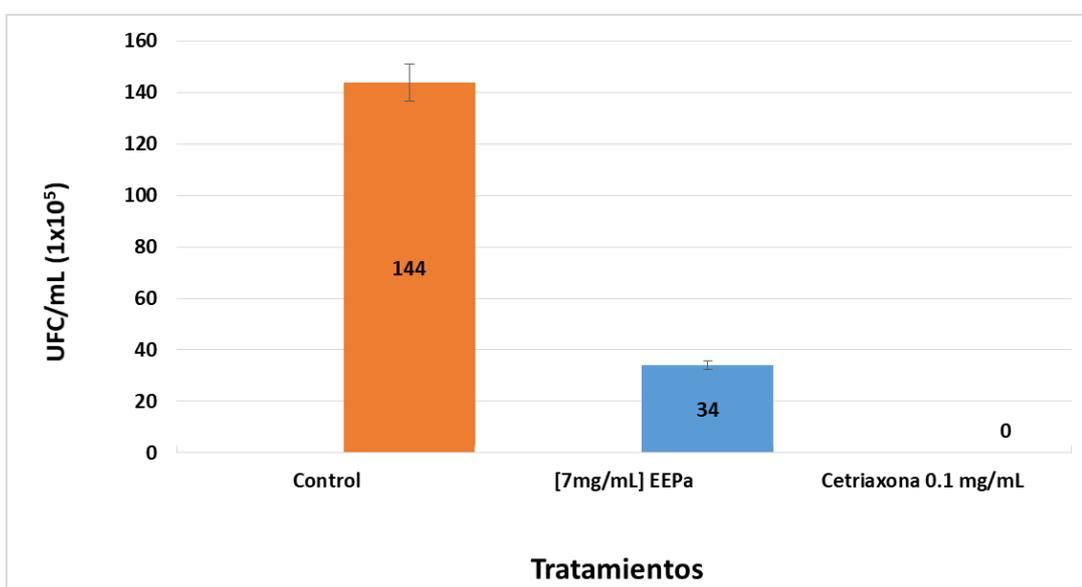


Figura 4. Resultados de las UFC/mL de *H. pylori* con tratamientos. En el gráfico se observa como control a *H. pylori* el cual arrojó un conteo de 144×10^5 UFC/mL; enseguida se muestra al tratamiento elegido como control positivo de inhibición, es decir, la droga ceftriaxona, la cual no dio ningún crecimiento de la bacteria en placa. Enseguida se muestran que sólo se obtuvieron 34×10^5 UFC/mL al ser cultivada *H. pylori* en presencia del EEPa.

7.4. Actividad biológica de las fracciones del extracto etanólicos de *P. anisum* sobre *H. pylori*

7.4.1 Determinación de la actividad anti-*H. pylori*

a) **Método turbidimétrico:** El extracto etnólico de *P. anisum* total, se fraccionó a través de cromatografía en capa delgada, y se obtuvieron tres fracciones, las cuales se evaluaron por separado sobre el cultivo de *H. pylori*, de cada fracción se evaluó 7 mg/mL, para determinar la actividad anti *H. pylori*, en la Figura 5, se observan los valores de absorbancia obtenidos, y la fracción 3 presentó la mayor inhibición con un 41.4 % de inhibición, la fracción 1 sólo inhibió 16.15%, y la fracción 2, mostró un incremento del 20% en la absorbancia del cultivo de *H. pylori*.

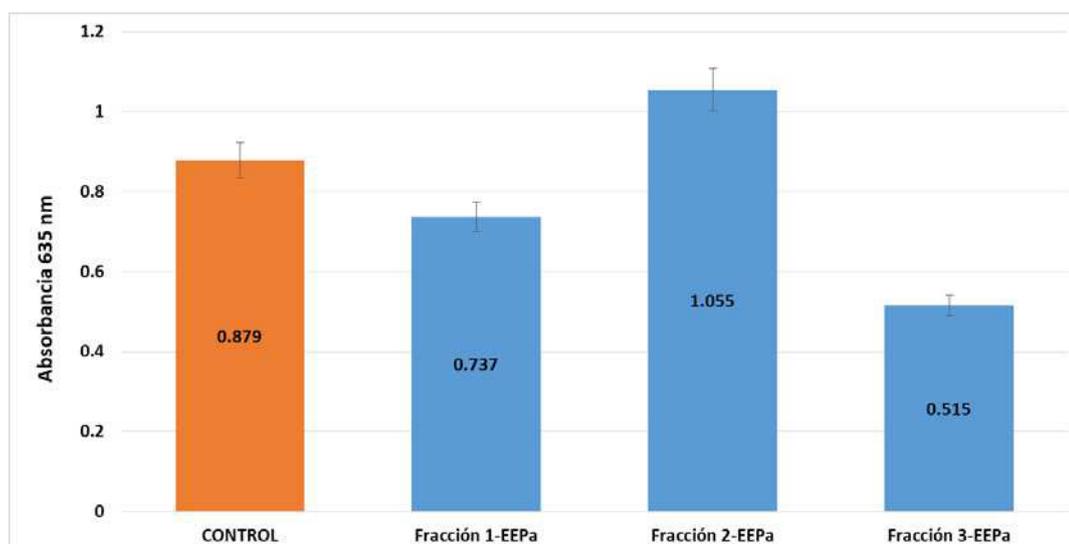


Figura 5. Resultados de la absorbancia de *H. pylori* en presencia de tres fracciones obtenidas del EEPA. En el gráfico se observa como control *H. pylori* presentó una absorbancia de 0.879 nm, y las fracciones 1 y 3 inhiben un 16.15 y 41.4% respectivamente, pero la fracción 2 incrementa en un 20% la absorbancia con respecto al control.

En la figura 6 se muestra el aspecto del cultivo de *H. pylori* en el medio MPT en presencia de las fracciones 1, 2 y 3 obtenidas a partir del extracto etanólico de *P. anisum* evaluados a la dosis de 7 mg/mL, es importante notar la presencia de abundante biofilm en el control de *H. pylori*, éste biofilm no se observa en el cultivo de *H. pylori* en presencia de la fracción 3 del extracto etanólico de *P. anisum*.

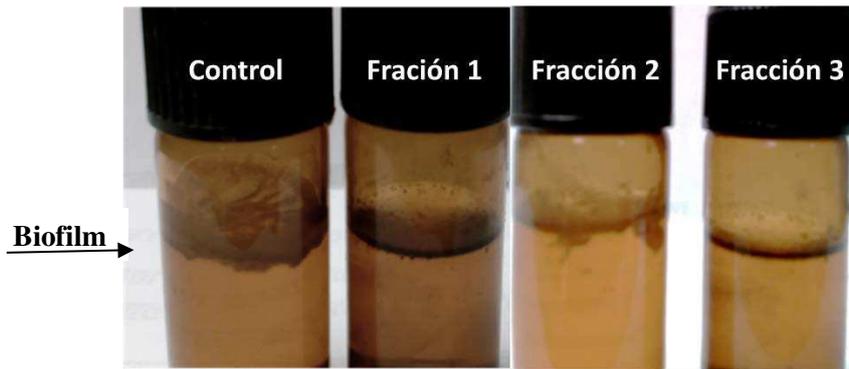


Figura 6. Aspecto del cultivo de *H. pylori* en presencia de tres fracciones obtenidas del EEPa. Se observa como control *H. pylori* presentó una gran capa de biofilm, así como la fracción 2 del EEPa también presenta biofilm, pero en menor cantidad, la fracción 1 y 3 no se aprecia biofilm, pero sí presentaron turbidez.

- b) **Determinación de UFC/mL:** Se procedió a plaquear el tubo conteniendo el cultivo control de *H. pylori* y el tubo conteniendo el cultivo de *H. pylori* en presencia de la Fracción 3 del extracto etanólico de *P. anisum* (F3-EEPa). En la Figura 7 se observa el valor de las UFC/mL de *H. pylori* obtenidas en presencia de 7 mg/mL de la fracción 3 del extracto etanólico de *P. anisum*, el cual inhibió un 38% el cultivo de *H. pylori*, así como la formación de biofilm característico del cultivo de *H. pylori*.

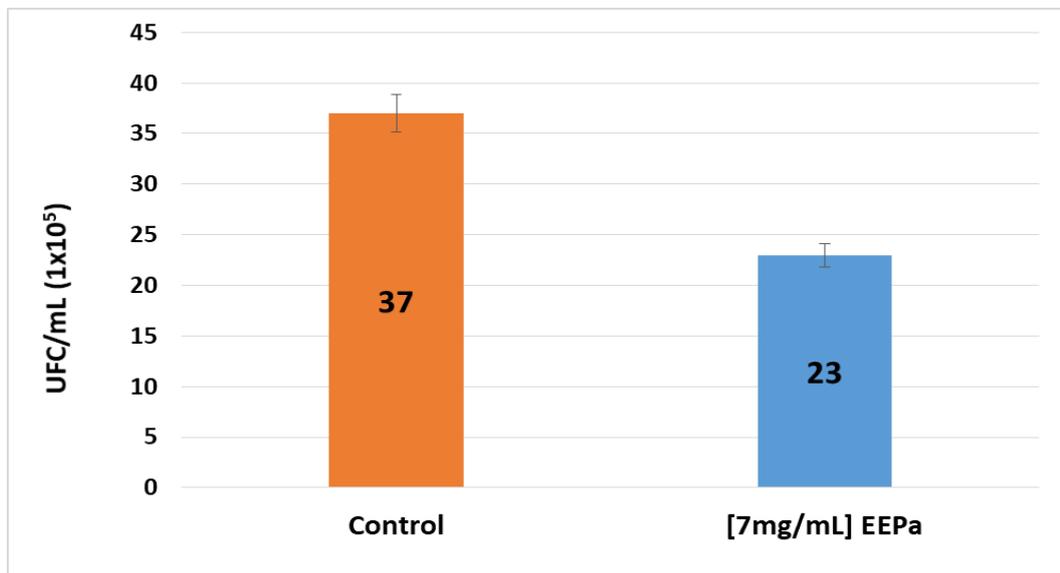


Figura 7. Resultados de las UFC/mL de *H. pylori* cultivado en presencia de la fracción 3 del extracto etanólico de *P. anisum*. Se aprecia una inhibición del 38%.

7.4.2 Identificación de grupos funcionales presentes en la fracción 3 del EEPa.

Una vez obtenida el potencial anti-*H. pylori* de la fracción 3 del extracto etanólico de *P. anisum* se procedió a identificar los grupos funcionales presentes en éste extracto, de acuerdo con la metodología de Domínguez 1973, y posteriormente se procedió a comparar la presencia de los grupos funcionales tanto del EEPa total, así como de la fracción total del EEPa, los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6
Grupos funcionales presentes en el extracto etanólico de *P. anisum* total y fracción 3

Prueba fitoquímicas	Grupo Funcional	Reacción del EEPa total	Reacción de la F3-EEPa
KMnO ₄	Insaturaciones	+	+
2,4-Dinitrofenilhidracina	Carbonilo	-	+
FeCl ₃	Oxhidrilos fenólicos (taninos vegetales)	+	-
H ₂ SO ₄	Flavonoides	Flavonas	Flavonas
Lieberman-Buchard	Esteroles y triterpenos	+	-
Salkowski	Esteroles y triterpenos	-	-
Molish	Carbohidratos	+	-
Cumarinas	Carbohidratos	+	+
Lactonas	Carbohidratos	-	-
Baljet	Sesquiterpenlactonas	+	-
Dragendorff	Alcaloides	+	-
Bicarbonato de Sodio	Saponinas	+	+
H ₂ SO ₄ .Formaldehído	Aromaticidad	+	+

Se observa que la fracción 3 del EEPa presenta los siguientes grupos funcionales: Insaturaciones, grupo carbonilo, carbohidratos (cumarinas), saponinas, aromaticidad y flavonas. A diferencia del EEPa total, ésta fracción 3 no presenta oxhidrilos fenólicos, esteroles-terpenos, sesquiterpenlactonas ni alcaloides.

7.5 Identificación parcial de los compuestos que presentan actividad biológica sobre *H. pylori* mediante análisis espectroscópicos.

Al analizar la fracción 3 del EEPa al cromatografo de gases acomplado a masas (GC-MS) empleando el AcqMethod 8270, se obtuvo el perfil de los metabolitos más abundantes en la GC MS, el perfil obtenido se muestra en la Figura 8.

```

13 16.38 27.37 C:\Database\wiley7n.l
  •Benzene, 4-ethenyl-1,2-dimethoxy- 64465 006380-23-0 72
  $$ 3,4-Dimethoxystyrene
  CIS-ISO-EUGENOL 64583 005912-86-7 72
  2-(2-ethyl-1-butenyl)-4-methylfura 65257 000000-00-0 64

8 13.21 9.68 C:\Database\wiley7n.l
  Benzenamine, 5-methoxy-2-methyl- $ 32801 050868-72-9 64
  $ 2-Amino-4-methoxytoluene $$ 5-Me
  thoxy-2-methylaniline
  2,5-Dimethoxytoluene $$ Benzene, 1 49029 024599-58-4 64
  ,4-dimethoxy-2-methyl- $$ Toluene,
  2,5-dimethoxy- $$ 1,4-Dimethoxy-2
  -methylbenzene $$ Methyl hydroquin
  one dimethyl ester $$ 2-Methylhydr
  oquinone dimethyl ether $$ Methylh
  ydroquinone dimethyl ether $$ 2-Me
  thyl-1,4-dimethox
  2(1H)-Pyridinone, 1,4,6-trimethyl- 32725 015031-89-7 59
  $$ 2(1H)-Pyridone, 1,4,6-trimethy
  l- $$ 1,4,6-Trimethyl-2(1H)-pyrido
  ne $$ 1,4,6-Trimethyl-2-pyridone

15 17.20 10.85 C:\Database\wiley7n.l
  2-(1',2'-epoxypropyl)-4-methoxyphe 205283 097180-28-4 93
  nyl 2-methylbutanoate $$ Butanoic
  acid, 2-methyl-, 4-methoxy-2-(3-me
  thyloxiranyl)phenyl ester
  Butanoic acid, 2-methyl-, 4-methox 205282 097180-28-4 46
  y-2-(3-methyloxiranyl)phenyl ester
  exo-Tricyclo[5.3.2.0(1,7)]dodecan- 87199 094250-29-0 43
  2-ol $$ endo-Tricyclo[5.3.2.0(1,7)
  ]dodecan-2-ol $$ 1H,4H-3a,8a-Ethan
  oazulen-4-ol, hexahydro-, (3a.alpha
  .,4.alpha.,8a.alpha.)- (CAS)

```

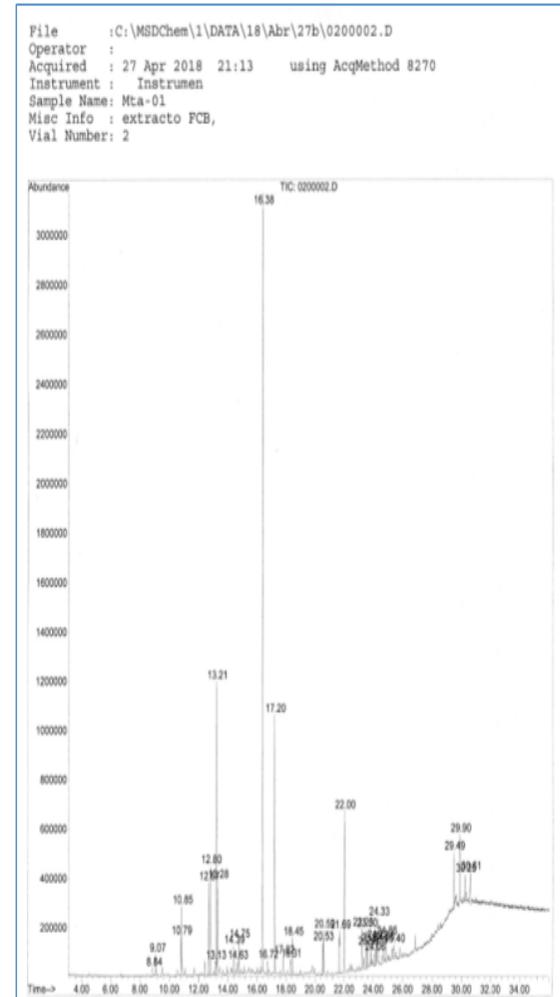


Figura 8.- Espectro ampliado del Compuesto obtenido de la fracción tres del extracto etanólico de *P. anisum*

De acuerdo a los datos obtenidos, y posteriormente analizados dichos datos empleando el programa InChITrust se determinó la presencia de tres moléculas presentes en la fracción 3 del EEPa, las cuales se muestran en las Figura 9, 10 y 11.

```

13 16.38 27.37 C:\Database\wiley7n.1
•Benzene, 4-ethenyl-1,2-dimethoxy- 64465 006380-23-0 72
  $$ 3,4-Dimethoxystyrene
  CIS-ISO-EUGENOL 64583 005912-86-7 72
  2-(2-ethyl-1-butenyl)-4-methylfura 65257 000000-00-0 64
  
```

Benzene, 4-ethenyl-1,2-dimethoxy-

- **Fórmula:** C₁₀H₁₂O₂
- **Peso molecular:** 164.2011
- **IUPAC InChI Estándar:**
 - InChI=1S/C10H12O2/c1-4-8-5-6-9(11-2)10(7-8)12-3/h4-7H,1H2,2-3H3
 - [Descarga el identificador en un archivo..](#)
- **IUPAC InChIKey Estándar:** NJXYTXADXSRTJ-UHFFFAOYSA-N
- **Número de registro CAS:** 6380-23-0
- **Estructura química:**

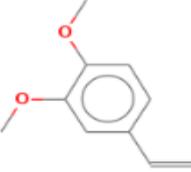


Figura 9. Identificación en la fracción 3 del EEPa de la molécula Benzene, 4-ethenyl-1,2-dimethoxy

```

8 13.21 9.68 C:\Database\wiley7n.1
Benzenamine, 5-methoxy-2-methyl- $ 32801 050868-72-9 64
$ 2-Amino-4-methoxytoluene $$ 5-Me
thoxy-2-methylaniline
2,5-Dimethoxytoluene $$ Benzene, 1 49029 024599-58-4 64
,4-dimethoxy-2-methyl- $$ Toluene,
2,5-dimethoxy- $$ 1,4-Dimethoxy-2
-methylbenzene $$ Methyl hydroquin
one dimethyl ester $$ 2-Methylhydr
oquinone dimethyl ether $$ Methylh
ydroquinone dimethyl ether $$ 2-Me
thyl-1,4-dimethox
2(1H)-Pyridinone, 1,4,6-trimethyl- 32725 015031-89-7 59
$$ 2(1H)-Pyridone, 1,4,6-trimethy
l- $$ 1,4,6-Trimethyl-2(1H)-pyrido
ne $$ 1,4,6-Trimethyl-2-pyridone
  
```

Benzene, 1,4-dimethoxy-2-methyl-

- **Fórmula:** C₉H₁₂O₂
- **Peso molecular:** 152.1904
- **IUPAC InChI Estándar:**
 - InChI=1S/C9H12O2/c1-7-6-8(10-2)4-5-9(7)11-3/h4-6H,1-3H3
 - [Descarga el identificador en un archivo..](#)
- **IUPAC InChIKey Estándar:** IQISOVKPFBLLQIQ-UHFFFAOYSA-N
- **Número de registro CAS:** 24599-58-4
- **Estructura química:**



Figura 10. Identificación en la fracción 3 del EEPa de la molécula Benzene, 1,4- dimethoxy-2-methyl

```

15 17.20 10.85 C:\Database\wiley7n.1
2-(1',2'-epoxypropyl)-4-methoxyphenyl 205283 097180-28-4 93
nyl 2-methylbutanoate $$ Butanoic
acid, 2-methyl-, 4-methoxy-2-(3-me
thyloxiranyl)phenyl ester
Butanoic acid, 2-methyl-, 4-methox 205282 097180-28-4 46
y-2-(3-methyloxiranyl)phenyl ester
exo-Tricyclo[5.3.2.0(1,7)]dodecan- 87199 094250-29-0 43
2-ol $$ endo-Tricyclo[5.3.2.0(1,7)
]dodecan-2-ol $$ 1H,4H-3a,8a-Ethan
oazulen-4-ol, hexahydro-, (3a.alpha
a.,4.alpha.,8a.alpha.)- (CAS)

```

Butanoic acid, 2-methyl-, 4-methoxy-2-(3-methyloxiranyl)phenyl ester

- **Fórmula:** C₁₅H₂₀O₄
- **Peso molecular:** 264.3169
- **IUPAC InChI Estándar:**
 - InChI=1S/C15H20O4/c1-5-9(2)15(16)19-13-7-6-11(17-4)8-12(13)14-10(3)18-14/h6-10,14H,5H2,1-4H3
 - [Descarga el identificador en un archivo..](#)
- **IUPAC InChIKey Estándar:** VXJWWVFBEJTTKA-UHFFFAOYSA-N
- **Número de registro CAS:** 97180-28-4
- **Estructura química:**

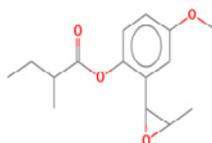


Figura 11. Identificación en la fracción 3 del EEPa de la molécula Butanoic acid, 2-methyl-, 4-methoxy-2-methy-2-(3-methyloxiranyl)phenylester.

8. DISCUSIONES

En este trabajo uno de los objetivos fue obtener los extractos etanólicos de *P. anisum* y evaluar su actividad anti-*H. pylori*

Para la obtención de los extractos vegetales se empleó como solvente el etanol por su alta polaridad la cual le permite extraer mayor cantidad de sustancias activas, la elección del etanol, se realizó por ser un solvente poco reportado en la literatura y ya que su nivel de toxicidad al organismo es mucho menor que otros solventes tales como el metanol.

La actividad biológica que presentó el extracto etanólico de *P. anisum* sobre el crecimiento de *H. Pylori* podría deberse a la gran cantidad de metabolitos secundarios presentes en el extracto los cuales fueron arrastrados satisfactoriamente de la semilla con el solvente utilizado, principalmente se pudo deber la inhibición a la presencia de Flavonas.

Considerando la gran variedad de compuestos químicos presentes en el extracto obtenido, es muy probable que su actividad antimicrobiana no sea atribuible ni a un compuesto ni a un mecanismo específico, sino a la acción combinada de varios metabolitos. Por esta razón es probable que exista una sinergia entre los metabolitos que constituyen dicho extracto, potenciando el efecto contra las células bacterianas.

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).

De acuerdo al análisis de los resultados, se demuestra que el extracto etanólico de la semilla de *P. anisum* presentó actividad inhibitoria sobre *H. pylori*, esta potente actividad antibacteriana podría estar relacionada a la presencia de flavonas, ya que se

identificó tanto en el extracto etanólico de *P. anisum* total, así como en la fracción tres obtenida a partir de dicho extracto.

Uno de los flavonoides más estudiados y abundantes es la quercetina cuya fórmula molecular es C₁₅H₁₀O₇, Fue descubierta por J. Rigaud en el año 1854, es un flavonol que se encuentra presente generalmente en frutas como en verduras en especial en la cebolla roja. Otros alimentos con niveles elevados de quercetina son las manzanas, las uvas, el brócoli o el té. La quercetina es el flavonoide más abundante y el más habitual en la dieta humana, destacando por su elevada actividad antioxidante (Hollman PCH, *et al*; 1998).

Abad R. *et al.*, 2006, reportó que la quercitina presenta actividad antibacteriana contra *Staphilococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* y *Micobacterium phlei*, así también Gupta en 1995 mencionó que la actividad antibacteriana puede atribuirse a la inhibición de las enzimas involucradas en el desarrollo de la bacteria.

Por otra parte, A. Akhtar *et al.*, en 2008, demostraron la actividad bactericida del extracto de metanol de las semillas de *P. anisum* sobre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Esta actividad bactericida probablemente puede ser adjudicada al anetol, un aceite esencia de *P. anisum*.

También se han reportado recientemente que diversos extractos a partir de *P. anisum* presentan actividad antiamibiana sobre *Pseudomonas aeruginosa* (Huda *et al.* 2015), sin embargo en nuestros bioensayos no se observó actividad inhibitoria sobre esta bacteria (datos no mostrados), sin embargo esta diferencia de resultados con respecto a los otros reportes, se puede deber a el tipo de solvente empleado, la mayoría ha empleado metanol como solvente.

En la fracción 3 del extracto etanólico de *P. anisum* se identificaron tres moléculas: Benzene, 4-ethenyl-1,2-dimethoxy, Benzene, 1,4- dimethoxy-2-methyl y Butanoic acid, 2-methyl-, 4-methoxy-2-methy-2-(3-methyloxiranyl)phenylester, sería recomendable en trabajos futuros aislarlos y evaluar su actividad biológica sobre diversos agentes infecciosos.

En la Figura 6 se muestran cuatro tubos, los cuales son el resultado del bioensayo de la evaluación de la actividad anti-*H. pylori* de las tres fracciones obtenidas a partir del extracto etanólico de *P. anisum*, se observa que el control presenta abundante biofilm, así como el cultivo en presencia de la fracción 2, sin embargo la fracción 3 presentó inhibición total de la formación del biofilm, este resultado es importante, ya que *H. pylori* tiene la capacidad de colonizar el estómago presentando éste un pH de 2, y *H. pylori* sólo se multiplica a pH 7, parecería ser incongruente que ésta bacteria habite éste órgano, sin embargo la capacidad de colonizarlo se debe a que presenta la capacidad de formar polímeros y crear una biopelícula o biofilm que le brinda la capacidad de tener un microambiente idóneo para su desarrollo, tal como se observa en la Figura 12. 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). Sería importante en futuros trabajos purificar las tres moléculas obtenidas y evaluar su actividad anti *H. pylori* en modelos *in vitro* e *in vivo*.

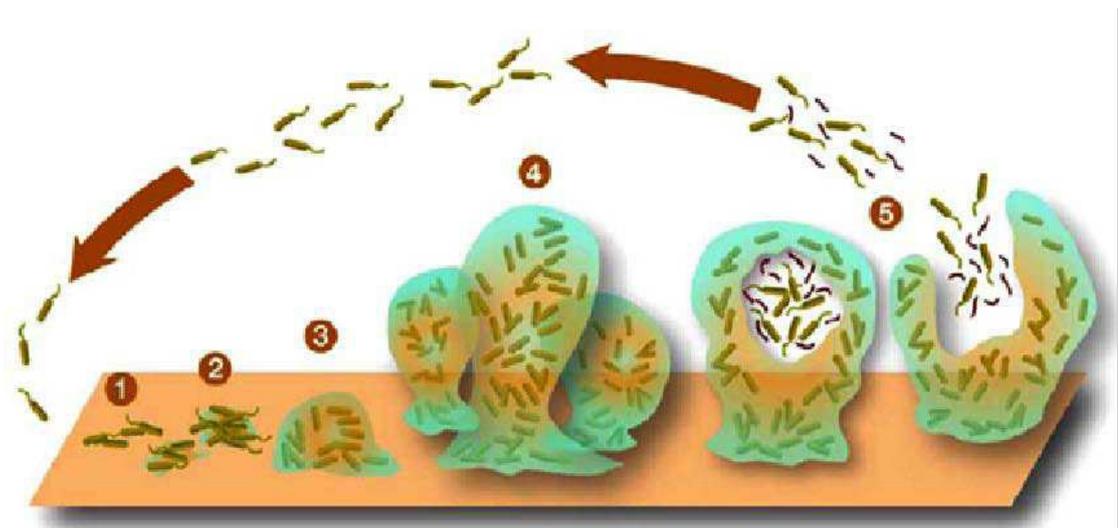


Figura 12. Producción de biofilm de *H. pylori*. Formación del biofilm y vesículas en los cultivos normales de *H. pylori*. 1) Células de *H. pylori* colonizan la superficie, 2) polímeros extracelulares son producidos, 3) y 4) madura la arquitectura del biofillm, 5) células de *H. pylori* son liberadas a partir del biofilm (Tomado de Dr. Ettingers's biofilms protocol for lyme and gut pathogens/advancedhealing.com)

9. CONCLUSIONES

El extracto etanólico de la semilla de *Pimpinella anisum* inhibe el crecimiento in vitro de *Helicobacter pylori* (ATCC:43504) en un 76.30%.

La fracción 3 del extracto etanólico de la semilla de *P. anisum* inhibió 41.45 el crecimiento in vitro de *H. pylori* (ATCC:43504).

El análisis de GC-MS de la fracción 3 del extracto etanólico de la semilla de *P. anisum* corresponde a una molécula de Benceno, 4-etenoil-1,2-dimetoxystireno

10. PERSPECTIVAS

Identificar y purificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de *Pimpinella anisum* utilizando los diferentes métodos químicos para su separación tales como las cromatografías y sus diferentes versiones, con el fin de poder medir su actividad biológica individual y posteriormente realizar combinaciones para lograr un efecto sinérgico que aumente su efecto sobre *Helicobacter pylori*.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abad Reyesa, Adrés; Bahsas, Alí; Delgado Méndeza, Paulino; Amaro Luisa, Juan M.; Neil Towers, G.H. (2006) Actividad antimicrobiana y estudio fitoquímico preliminar de *mandevilla veraguasensis* (Seem.) Helms.,(Apocynaceae) Avances de Química, 1(3): 39-34.
- Abdul-Ghani A.S., S.G. El-Lati, A. I. Sacaan and M.S. Suleiman (1987). In vitro antibacterial activity of Pimpinella anisum fruit extracts against some pathogenic bacteria. International J. Crude Drug Res, 25:39-43.
- 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.
- Afifi NA, A. Ramadan, E. A. El-Kashoury and H.A (1994). El-Banna. Some pharmacological activities of essential oils of certain umbelliferous fruits. Vet. Med. J. Giza, 42:85-92.
- Akerele O (1993) Las plantas medicinales; un Tesoro que no debemos desperdiciar. Foro Mundial de la Salud 14 :390-395
- Albuquerque A., A.L. Sorenson and J.H. Leal Cardoso (1995). J. Ethnopharmacology, 49:41-49.
- Alviano DS, Alviano CS. (2009). Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases. Current Pharmaceutical Biotechnology. 10 (1):106–121.

- Barrón-González M.P. and Quiñones-Gutiérrez, Y. (2018) Antibiosis of Cefotaxime/Clindamycin and *Lactobacillus acidophilus* on Related Bacteria to Diabetic Foot Ulcer. *Food and Nutrition Sciences*, 9, 277-289.
- Bazzoli F. (2001). Key points from the revised Maastrich consensus Report: the impact general practice. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 13: S3-S7.
- 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.
- 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.
- Cervantes García, (2006). Estrella. *Helicobacter pylori e infecciones asociadas*. Monografía. UNAM.
- Chicouri M. and I. Chicouri (2000). Novel pharmaceutical compositions containing senna with laxative effect. *Fr. Demande FR 2791892 A1*, Oct 13, 6.
- 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.
- Dan L. Longo, Editor, Anthony S. Fauci, Editor, Dennis L. Kasper, Editor, Stephen L. Hauser, Editor, J. Larry Jameson, Editor, Joseph Loscalzo, Editor, *Harrison's* (2011). *Principles of Internal Medicine*, 18 Edition .

- Domingo D, y López M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*. 16(4):385-393.
- Domínguez X. A (1973). *Métodos de investigación fitoquímica*. 1ª edición. LIMUSA. México, D.F. 176.
- 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.
- Dunn Be, Cohen H, Blaser MJ (1997). *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev*; 10: 720-41.
- Dzido TH, Tuzimski T. (2008). Chambers, Sample Application and Chromatogram Development. In:Thin Layer Chromatography in Phytochemistry.Waksmundzka-Hajnos M.Sherma J. and Kowalska T.(eds.). CRC Press: Boca Ratón, Florida, pp. 119-168
- 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.
- 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.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F. Estimates of worldwide burden of cancer in (2008): *Int J Cancer* 2010; 127: 2893-17.
- Field LD, Sternhell S, Kalman JR.(2008). *Organic Structures from Spectra*. Wiley & Sons Inc.:West Sussex, England, pp.21-32

- 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.
- 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, Leyer H. (1993). Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology*. 38:371–377.
- 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>
- Giffoni-Leite JJ, Salles Brito EH, Aguiar-Cordeiro R, Nogueira-Brilhante RS, Costa-Sidrim JJ, Medeiros-Bertini L, Maia de Moraes S, Gadelha-Rocha MF. (2009). Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extract. *Revista de la Sociedad Brasileña de Medicina Tropical*. 42(2): 110-113.
- González Torres, Dionisio M. (2009): *Catálogo De Plantas Medicinales (y Alimenticias y Útiles) Usadas En Paraguay.*, Editorial Servilibro, Asunción-Paraguay. ISBN 999258596X
- González-Elizondo M, López-Enríquez IL, González-Elizondo M.S., Tena-Flores JA. (1997). *Plantas medicinales del estado de Durango y zonas aledañas*. Instituto Politécnico Nacional, México. pp. 27-30.

- Goodman y Gilman. (2006). Las bases farmacológicas de la Terapéutica. Brunton L., Parker K. ISBN 9701057392.
- 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.
- Gross, JH. (2004). *Mass Spectrometry: A Textbook*. Springer-Verlag: Germany, pp.223-243.
- Gupta MP. (1995). 270 plantas medicinales iberoamericanas. Convenio Andrés Bello, CYTED. Bogotá, Colombia.
- Herrera V, Parsonnet J. *Helicobacter pylori* and gastric adeno- carcinoma. *Clin Microbiol Infect* (2009); 15: 971-6.
- 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.
- Holder IA. *Pseudomonas aeruginosa* burn infections: pathogenesis and treatment, In M. Campa (ed), *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen. New York: Plenum Press; (1993).p. 275-295.
- Hollman PCH Y Katan MB (1998). Absorption, metabolism, and bioavailability of flavonoids. En: *Flavonoids in Health and Disease*. Ed. Marcel Dekker, INC. New York. 22: 483-522.
- Hulten K, Han SW, Enroth H, Klein PD. (1996). *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterology*. 110:1031-5.

- Huda S.A.A., Mohamed, Warda S.A., Aisha ZI. (2015). In vitro antimicrobial activity of anise seed (*Pimpinella anisum* L.). *International Journal of Advanced Research*, 3(1):359-367.
- Hulten K, Han SW, Enroth H, Klein PD. (1996). *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterology*. 110:1031–5.
- International Agency for Research on Cancer (1994). Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic risks to humans. 61. Lyon.
- 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.
- Jacobsen NE. (2007). *NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology*. Wiley & Sons Inc.: New Jersey, pp.74-118
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manic A, A, Liu H, Roumagnac P. (2007). An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*; 445: 915-8.
- Macomber RS. (1998). A Complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy. Wiley & Sons Inc. USA, pp.1-46
- 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.
- Marshall BJ, Warren JR. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*; 1: 1311-5.
- Mayshall GC. (1996). Nosocomial burn wound infections, In: GC Mayshall (ed), *Hospital Epidemiology and infections control*. Baltimore, Md: The Williams & Williams Co.; p. 225-236
- McGee DJ, Mobley, HL. (1999). Mechanisms of *Helicobacter pylori* infection: Bacterial factors. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 241:155-180.
- Mehmet Ciftci, Talat Güler, Bestami Dalkiliç and O. Nihat Ertas (2005). *International Journal of Poultry Science*; 4 (11): 851-855.
- 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.
- Navarro V, Villarreal M, L, Rojas G. y Lozoya X. (1996). Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *Journal of Ethnopharmacology*. 53(Suppl.3): 143-147
- Otero W, Gómez M, Castro D. Carcinogénesis gástrica. *Rev Col Gastroenterol* (2009); 24: 314-329.
- Otero W, Trespalacios AA, Otero E. *Helicobacter pylori*: Tratamiento actual. Un importante reto en gastroenterología. *Rev Col Gastroenterol* (2009); 24: 279-292.
- Ovesná Z, Vachálková A, Horváthová K. (2004). Taraxasterol and beta-sitosterol: New naturally compounds with chemoprotective/chemopreventive effects. *Neoplasma*. 51:407-414.
- 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.
- Pérez-Pérez GI, Rothenbacher D, & Brenner H. (2004). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 9:1-6.
- Pueyo A. M., M. P. Huarte, C. Jiménez. (1998). Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*. *ANALES Sis San Navarra* 21(2):9-17.
- Rivas TF, Hernández F. (2000). *Helicobacter pylori*: factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Revista Biomedica*. 11:187-205.
- Sánchez E., García D, Caridad Carballo y Maritza Crespo. (1996). *Mentha piperita*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 1(3):40-45.

- Sanjuro JL, Pérez J, Hidalgo H, Geyne A. (1999). Eficacia y seguridad entre diferentes dosis de nitazoxanida + subcitrate de bismuto + lansoprazol para la erradicación de *Helicobacter pylori*. *Revista Médica del Hospital General de México*. 14: 172-175.
- 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.
- 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.
- Seidel V.(2006). Initial and Bulk extracción. In: *Methods in Biotechnology, Vol.20, Natural Products Isolation, Second edition*; Sarker SD, Latif Z and Gray AI.(eds). Humana Press: Totowa, New Jersey, pp.27-46
- Sheldon, J.W., M.J. Balick and S.A. Laird, (1997). *Medicinal Plants: Can Utilization and Conservation Co-Exists*. New York Botanical Garden Press Department, New York, ISBN-13: 978-0893274061, pp: 104.
- 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.
- 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
- Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compounds, Seventh edition*. Wiley & Sons Inc: USA, pp.127-340

- Singh G.I.P. Kappoor, S.K. Pandey, U.K. Singh and R.K. Singh (2002). Studies on essential oils: Part 10; antibacterial activity of volatile oils of some species phytother Res.16: 680-682.
- Soliman K.M. and R.I. Badea (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. Food chem. Toxicol., 40:1669-1675.
- Soto-Blanco B, Sinhorini IL, Gorniak SL, Schumacher-Henrique B. (2002). Ricinus communis cake poisoning in a dog. Vet Hum Toxicol. Jun 44(3):155-6.
- 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.
- Tabanca N.E. Bedir, N. Kirmer, K.H. Baser, S.I. Khan, M.R. Jacob and I.A. Khan (2003). Antimicrobial compounds from Pimpinella species growing in Turkey. Planta Med., 69:933-938.
- Tacconelli E, Trumbarello M, Ventura G, Lucia MB, Caponera S, Cauda R. (1995) Drug resistant Pseudomonas aeruginosa bacteremia in HIV infected patients. J Chemoth; 7: 180-83
- 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).
- Torres, J. (1998). A community-based seroepidemiologic study of Helicobacter pylori infection in México. The Journal of Infectious Diseases. 178:1089-1094.
- Vogler B, Setzer WN. (2006). Caracterización of Natural products. In: Natural Products of Plants; Cseke L, Kirakosyan A, Kaufman P, Warber S, Duke J and Brielmann H.(eds.). Taylor& Francis Group: Boca Ratón, Florida, USA, PP.319-386.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Francisco Javier Hernández Vázquez

Candidato para el Grado de

Maestría en Ciencias con Acentuación en

Química de Productos Naturales

Tesis: ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE EXTRACTOS etanólicos de

Pinpinella anisum sobre *Helicobacter pylori*

Campo de estudios: Ciencias Biológicas / de la Salud

Datos personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, el día 28 de marzo de 1965, casado con Amanda del Rosario Dávalos Leal con 2 hijos Libertad y Jake Andrés.

Educación: Egresado de la carrera de Químico Bacteriológico Parasitólogo, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Experiencia profesional: He trabajado en varias empresas en áreas Administrativas, Farmacia, Laboratorio y Docencia.