

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



BIOPROSPECCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE LAS ESPECIES *Juglans regia*,
Rosmarinus officinalis, *Ricinus communis*, *Ganoderma lucidum*, *Citrus paradisi* y
Ruta graveolens SOBRE *Helicobacter pylori*

POR

JUANITA DENISS PERALES FLORES

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN
QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES.

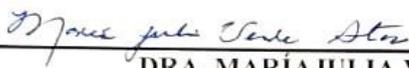
2024

BIOPROSPECCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE LAS ESPECIES
Juglans regia, Rosmarinus officinalis,
Ricinus communis, Ganoderma lucidum, Citrus paradisi y Ruta graveolens
SOBRE *Helicobacter pylori*.

Comité de Tesis



DR. RAMÓN GERARDO RODRÍGUEZ GARZA
Presidente



DRA. MARÍA JULIA VERDE STAR
Secretario



DRA. MARÍA PORFIRIA BARRÓN GONZÁLEZ
Vocal



DRA. RUTH AMELIA GARZA PADRÓN
Vocal



DR. JOSÉ EZEQUIEL VIVEROS VALDEZ
Vocal



DRA. KATIUSHKA ÁREVALO NIÑO
Subdirectora de Posgrado

SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

BIOPROSPECCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE LAS ESPECIES
Juglans regia, Rosmarinus officinalis,
Ricinus communis, Ganoderma lucidum, Citrus paradisi y Ruta graveolens
SOBRE *Helicobacter pylori*.

Dirección de Tesis



DR. RAMÓN GERARDO RODRÍGUEZ GARZA
Director

DERECHOS RESERVADOS© PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A mi hija Paula.

A mis padres y hermanos.

A mi esposo.

A toda mi familia y amigos.

En este trabajo se agradece de manera especial al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por su apoyo mediante la beca CVU No. 514967 otorgada para la realización de este trabajo de investigación.

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en especial al Departamento de Biología Celular y Genética, a los laboratorios de Micropropagación, Inmunología y de Biología celular donde se realizaron los ensayos que forman parte de este trabajo.

De manera especial, agradezco al Dr. Ramón G. Rodríguez Garza por apoyarme hasta conseguir mi meta, gracias infinitas, por todo tu apoyo, gracias por confiar en mí siempre, por proveerme de un espacio, materiales e ideas para siempre hacer mejor mi trabajo, por no limitarme, siempre te estaré agradecida.

A la Dra. Julia Verde Star por siempre tener esa sonrisa en su rostro y siempre estar dispuesta a guiar con amor y compartir su conocimiento y experiencias, por siempre tener ideas que ayudan a sumar a cada uno de los proyectos donde se involucra, gracias por su calidez humana y por haberme buscado un lugar comfortable donde poder realizar mi trabajo, la aprecio mucho.

A la Dra. Porfiria Barrón, gracias por siempre tener disposición de guiarme, aconsejarme y enriquecer mi trabajo de la forma en la que lo hizo, gracias por siempre estar dispuesta a prestarme sus equipos, materiales, por su pronta respuesta a mis peticiones y sus comentarios tan acertados.

A la Dra. Ruth Garza Padrón. Gracias por siempre escucharme, por tener siempre un buen comentario y por tu forma de siempre hacerme ver las cosas por el lado bueno, gracias por todo el tiempo que invertiste en revisar mis trabajos, por tus consejos de redacción, por darme tu apoyo cada vez que estaba en tus manos hacerlo, por recordarme que los pies siempre deben estar plantados en la tierra aunque nuestra mente y deseos estén muy arriba, gracia por tu sencillez y por ofrecer siempre más que sólo asesoría académica, por enseñarme que en el laboratorio no solo se trabaja sino que también se vive.

A la Dra. Eufemia Morales, gracias por hacerme sentir siempre en casa, por hacerme sentir parte no solo de un gran equipo de trabajo sino de una familia, gracias por hacerme vivir la experiencia de trabajar con un buen líder (que siempre había tenido buenos jefes, pero jamás un líder), usted sabe cuánto la quiero y admiro.

Al Dr. Jaime Treviño (f) Gracias por uno de los consejos de vida que jamás olvidaré.

Al Dr. Ezequiel Viveros gracias por todos tus comentarios que enriquecieron mi trabajo, por todas las veces que me estresaste por ponerme a pensar en el futuro, por tu amistad gracias.

A Enriqueta Monreal Cuevas, que siempre me apoyó con la explicación de técnicas y el uso de equipos en su laboratorio.

A los amigos que a lo largo de mi estancia en el posgrado aportaron de manera significativa tanto a mi formación profesional como personal, Lorena Lugo, Rolando y Mario, Diana Aceves, Mayra Sánchez, Luz Castellanos, Rodrigo Esparza, Karla Leal, Priscilla, Raymundo Pérez, Cynthia Torres, Rodrigo González, gracias por todas las explicaciones de técnicas, por apoyar con trámites, por acompañarme en mis horas laborales y mis ratos de ocio hicieron mucho más amena mi estancia en la FCB.

A todas aquellas personas que de una u otra manera me han dado su apoyo a través del tiempo para poder alcanzar esta meta, gracias de corazón.

ÍNDICE

1. RESUMEN	2
1.1 ABSTRACT	3
2.- INTRODUCCIÓN	4
3. ANTECEDENTES.....	6
3.1 <i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>).....	6
3.1.1 Descubrimiento e historia	6
3.1.2 Descripción y generalidades	6
3.1.3 Epidemiología.....	7
3.1.4 Diagnóstico y tratamiento.....	8
3.1.5 La fitoterapia.....	10
4. Actividad antibacteriana.....	11
5. Actividad anti- biofilm	12
6. Actividad antioxidante	13
7. Actividad tóxica	15
8. Especies vegetales en estudio.....	16
8.1 <i>Juglans regia</i>	16
8.2 <i>Ganoderma lucidum</i>	17
8.4 <i>Citrus paradisi</i>	18
8.5 <i>Rosmarinus officinalis</i>	19
8.6 <i>Ruta graveolens</i>	20
8.7 <i>Ricinus communis</i>	21
4. JUSTIFICACIÓN	23
5. HIPÓTESIS	24
6. OBJETIVOS	25
6.1 OBJETIVO GENERAL	25
6.2 OBJETIVOS PARTICULARES	25
7. METODOLOGÍA	26
7.1 Recolección e identificación del material vegetal	26
7.2 Obtención de los extractos.....	26
7.3 Rendimiento	27
7.4 Pruebas químicas de identificación parcial de metabolitos secundarios.....	27
7.4.1 Prueba del KMnO ₄	27
7.4.2 Grupo carbonilo	28

7.4.3 Oxidrilos fenólicos (taninos vegetales).....	28
7.4.4 Esteroles y triterpenos.....	28
7.4.5 Carbohidratos.....	28
7.4.6 Prueba de las cumarinas.....	28
7.4.7 Prueba de lactonas	28
7.4.8 Sesquiterpenlactonas.....	28
7.4.9 Flavonoides	29
7.4.10 Alcaloides	29
7.4.11 Saponinas	29
7.5 Prueba de toxicidad sobre <i>Artemia salina</i>	30
7.5.1 Incubación y eclosión de los huevecillos.....	30
7.5.2 Preparación y aplicación de los extractos	30
7.6 Actividad citotóxica sobre línea celular normal (linfocitos humanos).....	31
7.6.1 Obtención de sangre periférica	31
7.6.2 Aislamiento de linfocitos	31
7.6.3 Determinación de la viabilidad celular por exclusión con azul de tripano	32
7.6.4 Ensayo de toxicidad	32
7.7 Actividad antioxidante por el método de DPPH•	33
7.7.1 Curva de calibración	33
7.7.2 Determinación de actividad de los extractos	34
7.8 <i>Helicobacter pylori</i>	34
7.8.1 Obtención y mantenimiento de la cepa.....	34
7.8.2 Cinética de Crecimiento.....	35
7.9 Actividad antimicrobiana de extractos	37
7.9.1 Método de difusión en disco	37
7.10 Determinación de la concentración mínima inhibitoria utilizando la técnica de microdilución en caldo con el método de MTT.	38
7.10.1 Preparación de los extractos	38
7.10.2 Obtención de curva de antibiótico.....	38
7.10.3 Ensayo con extractos	39
7.11 Inhibición de la formación del biofilm	40
7.11.1 Preparación de extractos	40
7.11.2 Obtención del inóculo e inoculación de tubos.....	40
7.11.3 Adición de los extractos y controles	40
7.11.4 Incubación, lavado y lectura	40

8. RESULTADOS	41
8.1 Identificación del material vegetal y obtención de extractos	41
8.2 Tamizaje fitoquímico	41
8.3 Prueba de toxicidad sobre <i>Artemia salina</i>	42
8.4. Actividad citotóxica sobre línea celular normal (linfocitos humanos	44
8.5 Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH•.....	45
8.6 Pruebas microbiológicas.....	46
8.6.1 Acoplamiento y mantenimiento de <i>Helicobacter pylori</i>	46
8.6.2 Caracterización de <i>Helicobacter pylori</i>	47
8.6.3 Cinética de crecimiento de <i>Helicobacter pylori</i>	48
8.6.4 Caracterización molecular de <i>Helicobacter pylori</i>	49
8.6.5 Determinación de la actividad antibacteriana contra <i>Helicobacter pylori</i> por el método de difusión en disco	51
8.6.6 Actividad biológica de los extractos sobre la viabilidad celular de <i>Helicobacter pylori</i> mediante el ensayo de MTT	53
8.6.7 Efecto de los extractos sobre la inhibición de la formación de biofilm.....	56
9. DISCUSIÓN	60
9.1 Material vegetal y extracción	60
9.2 Identificación preliminar de grupos funcionales y metabolitos secundarios....	60
9.3 Actividad antioxidante por el método de DPPH•.....	60
9.4 Determinación de la toxicidad sobre <i>Artemia salina</i>	62
9.5 Citotoxicidad sobre linfocitos humanos	62
9.6 Actividad antibacteriana.....	63
9.7 Actividad sobre la formación de biofilm.....	64
10. CONCLUSIONES	64
11. PERSPECTIVAS	66
12. REFERENCIAS.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Juglans regia</i>	16
Tabla 2. Clasificación taxonómica <i>Ganoderma lucidum</i>	17
Tabla 3. Clasificación taxonómica <i>Citrus paradisi</i>	18
Tabla 4. Clasificación taxonómica de <i>Rosmarinus officinalis</i>	19
Tabla 5. Clasificación taxonómica de <i>Ruta graveolens</i>	20
Tabla 6. Clasificación taxonómica de <i>Ricinus communis</i>	21
Tabla 7. Identificación y rendimiento de extracción del material biológico.....	41
Tabla 8. Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos en estudio.....	42
Tabla 9. Resultado de la determinación de la dosis letal media (DL ₅₀) de cada uno de los extractos probados sobre <i>A. salina</i>	43
Tabla 10. Resultados de la actividad antioxidante de los extractos analizados expresados como CI ₅₀	46
Tabla 11. Diseño de oligonucleótidos para Priors del gen <i>Vac A</i>	49
Tabla 12. Parámetros del termociclador para la extracción de ADN de <i>H. pylori</i>	50
Tabla 13. Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos sobre <i>H. pylori</i>	51
Tabla 14. Resultados para la determinación de la concentración inhibitoria media (CMI) expresada como CI ₅₀ de la gentamicina sobre <i>H. pylori</i>	53
Tabla 15. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los Extractos sobre <i>Helicobacter pylori</i>	54
Tabla 16. Resultados del ensayo de inhibición de biofilm causada por el extracto EERo.....	56
Tabla 17. Resultados del ensayo de inhibición de biofilm causada por el extracto EERu.....	56
Tabla 18. Resultados del ensayo de inhibición de biofilm causada por el extracto EMCNd.....	57
Tabla 19. Resultados del ensayo de inhibición de biofilm causada por el extracto EMCN.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología característica de la bacteria <i>Helicobacter pylori</i>	7
Figura 2. Esquema de tratamiento dado a paciente mexicano diagnosticado con infección por <i>H. pylori</i>	9
Figura 3. Mortalidad producida por los extractos sobre los nauplios de <i>A. salina</i> ..	43
Figura 4. Efecto de los extractos sobre el desarrollo de linfocitos humanos	44
Figura 5. Comportamiento de los controles y extractos evaluados por la técnica de DPPH•	45
Figura 6. Resultado del ensayo cinética de crecimiento de <i>H. pylori</i> utilizando distintos volúmenes de inóculo.	49
Figura 7. Inhibición porcentual sobre el crecimiento de <i>H. pylori</i> causado por los extractos.	52
Figura 8. Reporte de resultados de los análisis de varianza y Tuckey para los extractos que presenta actividad inhibitoria contra <i>H. pylori</i>	55
Figura 9. Porcentaje de inhibición de la formación del biofilm.....	58

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Características macroscópicas del cultivo de <i>H. pylori</i> en medio ICC sólido y líquido.	47
Imagen 2. Tinción simple y tinción Gram de muestra de <i>H. pylori</i> en medio líquido	47
Imagen 3. Prueba bioquímica de ureasa.....	48
Imagen 4. Resultados del revelado del gel de agarosa.....	50
Imagen 5. Halos de inhibición formados por los extractos probados en cajas Petri con la técnica de difusión en disco.	52
Imagen 6. Resultado del ensayo de inhibición de biofilm.	59

1. RESUMEN

Helicobacter pylori es actualmente una afecciones gastrointestinales más comunes a nivel mundial, se calcula que más del 50% de la población mundial está infectada, estas infecciones pueden desencadenar desde gastritis y úlceras pépticas hasta cáncer de estómago, de aquí la importancia de contar con un buena detección temprana de la infección y un tratamiento que sea efectivo contra el patógeno, en México el tratamiento consta de mezclas de diversos antibióticos (amoxicilina, claritromicina, tetraciclina y metronidazol), inhibidores de bomba de protones y sales de bismuto con duración de 7 a 21 día. Los efectos secundarios causados por el tratamiento son unas de las principales causas de desapego por parte del paciente, así como un factor que aumenta la resistencia a antibióticos por parte del patógeno, por este motivo, buscar nuevos activos que posean actividad contra *H. pylori* es una demanda importante en el campo de la farmacéutica. Usar plantas para tratar enfermedades gastrointestinales es una práctica común en México, gran parte de la población utiliza la medicina tradicional como coadyuvantes e incluso como principal línea terapéutica en muchas ocasiones y en el caso de trastornos gastrointestinales no es la excepción, por este motivo en el presente trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana contra *H. pylori*, la inhibición de la formación de biofilm, y la capacidad antioxidante y citotóxica de los extractos de *Rosmarinus officinalis*, *Ricinus communis*, *Juglans regia*, *Ganoderma lucidum*, *Citrus paradisi* y *Ruta graveolens*, plantas comunes en la región noreste del país. Los extractos orgánicos de las especies vegetales fueron sometidos a diversas pruebas biológicas para determinar su acción antimicrobiana sobre *H. pylori* siendo los extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Ruta graveolens* los que pudieron inhibir el crecimiento de la bacteria, en cuanto a la capacidad para inhibir el crecimiento de biofilm, el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* fue el único extracto que presentó actividad, los extractos que poseen actividad antimicrobiana también demostraron poseer baja toxicidad sobre nauplios de *A. salina* y sobre linfocitos humanos; en cuanto a la actividad antioxidante el extracto con mejor resultado fue el extracto metanólico obtenido de la cáscara de *Juglans regia*, el cual mostró mejor actividad que la sustancia control utilizada en la prueba.

1.1 ABSTRACT

Helicobacter pylori infection is one of the most frequent gastrointestinal disorders in the world, it is estimated that about half of the population is infected by this bacteria, these infections can trigger from gastritis and peptic ulcers to stomach cancer hence the value of having good detection of infection and effective procedure against the pathogen, in México the procedure relies on mixtures of different antibiotics (amoxicillin, clarithromycin, tetracycline and metronidazole), proton pump inhibitors and bismuth salts lasting from 7 to 21 days. The side effects caused by the procedure are one of the main reasons for detachment by the patient, as well as an element that increases the pathogen's resistance to antibiotics, for which the investigation of new active principles that have activity against *H. pylori* is essential demand in the field of pharmaceuticals. The use of plants for the procedure of gastrointestinal pathologies is a common practice in México, an important part of the population uses classical medicine as an adjuvant and even as a primary therapeutic line in many situations and in the situation of gastrointestinal disorders it is not an exclusion. For this reason, the present work evaluated the antimicrobial activity against *H. pylori*, the inhibition of biofilm formation and the antioxidant and cytotoxic capacity of extracts from *Rosmarinus officinalis*, *Ricinus communis*, *Juglans regia*, *Ganoderma lucidum*, *Citrus paradisi* and *Ruta graveolens* plants from the Northeast region of the territory. Organic extracts of plant species were subjected to different biological tests to establish their antimicrobial action on *H. pylori*, and ethanol extracts from *Rosmarinus officinalis* and *Ruta graveolens* were those that could inhibit the growth of the bacteria, referring to their ability to inhibit bacterium. increased biofilm, the ethanol extract of *Rosmarinus officinalis* was the exclusive extract that showed activity, the extracts that have antimicrobial activity also showed low toxicity in *A. salina* nauplii and in human lymphocytes; Regarding the antioxidant activity, the extract with the best result was the methanol extract obtained from the bark of *Juglans regia*, which showed better activity than the control substance used in the test.

2.- INTRODUCCIÓN

Las infecciones causadas por *Helicobacter pylori*, son actualmente uno de los mayores problemas de salud pública ya que desencadenan en el desarrollo de afecciones como úlcera péptica y se estima que entre el 1-2% de los infectados, desarrolla cáncer de estómago, (Vale et al., 2014).

H. pylori, es una bacteria Gram negativa, flagelada, microaerofílica, de forma curva o de espiral, con una longitud de 2 a 4 μm y un ancho de 0.5 a 1 μm . Presenta flagelos unipolares (de 4 a 6) de 3 μm de largo, crece lentamente y su principal reservorio es el estómago de humanos, donde se le localiza principalmente en el epitelio gástrico, así como en el antro y píloro (Palacios-espinoza et al., 2014). Para poder sobrevivir en un ambiente tan ácido como lo es el estómago, dentro de sus factores de virulencia pueden destacarse la producción de ureasas, citotoxina vacuolizante y productos de genes de patogenicidad Cag A (Franklin Torres Jiménez & Carlos Torres Bayona, 2016).

Para poder tratar a pacientes infectados por *H. pylori*, se tienen diversas líneas de tratamiento. La primera línea conocida como “triple terapia” consiste en la combinación los antibióticos amoxicilina, claritromicina, tetraciclina y metronidazol más un inhibidor de bomba de protones, con duración de 7 a 14 días; el tratamiento de la segunda línea conocido como “terapia cuádruple” se utilizan 2 antibióticos distintos a los utilizados en el primer tratamiento más un inhibidor de acidez y esta vez se adicionan sales de bismuto con una duración de hasta 21 días. Si la infección persiste existe la tercera línea de tratamiento, la cual consiste en las quinolonas (levofloxacinas, moxifloxacina), rifabutina y furazolidona (Palacios-espinoza et al., 2014).

La erradicación y control de la infección son una tarea muy complicada debido a varios factores entre los que cabe mencionar el costo y la complejidad del tratamiento, el incumplimiento del mismo, así como los efectos adversos (náuseas, vómito, etc.) que sufren los pacientes que lo reciben, además de lo mencionado, la resistencia que la bacteria ha desarrollado contra diversos antibióticos hace aún más complicado e ineficiente el tratamiento.

“La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó su primera lista de «patógenos prioritarios» resistentes a los antibióticos, en ella se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana. El principal motivo para la creación de

dicha lista es guiar y promover la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos. Esta lista se divide en tres categorías: prioridad crítica, alta o media categorizando los patógenos según la urgencia en que se necesitan los nuevos antibióticos. *H. pylori* se encuentra en el tercer lugar de las listas de elevada prioridad. Ya que se ha desarrollado resistencia a claritromicina”. (OMS, 2017)

Desde tiempos muy antiguos se ha utilizado a los productos naturales, sobre todo a las plantas para el tratamiento de diversos padecimientos entre ellos las enfermedades gastrointestinales como la gastritis y úlceras pépticas. Las plantas pueden utilizarse completas o por partes (tallos, flores, hojas, frutos, raíz, etc.)(Vale et al., 2014). Existen publicaciones que describen específicamente la actividad antibiótica contra *H. pylori* de diversos productos naturales, por ejemplo: el ajo, brócoli té verde, vino tinto, regaliz, miel, propóleos, cítricos y algunos lactobacilos como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei Shirota* y *Bacillus subtilis*. (Ayala et al., 2014), canela, orégano, magnolia, polifenoles de cáscara de manzana, resveratrol (Vale et al., 2014). La actividad antibiótica contra *H. pylori* mostrada por las diversas especies, se ha visto relacionada directamente con la presencia de flavonoides, taninos, cumarinas, terpenos, quinolonas y algunos alcaloides.

3. ANTECEDENTES

3.1 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)

3.1.1 Descubrimiento e historia

Durante la década de los ochenta, Marshall y Warren realizaron en el Royal Perth Hospital de Australia a pacientes sometidos a endoscopia oral, donde utilizando tinción de plata de Warthin-Starry observaron la presencia de bacterias helicoidales en la mucosa gástrica de un alto porcentaje de pacientes con gastritis crónica y úlcera gástrica (Scheuer et al., 2002). Marshall sugirió que la bacteria podría pertenecer al género *Spirillum*, y finalmente se le dio el nombre formal de *Campylobacter pyloridis*, posteriormente en 1987 se corrige y aparece como *Campylobacter pylori* (Scheuer et al., 2002). Aunque esta nueva bacteria compartía con los miembros del grupo *Campylobacter* características morfológicas y bioquímicas, presentaba dos diferencias características: tenía un gran contenido de ureasa y era flagelada (Jones et al., 1985), posteriormente Goodwin realizó estudios moleculares que demostraron que esta bacteria era distinta y en 1989 se le denominó *Helicobacter pylori* (Goodwin et al., 1989).

3.1.2 Descripción y generalidades

El género *Helicobacter* pertenece a la subdivisión de Proteobacteria orden Campilobacterales, familia Helicobacteraceae, es genéticamente heterogénea, la característica puede deberse a la adaptación que tiene a las condiciones hostiles del estómago, así como a diferentes patrones de respuesta inmune, con longitud de 2 a 4 μm y de 0.5 a 1 μm de ancho, presenta características distintivas como su forma espiral aunque también presenta forma cocoide cuando ha permanecido *in vitro* por periodos prolongados o cuando ha sido sometido a tratamiento con antibióticos (cuando se encuentran en esta forma de coco, las células no pueden ser cultivadas *in vitro*). Posee de 2 a 7 flagelos unipolares con un largo de 3 μm de y alto contenido de ureasa (Kusters et al., 2006).

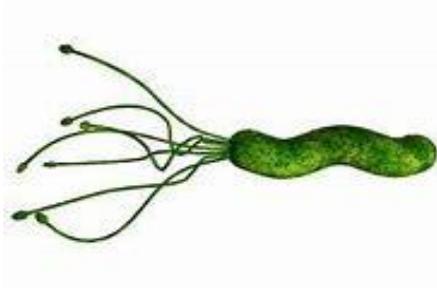


Figura 1. Morfología característica de *Helicobacter pylori*. Pueden apreciarse su forma espiral y los flagelos unipolares.

Helicobacter pylori es microaerofílica, con un crecimiento óptimo con niveles del O₂ de 2 a 5% y 5-10% de CO₂ y alta humedad. El crecimiento ocurre entre los 34 y 40°C con un óptimo de 37°C. Es considerada una bacteria neutrófila, puede sobrevivir durante breves periodos a pH menor a 4, su crecimiento ocurre a pH entre 5.5 y 8 siendo el 7 un pH óptimo. Para el cultivo de *H. pylori* en medio sólido se utiliza normalmente agares Brucella o Columbia suplementados con sangre de oveja o caballo, mientras que para su cultivo en medio líquido se utiliza ya sea Brucella, Muller-Hinton o Caldo de Infusión Cerebro Corazón, suplementado con 2- 10% suero de ternera o 0.2- 1 % de β -ciclodextrinas. *H. pylori* forma colonias de tamaño pequeño de color traslúcido, en el caso de cepas de referencia, un buen crecimiento transcurre de 1 a 3 días en incubación. Esta bacteria genera resultados positivos para las pruebas bioquímicas de ureasa, catalasa y oxidasa. Metaboliza únicamente glucosa y su principal fuente de amoníaco es a través de la actividad de la enzima ureasa, que además de funcionar como fuente nitrógeno es uno de los factores de virulencia que posee este microorganismo (Kusters et al., 2006).

3.1.3 Epidemiología

H. pylori presenta una alta prevalencia entre la población mundial, superando el 80%, y su transmisión ocurre principalmente de forma directa de persona a persona principalmente por vía oral-oral, fecal-oral o ambas (Kusters et al., 2006). Su única ubicación conocida es la mucosa gástrica humana, del 10 al 20% de los pacientes presenta el riesgo de padecer úlceras, mientras que 1 a 2% presenta riesgo de padecer cáncer gástrico distal, ocupando el segundo lugar a nivel mundial dentro de la mortalidad por cánceres, en México se encuentra entre las primeras causas de mortalidad debido a que los pacientes infectados tienen un riesgo elevado de

desarrollar úlceras y cáncer gástrico, por tal motivo la OMS la ha clasificado como un carcinógeno tipo I (Palacios-espinoza et al., 2014) y más recientemente ha sido incluida dentro de su lista global de prioridades de bacterias resistentes a antibióticos, clasificándola como patógeno de alta prioridad por su resistencia a la Claritromicina englobada en la misma prioridad que *Neisseria gonorrhoeae* resistente a antibióticos de tercera generación. (OMS, 2017).

3.1.4 Diagnóstico y tratamiento

Para el diagnosticar la presencia de *H. pylori* se cuenta con diversas pruebas las cuales se clasifican en invasivos, que son lo que utilizan espécimen gástrico para estudios histológicos y cultivos y los no invasivos, que son aquellos en los que se utilizan muestras perimetrales como sangre, orina, muestras de aliento, saliva, etc. en los que se detectan anticuerpos, antígenos o actividad de ureasa.

Para el tratamiento contra la infección por *H. pylori*. existen diversas líneas de que incluyen terapias triples y cuádruples con inhibidores de la bomba de protones y antibióticos. La primera línea de tratamiento consiste en una terapia triple la cual contiene un inhibidor de la bomba de protones (Omeprazol) combinado con 2 antibióticos (metronidazol, amoxicilina, tetraciclina o claritomicina) con una duración de 7 a 14 días, en la terapia cuádruple se utilizan 2 antibióticos diferentes a los utilizados en la primera terapia, el inhibidor de bomba de protones y la administración de sales de bismuto por hasta 21 días. Si el tratamiento falla, se pueden utilizar quinolonas, rifabutina y furazolidona como opciones adicionales (Palacios-espinoza et al., 2014).

ESQUEMA DE TRATAMIENTO DEL HELICOBACTER PYLORI
PRIMERA LÍNEA
<u>Terapia Triple con Claritromicina</u> Inhibidor de bomba + Claritromicina (500 mg) + Amoxicilina (1 g) Dos veces al día, 3 a 60 minutos antes del desayuno y la comida por 10 a 14 días.
<u>Terapia Cuádruple con Bismuto</u> Inhibidor de bomba (dos veces al día) + Bismuto (525 mg. cuatro veces al día) + Tetraciclina (500 mg. cuatro veces al día) + Metronidazol (500 mg. cuatro veces al día)
SEGUNDA LÍNEA
1. Terapia Triple reemplazando la claritromicina por el metronidazol, en poblaciones con resistencia al metronidazol menor a 40% 2. Terapia Cuádruple con Bismuto, cuando no haya sido usado como primera línea.
TERCERA LÍNEA O RESCATE
Se recomienda realizar estudio de cultivo y sensibilidad antibiótica.

Figura 2. Esquema de tratamiento dado a paciente mexicano diagnosticado con infección por *H. pylori*.

Debido a que los medicamentos utilizados para combatir la infección de *H. pylori* son utilizados también en la terapia contra otras bacterias y parásitos y aunado a los efectos secundarios como mareos, vómitos, diarrea, mal sabor de boca, salpullido, dolor de cabeza, malestar estomacal, estomatitis entre otras, así como la implicación económica que representa, en México su costo oscila entre 560 y 1260 pesos para la primer línea (Palacios-espinoza et al., 2014), muchos de los pacientes incumplen el tratamiento generando así la aparición de resistencia de algunas cepas contra los antibióticos administrados; Como consecuencia a la aparición de la resistencia a antibióticos comerciales sobre todo a la Claritromicina buscar alternativas a las terapias convencionales para la infección se ha vuelto una tarea imperante (Palacios-espinoza et al., 2014).

Dentro de las alternativas con las que se cuenta, el uso de los productos de origen natural, principalmente los derivados vegetales una potencial fuente de nuevos y efectivos agentes contra infecciones (Ayala et al., 2014).

Se ha demostrado que extractos de ajo, brotes de brócoli, té verde, vino tinto, regaliz, miel, propóleos (Ayala et al., 2014) canela, manzanilla, curcumina (Chatterjee et al., 2012), cáscara, cáscara verde, corteza y hojas de *Junghans regia Linn* (Taha & Al-wadaan, 2011) poseen actividad contra *H. pylori*.

3.1.5 La fitoterapia

Desde tiempos inmemoriales se han utilizado las plantas en la medicina tradicional para tratar un sin número de dolencias, entre ellas enfermedades gastrointestinales como dispepsia, gastritis y úlceras pépticas. Los antioxidantes naturales son considerados normalmente como seguros para la mayoría de los consumidores y usualmente no necesitan ser probados según diversas legislaciones, debido a que son reconocidos como sustancias GRAS (Chatterjee et al., 2012).

La fitoterapia también conocida como terapia herbal o terapia botánica consiste en el uso de plantas o extractos de éstas con fines medicinales, los productos herbales abarcan las materias primas sin procesar o procesadas derivadas de hojas, flores, corteza, raíces, semillas, etc.; Según diversas legislaciones las “hierbas” se consideran como suplemento alimenticio y pueden ser comercializadas sin la necesidad de una previa demostración de su eficacia y toxicidad. Los orígenes de la fitoterapia se basan en el conocimiento empírico por lo que los riesgos y beneficios de tratamientos utilizando hierbas aún son incompletos, complejos y confusos, de ahí es donde nace la necesidad de ensayos clínicos controlados que evidencien la eficacia, el modo de acción y potencial de la medicina herbal para poder llevar a cabo la implementación de legislaciones que permitan para maximizar su uso y aplicación con seguridad y calidad (Vale et al., 2014).

Actualmente la medicina tradicional donde se utilizan las plantas sigue teniendo un rol importante y de respeto, sobre todo en los países con economías emergentes donde el acceso a servicios médicos es limitado (Shahid et al., 2009) además, la búsqueda de alternativas a los tratamientos existentes para bacterias que ya muestran resistencia ha incrementado la demanda e interés en productos farmacéuticos derivados de productos naturales principalmente de plantas.

Los antimicrobianos basados en plantas tienen un enorme potencial terapéutico y representan una vasta fuente de medicina sin explotar ya que son efectivos en el tratamiento de enfermedades infecciosas mientras que al mismo tiempo mitigan muchos de los efectos secundarios asociados con los tratamientos antimicrobianos sintéticos (Shahid et al., 2009).

Está bien documentado que los productos naturales desempeñaron papeles críticos en el desarrollo moderno de fármacos, especialmente para agentes antibacterianos y antitumorales. Aunque los productos sintéticos tengan mayor popularidad debido a sus menores costos de producción, efectividad en el tiempo, facilidad en el control de calidad, estricta regulación y efectos rápidos, esto no ha hecho que su seguridad y eficacia sean cuestionables, lo que sigue dando como resultado una dependencia de los productos naturales sobre todo en población de los países en vías de desarrollo, debido a su eficacia; A pesar de la preocupación actual por la química sintética como vehículo para descubrir y fabricar fármacos, la contribución de las plantas al tratamiento y la prevención de enfermedades sigue siendo imprescindible. Incluso en la actualidad de los 252 medicamentos considerados básicos y esenciales por la OMS, el 11% seguían siendo de origen vegetal exclusivamente. Las plantas especialmente aquellas con usos etnofarmacológicos han sido las principales fuentes de para el descubrimiento temprano de fármacos (Veeresham, 2012).

La estrategia más utilizada comúnmente para estudiar los productos de origen natural consiste en realizar tamizaje de actividades biológicas, para lo cual es crucial el empleo de bioensayos que permitan monitorear la actividad que muestra el extracto, para dicho fin se utilizan pruebas *in vitro*, debido a la rapidez y bajo costo en comparación con sistemas *in vivo* (Bhakuni & Rawat, 2005).

4. Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de plantas se determina utilizando métodos *in vitro*, entre los más básicos y conocidos están el método de difusión en caldo, placa, así como la dilución en agar.

La prueba de difusión en discos se desarrolló en 1940, es la prueba oficial de susceptibilidad antimicrobiana utilizada por excelencia, actualmente los estándares aprobados son publicados por la Clínica y el Laboratorio Standards Institute (CLSI) para pruebas de bacterias y levaduras, aunque presenta limitaciones ya que no todas las bacterias exigentes se pueden probar con precisión por esta metodología.

Para realizar este procedimiento se utilizan inóculos estandarizados del microorganismo a prueba en placas de agar, se utiliza discos de papel con diámetro de 6 mm impregnados con el compuesto de prueba a una concentración deseada, estos

son colocados en la superficie del agar y las placas Petri se incuban en condiciones adecuadas para cada bacteria, la técnica se fundamenta en que por difusión el agente antimicrobiano penetra en el agar inhibiendo la germinación/crecimiento del microorganismo; después de la incubación adecuada se miden los diámetros de inhibición de crecimiento generados por el agente antimicrobiano, generando de esta forma resultados cualitativos donde posteriormente se puede categorizar a las bacterias como susceptible, intermedio o resistente. De las ventajas del ensayo pueden destacarse que es simple, económico, aplicable para probar gran cantidad de microorganismos y agentes antimicrobianos, reproducible y de fácil interpretación así mismo se ha podido establecer una buena correlación entre los datos *in vitro* e *in vivo*, motivo por el cual se ha convertido en una técnica popular para la detección de compuestos con capacidad antimicrobiana (Balouiri et al., 2016).

Para determinar la concentración mínima inhibitoria, los métodos de dilución son los métodos más apropiados, miden la actividad antimicrobiana *in vitro* contra hongos y bacterias de forma cuantitativa y su valor señala la concentración más baja a la cual el agente antimicrobiano estudiado inhibe de forma visual el crecimiento del microorganismo probado, generalmente se expresa en mg/ mL o mg/L. Hay muchas pautas aprobadas para prueba de susceptibilidad antimicrobiana por dilución las más reconocidas son provistas por el Comité de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) y CLSI (Balouiri et al., 2016).

5. Actividad anti- biofilm

El término biofilm hace referencia complejos ecosistemas bacterianos, que se adhieren entre sí y/o a la pared de la interfaz con la que interactúan. Las bacterias están inmersas en una matriz de exopolisacárido excretada por ellas mismas que se extiende a lo largo y ancho para formar micro colonias, su apariencia es de agregados bacterianos no unidos a la superficie y forman una interfaz aire-líquido. El uso de la microscopia electrónica para su análisis ha puesto al descubierto que la formación del biofilm se da por el acomodo primario de estructuras cocoidales apiladas en varias capas gruesas con canales que permiten el flujo de nutrientes entre las diferentes capas, cuando el biofilm ha sido formado, la bacteria sigue en estado viable pero no cultivable. Para llevar a cabo la colonización una vez formado el biofilm, la capa debe ser cortada

permitiendo así el desplazamiento y la multiplicación y de la bacteria, factor que permite la recolonización, recaída y por lo tanto la infección crónica. (Pattiyathanee et al., 2009).

Utilizar productos naturales para la inhibición de la formación del biofilm ya ha sido probada, siendo efectiva para *Candida albicans* (Shuford et al., 2005) y *Staphylococcus aureus* (Quave et al., 2009). La resistencia a antibióticos generada por *H. pylori* es atribuible no solo a factores genéticos, sino también a la formación de biofilm, el cual es usado por la bacteria como una barrera para superar el esteres ambiental y protegerse así mismo; Estas condiciones permiten a la bacteria entrar en estado VBNC donde la bacteria es altamente tolerante a los antimicrobianos y que cuando la concentración del el antibiótico se reduce, puede resucitar y repoblar la biopelícula y causando las recaídas de la infección.(Pattiyathanee et al., 2009, Percival & Suleman, 2014).

6. Actividad antioxidante

Las plantas medicinales de uso tradicional y alimentos como frutas, verduras y especias son fuentes primarias de antioxidantes exógenos. Sustancias como polifenoles (ácidos fenólicos, flavonoides,etc), carotenoides (xantofilas y carotenos) y vitaminas (vitamina E y C) son los antioxidantes encontrados con mayor frecuencia. En general, los polifenoles y carotenoides muestran efectos biológicos diversos entre los que destacan propiedades antibacterianas, anticancerígenas, antiinflamatorias, entre otras (Swallah MS et al., 2020).

Teniendo en cuenta sus importantes efectos sobre la salud es de suma importancia la búsqueda de métodos de extracción eficaces de antioxidantes naturales, así como la su adecuada evaluación. La extracción de los metabolitos es primordial para el estudio de los antioxidantes derivados de plantas, la eficiencia de la extracción de los compuestos dependerá de factores variados como el tipo de solvente y la técnica utilizados para la extracción, así como la temperatura y pH. De los factores como mayor influencia en la extracción se encuentra la selección de solventes, la cual se basa en la polaridad de los compuestos antioxidantes que se desea extraer y la naturaleza química de estos (Jones WP y Kinghorn AD., 2012). La mayoría de los fenólicos, flavonoides y antocianinas son antioxidantes hidrosolubles. Los disolventes y medios polares tales

como agua, etanol, metanol, propanol, acetona y sus mezclas acuosas, son ampliamente utilizados para la extracción (Zhang QW, et.al.,2018).

Evaluar la capacidad antioxidante de los productos naturales se ha considerado una base para la clasificación las plantas antioxidantes y recomendando los mejores alimentos antioxidantes para el consumo. La evaluación de la actividad antioxidante de plantas medicinales y algunos alimentos se puede realizar utilizando ensayos que se clasifican básicamente en dos tipos según el mecanismo utilizado para medir la actividad, siendo estos los ensayos SET (de transferencia de electrones individuales) y ensayos HAT (de transferencia de átomos de hidrógeno). Los métodos SET determinan la capacidad reducir los compuestos cargados en una sustancia antioxidante mediante la transferencia de electrones, comportamiento típico de los radicales y iones metálicos. Este tipo de ensayos se basa en la capacidad de neutralizar los radicales libres estables, como lo son las pruebas de capacidad antioxidante de equivalencia Trolox (TEAC), el ensayo DPPH y el ensayo regente Folin-Ciocalteu (Kumar, R., et.al., 2019) (Munteanu IG y Apetrei C. 2021).

Como uno de los pocos radicales de nitrógeno orgánico estables, el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) se usa para analizar la actividad antioxidante. El DPPH• posee un color morado oscuro y tiene un máximo de absorción UV-Vis a 515 nm. Los compuestos de prueba (antioxidantes) reducen el radical DPPH a DPPH-H y el color de la solución se desvanece. La capacidad reductora se puede evaluar midiendo la disminución de su absorbancia. Al final, los resultados se muestran por EC₅₀, es decir, la cantidad necesaria de antioxidante para disminuir la concentración inicial de DPPH en un 50%. El ensayo DPPH es ampliamente utilizado en la detección de capacidad antioxidante de jugos o extractos de frutas y vegetales, ya que es fácil, rápido y solo requiere un espectrofotómetro UV-vis para probar. Comparado con el ensayo ABTS, el radical DPPH está disponible comercialmente y no tiene que generarse antes del ensayo, como ABTS^{•+}. Sin embargo, la aplicación del ensayo DPPH está limitada por el estrecho rango de reacción lineal, además, sustancias antioxidantes que poseen fuerte actividad de peroxidación lipídica pueden reaccionar lentamente o incluso ser inertes al DPPH (Huang, Y., et.al.,2005).

7. Actividad tóxica

Dentro de los ensayos más populares para determinar la toxicidad se encuentra la prueba de letalidad sobre nauplios de *Artemia spp.*, prueba donde se evalúa la capacidad para producir mortalidad por parte de una sustancia, este ensayo puede correlacionarse con otros ensayos *in vitro* prediciendo así la habilidad para producir la mortalidad en células cancerígenas cultivadas *in vitro*, actividad insecticida entre otros efectos farmacológicos.

Se encuentran distribuidas ampliamente a nivel mundial, se les encuentra en aguas de alta concentración salina, se desarrollan en temperaturas de 6 y 35° C, se alimentan de algas y bacterias, Los huevos pueden formar quistes y permanecer en esta forma por un año o más y cuando eclosiona llegan a medir hasta 1 mm, debido a que forman quistes estables, se encuentra disponible comercialmente sirviendo de alimento para peces y crustáceos.

Esta técnica es comúnmente utilizada como prueba preliminar para evaluar la toxicidad de diversas sustancias, como: arsénico, cobre, nitrato de plata, permanganato, antibióticos, nanomateriales, pesticidas y una gran variedad de compuestos activos incluyendo compuestos fenólicos (Libralato, 2014), dentro de las ventajas de la evaluación de la toxicidad contra *Artemia salina*, se puede mencionar que es una técnica reproducible, rápida, económica y además, el organismo es altamente adaptable a condiciones de luz, temperatura y dieta en laboratorio (Libralato, 2014; Libralato et al., 2016).

8. Especies vegetales en estudio

8.1 *Juglans regia*

	Taxonomía	
	Reino:	Plantae
	División:	Magnoliophyta
	Clase:	Magnoliopsida
	Orden:	Fagales
	Familia:	Juglandaceae
	Subfamilia:	Juglandoideae
	Género:	<i>Juglans</i>
	Especie:	<i>Juglans regia</i>

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Juglans regia*

Juglans regia L., conocido comúnmente como nogal, puede alcanzar alturas de 15 a 30 metros, su diámetro que oscilan entre 1 y 1.5 m. Es caducifolio y tiene su origen en Europa del este y Asia, especialmente en Persia. Su período de floración ocurre entre marzo y mayo, mientras que la maduración de los frutos ocurre de septiembre a noviembre. En México, se distribuye en los estados de Nuevo León, Tamaulipas, Baja California, Coahuila, Sonora, San Luis Potosí, Jalisco, Puebla, Tlaxcala, , Durango Hidalgo, Estado de México y (CONAFORT, n.d.)

En diversas culturas se reconoce como planta medicinal con usos en el tratamiento de diarrea, sinusitis, dolor de estómago, artritis, asma, enfermedades endócrinas varias, anorexia, problemas de tiroides, diversos tipos de cáncer e infecciones (Taha & Al-wadaan, 2011). Se ha demostrado que diversas partes del nogal particularmente de la corteza, hojas, fruto e incluso la cáscara verde poseen actividad antimicrobiana (Oliveira et al., 2008). Mas específicamente, extractos acuosos y orgánicos de hojas, corteza, fruto y cáscaras verdes han demostrado tener actividad contra bacterias como *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *S. epidermis*, *M.luteus* y *S.Typhimurium*, utilizando métodos de estría, difusión en disco y azul de alamar en microplaca. *J. Regia* posee actividad contra algunas cepas de *Helicobacter pylori*, utilizando extracciones en las que se utiliza agua, metanol, éter dietílico y benceno (Taha & Al-wadaan, 2011).

8.2 *Ganoderma lucidum*

	Taxonomía	
	Reino:	Fungi
	División:	Basidiomycota
	Clase:	Agaricomycetes
	Orden:	Polyporales
	Familia:	Ganodermataceae
	Subfamilia:	
	Género:	<i>Ganoderma</i>
	Especie:	<i>G.lucidum</i> (Curtis) P.Karst.

Tabla 2. Clasificación taxonómica *Ganoderma lucidum*.

Perteneciente al reino Fungi, división Basidiomycota, clase Homobasidiomycetes, orden Aphyllophorales, familia Polyporaceae (Ganodermataceae). Normalmente crece en la madera como una red de tubos conocida como micelio, con el tiempo degrada la madera y producen su cuerpo fructífero, prospera en condiciones de calor y humedad y normalmente se le encuentra en zonas subtropicales y tropicales. No es considerado como un hongo comestible debido a que su textura es normalmente gruesa y leñosa, aunque no se considere como una especie comestible, en el mercado pueden encontrarse diversos productos provenientes de esta especie como cápsulas y tabletas que contienen micelio, extractos del micelio o cuerpo fructífero, cervezas con *Ganoderma*, así como tónicos capilares.

Es utilizada en la medicina tradicional oriental en forma de té y diversos tipos de suplementos alimenticios para promover la salud. Se ha identificado que de los principales compuestos bioactivos de este género se encuentran los polisacáridos y triterpenos, que han demostrado tener actividad anticancerígena. (Da et al., 2011).

Extractos etanólicos de *G. lucidum* han demostrado tener actividad contra diferentes tipos de cáncer incluido el de estómago. Dentro de los principales componentes de extractos hexánicos de *G. lucidum* se encuentran flavonoides, terpenos, fenoles y alcaloides que han demostrado poseer actividades anticancerígenas en ensayos *in vitro*. (Patel et al. 2012).

8.4 *Citrus paradisi*

	Taxonomía	
	Reino:	Plantae
	División:	Fanerógamas
	Clase:	Angiospermas
	Orden:	Geraniales
	Familia:	Rutaceae
	Subfamilia:	Citroideae
	Género:	Citrus
	Especie	<i>C. paradisi</i>

Tabla 3. Clasificación taxonómica *Citrus paradisi*

Existen reportes de la actividad antibacteriana de extractos de *C. paradisi*, atribuibles a la presencia de flavonoides como la naringina y naringenina. Se ha demostrado que la toronja y flavonoides provenientes de ella (naringina y naringenina) poseen propiedades antimicrobianas contra *Salmonella* entérica y *E. coli* O157:H7. Se han observado que la combinación de flavonoides de la toronja junto con un pH bajo disminuye la virulencia de bacterias enteropatógenas (Yin et al., 2012). Se ha estudiado la actividad antimicrobiana, así como anti-ureasa contra *H. pylori* de algunos flavonoides usados comúnmente entre ellos la naringenina y hesperetina (Moon et al., 2013). Flavonoides como naringina y naringenina están ampliamente distribuidos en los cítricos, siendo *Citrus sinensi* la especie que más abundancia presenta de éstos presentando alrededor de 0.20-0.40 g/100 g mediante extracción por hidrodestilación. Diversos son los usos y actividades medicinales que se le ha conferido a la toronja entre ellos antiinflamatorio, antiaterogénico, antibacterial contra *A. fumigatus*, *Salmonella enteritidis*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, *M. luteus* y *Candida albicans* así mismo ha presentado actividad apoptótica antidiabetes así como hepatoprotectora (Gupta V & Kohli K, 2011).

8.5 *Rosmarinus officinalis*

	Taxonomía	
	Reino:	Plantae
	División:	Magnoliophyta
	Clase:	Magnoliopsida
	Orden:	Lamiales
	Familia:	Lamiaceae
	Subfamilia:	Nepetoideae
	Género:	<i>Rosmarinus</i>
	Especie:	<i>Rosmarinus officinalis</i>

Tabla 4. Clasificación taxonómica de *Rosmarinus officinalis*

Rosmarinus officinalis, comúnmente conocida como Romero, es una planta que desde tiempos ancestrales se ha utilizado con fines alimenticios y medicinales; Diversos estudios han descrito a diversos tipos de extractos, así como a sus aceites esenciales como antioxidantes, antimicrobianos, antimicóticos, incluso anticancerígenos. Dentro de los compuestos ya aislados de esta especie se reportan compuestos de la familias de los triterpenos, flavonoles, diterpenos, esteroides; Según la parte utilizada de la planta puede haber variaciones en la composición química, en los aceites esenciales de la planta se ha reportado la presencia de forma común de: alcanfor, linalol, verbinol, carnosol, rosmanol; los ácidos más frecuente mente reportados son el vanílico, caféico, clorogénico, rosmarínico, carnósico, ursólico, entre otros (Tschiggerl & Bucar, 2010). “De los compuestos reportados en hojas se destacan ácido rosmarínico y rosmaricina así como el ácido carnósico que se caracteriza por ser inestable, su degradación se da por incremento de la temperatura y exposición a la luz; en presencia de oxígeno puede oxidarse para formar carnosol, rosmanol, epirosmanol y 7- metil-epirosmanol” (Djeddi & Skocibusic, 2007; P. Salehi et al., 2007). Dentro de sus usos etnofarmacológicos de esta especie se reportan: actividad antimicrobiana, antiparasitaria, antiviral, estimulador del sistema nervioso central, mejorador de memoria, antiinflamatorio, diurético, alivia cólicos menstruales, anticonceptivo, tónico cardiovascular y dermoprotector.

8.6 *Ruta graveolens*

	Taxonomía	
	Reino:	Plantae
	División:	Tracheophyta
	Clase:	Magnoliopsida
	Orden:	Sapindales
	Familia:	Rutaceae
	Subfamilia:	
	Género:	<i>Ruta</i>
	Especie:	<i>Ruta graveolens</i>

Tabla 5. Clasificación taxonómica de *Ruta graveolens*

Es un semi arbusto perenne, con alturas de 0.6 a 0.9 m, crece en altitudes de 10 y hasta 2750 msn, puede encontrarse en gran variedad de climas desde templado hasta cálido (Asgarpanah, J., & Khoshkam, R. 2012). Se caracteriza por la ausencia de tricomas (pelos) glandulares, posee hojas carnosas de color verdeazulado, las flores son amarillas de cinco pétalos lisos u ondulados sin fleco (característica típica de otras especies del género), el periciclo del tallo muestra la presencia de pequeñas hebras aisladas o haces de esclerénquima, mientras que los vasos se disponen en filas radiales menos pronunciadas. Las células de la médula son homogéneas y se observan abundantes cristales agrupados de calcio en la corteza y/o la médula. Otro rasgo distintivo de la especie es el arco de haces separados en el pecíolo, característica única dentro de la familia Rutaceae. Además, los estomas están presentes en ambas superficies de la hoja y se observa la presencia de hipodermis, un tejido que proporciona soporte y protección adicionales. Estas características anatómicas son esenciales para la identificación precisa de esta especie botánica (Kannan R, y Babu UV.2012).

En la medicina tradicional ha sido utilizada en el tratamiento de desórdenes menstruales, problemas de piel, cólicos, dolores de oído y cabeza; farmacológicamente ha demostrado ser antihelmíntico, abortivo, antiparasitario, antiinflamatorio, antidiarreico, repelente, anti ulcerativo, antidiabético, así como antibacteriano. (França

Orlanda y Nascimento, 2015). Dentro de los compuestos reportados para esta especie se encuentran cumarinas, alcaloides, aceites volátiles, flavonoides y ácidos fenólicos (Malik, S. et.al., 2017), entre otros, los cuales pueden estar distribuidos en toda la planta, pero se encuentran de manera más predominante en las hojas de esta.

8.7 *Ricinus communis*

	Taxonomía	
	Reino:	Plantae
	División:	Magnoliophyta
	Clase:	Magnoliopsida
	Orden:	Malpighiales
	Familia:	Euphorbiaceae
	Subfamilia:	Acalyphoideae
	Género:	<i>Ricinus</i>
	Especie:	<i>Ricinus communis</i> L., 1753

Tabla 6. Clasificación taxonómica de *Ricinus communis*

Es un arbusto perenne que pertenece a la familia Euphorbiaceae y a la subfamilia Acalyphoideae, es originaria de África y actualmente se cultiva en muchas regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo (Rakesh, M.R.et.al., 2011)

Es una planta herbácea - arbustiva, puede variar en color desde verde claro hasta azul-grisáceo. Sus tallos son ramificados y las hojas son grandes, palmatolobadas y profundamente dentadas, con glándulas entre la lámina y el peciolo. Posee flores masculinas y femeninas que se diferencian por su longitud. Los ovarios están cubiertos por tubérculos blandos que se asemejan a pelos gruesos. El fruto es encapsulado en espacios con espinas. Las semillas son aplanadas con longitud de 10 a 17 mm de largo, lisas, brillantes y de color café y gris, con jaspeado. Es importante tener en cuenta que el ricino es una planta tóxica y que sus semillas contienen ricina, una sustancia extremadamente venenosa, por lo que se debe manipular con precaución (Lifeder 2023).

En México para tratar varia dolencias y padecimientos ejemplo, se preparan infusiones de las hojas en agua caliente para reducir la fiebre, y se emplean cataplasmas hechas con hojas mezcladas con vinagre para aliviar dolores de cabeza. Además, se aplican hojas calentadas en brasas en el vientre y las extremidades para reducir la inflamación.

Las semillas se utilizan como purgantes y para tratar afecciones como la diabetes, la acidez estomacal, la diarrea, la disentería y el estreñimiento. También se emplea en el tratamiento de diversas enfermedades respiratorias (Vibrans H. 2009).

Se ha reportado que puede contener metabolitos como aldehídos, alcanos, ácidos orgánicos como el elágico, cítrico, málico, fumárico entre otros, flavonoides como quercetina y sus derivados, triterpenos, aceites esenciales como α - pineno, alcanfor, canfeno, ácidos grasos como el oléico, palmítico, aminoácidos como el triptófano, valina y fenilalanina, estos compuestos se encuentran distribuidos de forma diferente en las diversas partes de la planta variando también en concentración, el único metabolito que se encuentra distribuido ampliamente en todas las partes de la planta es el ricino, conocido como característica típica de la planta (Singh, R., y Khoshkam, G. 2015).

En la medicina tradicional ha sido utilizada como laxante, contra la artritis, para aliviar la constipación y estreñimiento, resfriados, callos, verrugas y tumores de glándula mamaria. Actualmente se ha reportado el uso de extractos y diferentes preparaciones de la planta por poseer actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticonceptiva, y, citotóxica, antibacteriana contra *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *K. pneumonia*, *P. vulgaris* y antifúngica contra *Aspergillus flavus* y *A. fumigatu* (Singh, R., y Khoshkam, G. 2015).

4. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones por *Helicobacter pylori* representan un desafío significativo para la salud pública a nivel mundial, especialmente debido a la creciente resistencia a los antibióticos, como la claritromicina, utilizada para su tratamiento. Ante tal circunstancia la necesidad de buscar nuevos antibióticos es ahora una prioridad apremiante y en este contexto, la etnobotánica, la fitoquímica y la medicina tradicional emergen como áreas de investigación prometedoras para encontrar compuestos con actividad antimicrobiana.

México, en su rica diversidad vegetal y extenso conocimiento y uso de plantas medicinales se presenta como lugar idóneo para realizar investigación en el campo y cubrir la demanda actual en el tema de nuevos antimicrobianos.

En este estudio se evaluaron seis especies utilizadas comúnmente en la medicina tradicional mexicana para evaluar actividades como: la capacidad antioxidante, la actividad antimicrobiana sobre *H. pylori* y su capacidad para inhibir la formación de su biofilm; Además se realizó evaluación preliminar de la toxicidad de los extractos sobre organismos modelo como los nauplios de *Artemia salina* y linfocitos humanos.

Los resultados del estudio proporcionan información valiosa preliminar sobre el potencial uso de estas plantas, como fuentes de nuevos compuestos con propiedades antibacterianas; sin embargo, se necesita de más investigaciones que apoyen en la validación de estos hallazgos y así poder identificar y comprender mejor los mecanismos de acción de dichos compuestos.

En última instancia el presente trabajo podría contribuir en la generación de nuevas alternativas para el tratamiento de infecciones por *H. pylori* ofreciendo otras opciones alternas a la obtención de antibióticos convencionales y atendiendo así el llamado que hace la OMS ante el apremiante problema de salud mundial que representa la generación de resistencia a los antibióticos actuales.

5. HIPÓTESIS

1. Los extractos obtenidos de las especies *Juglans regia*, *Rosmarinus officinalis*, *Ricinus communis*, *Ganoderma lucidum*, *Citrus paradisi* y *Ruta graveolens* poseen compuestos activos con efecto sobre *Helicobacter pylori*, además de presentar baja o nula toxicidad.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto antimicrobiano sobre *Helicobacter pylori* y la toxicidad de los extractos de *Juglans regia*, *Rosmarinus officinalis*, *Ricinus communis*, *Ganoderma lucidum*, *Citrus paradisi* y *Ruta graveolens*.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Recolección e identificación de material vegetal.
- Obtención de los extractos por maceración asistida por sonicación.
- Determinación parcial de grupos funcionales y metabolitos secundarios presentes en los extractos.
- Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos utilizando el método de DPPH.
- Determinar el efecto tóxico de extractos sobre nauplios de *Artemia salina*
- Determinar *in vitro* el efecto tóxico de extractos sobre línea celular normal de linfocitos humanos.
- Acoplamiento y caracterización (macroscópica, microscópica, bioquímica y molecular) de la cepa de *Helicobacter pylori*.
- Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos utilizando el método de difusión en disco.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los extractos con actividad sobre *H. pylori*.
- Determinar la capacidad de los extractos para inhibir *in vitro* la formación del biofilm.

7. METODOLOGÍA

7.1 Recolección e identificación del material vegetal

El material vegetal utilizado fue colectado en el periodo de Agosto- Octubre 2015, las partes aéreas de las plantas identificadas comúnmente como Higuierilla (*Ricinus communis*), Ruda (*Ruta graveolens*) y Romero (*Rosmarinus officinalis*) se colectaron en terrenos particulares del municipio de Iturbide Nuevo León, mientras que el cuerpo fructífero del hongo Ganoderma (*Ganoderma lucidum*) fue colectado en el municipio de Juárez Nuevo León, siguiendo indicaciones de la NOM-007-SEMARNAT-1997 ((Norma Oficial Mexicana Nom-007-Recnat-1997, n.d.) así mismo se colectaron cáscaras de nuez (*Juglans regia*) y toronja (*Citrus paradisi*), las cuales fueron obtenidas de una empresa localizada en el municipio de Linares Nuevo León.

7.2 Obtención de los extractos

El material vegetal colectado fue primeramente lavado con agua y jabón para eliminar las partículas de polvo y materia extraña que pudieran contener.

El material limpio, se troceó, se acomodó en charolas y se colocó en estufa Yamato DX402C por 7 días a 40°C para eliminar el exceso de humedad, una vez seco se procedió a moler con ayuda de una licuadora hasta obtener un polvo fino el cual se colocó en bolsas con cierre hermético y se conservó en un lugar seco, fresco y oscuro hasta su uso.

De las especies Ruda y Romero se utilizaron las hojas y tallos (partes aéreas); de la Nuez y Toronja se utilizó únicamente la cáscara; del *Ganoderma* se utilizó el cuerpo fructífero.

Para obtener los extractos se llevó a cabo la técnica de maceración asistida por sonicación para la cual se utilizó un sonicador BRANSON 3800 en donde se colocaron matraces de vidrio conteniendo 20 g del material vegetal y 250 mL de etanol para la extracción de romero y ruda, metanol para *Ganoderma* y las cáscaras de toronja y nuez y hexano para el romero; La sonicación se realizó durante, 60 min en a temperatura ambiente, terminado el periodo de el tiempo fueron filtrados con ayuda de papel filtro

Wathman N° 1 para quitar todos los residuos y partículas de gran tamaño posteriormente fueron llevados a sequedad con ayuda de un rotaevaporador Büchi a 40° C/ 100 rpm. Los extractos secos se colocaron en viales ámbar y en refrigeración hasta su uso.

Una parte del extracto metanólico de cáscara de nuez fue sometido a un lavado con hexano, para lo cual se tomaron 1.0135g del EMCN, se disolvieron en 50 mL de metanol y se colocaron en un embudo de separación forrado con aluminio y que contenía 50 mL de hexano el cual se agitó vigorosamente y se dejó reposar por 1 hora, terminado este tiempo se pudo observar la separación de 2 fases y un precipitado, el cual fue recuperado y se lavó con hexano 3 veces más; El precipitado recuperado se colocó en un vial y se colocó en la estufa a 40° C toda la noche.

7.3 Rendimiento

Una vez seos los extractos se tomaron los pesos y obtener el rendimiento de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \frac{(\text{Peso del extracto recuperado}) * 100}{\text{Peso del material vegetal utilizado para la extracción}}$$

7.4 Pruebas químicas de identificación parcial de metabolitos secundarios.

Para llevarla a cabo se emplearon pruebas o técnicas simples, rápidas y selectivas utilizando metodología de Domínguez 1979.

7.4.1 Prueba del KMnO₄

Se disuelven de 1 a 2 mg de los extractos en 1 mL de agua, acetona o metanol y se le agrega gota a gota una solución de KMnO₄ al 2% en agua. La prueba resulta positiva si se observa decoloración o formación de precipitado café, resultado de la formación de dióxido de magnesio.

7.4.2 Grupo carbonilo

Una muestra de 1 a 10 mg del extracto se disolvió en etanol, se le añadió una solución saturada de 2-4 dinitrofenilhidracina en HCl 6N, la formación de un precipitado amarillo o naranja indica la presencia del grupo carbonilo

7.4.3 Oxidrilos fenólicos (taninos vegetales)

Prueba del FeCl₃: Se disolvieron 1-2 mg del extracto en 1 mL de agua o etanol y después se le agregaron unas gotas de cloruro de hierro al 12.5% en agua. La aparición de un precipitado rojo, azul-violeta o verde es considerado positivo.

7.4.4 Esteroles y triterpenos

Prueba de Salkowski: Se disolvió el extracto (1-2 mg) en contacto con 1 mL de ácido sulfúrico, se desarrollan colores amarillo o rojo para esteroles y metilesteroles.

7.4.5 Carbohidratos

Prueba de Molish : A 1-2 mg del extracto, 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 es positiva cuando se forma un anillo coloreado en la interfase de color púrpura.

7.4.6 Prueba de las cumarinas

Se disolvió 1-2 mg del extracto se le agregó gota a gota el reactivo NaOH al 10 %, si aparece una coloración amarilla que desaparece al acidular la prueba es positiva.

7.4.7 Prueba de lactonas

Se disolvió de 1-2 mg del extracto se le agregó una solución alcohólica de NaOH al 10 %. Un color amarillo o anaranjado que se pierde o desaparece al agregar unas gotas de HCl indica la presencia de un anillo lactónico.

7.4.8 Sesquiterpenlactonas

Prueba de Baljet: A 2-3 mg del extracto se le agregaron 3-4 gotas de la solución mezcla, siendo positiva si se trna de color naranja a roja oscura. La solución mezcla 1:1 consiste en solución A que contiene: ácido pícrico al 1% en etanol y una B NaOH al 10 %.

7.4.9 Flavonoides

Prueba del H₂SO₄: Una pequeña cantidad del extracto se disolvió en H₂SO₄ y se observa coloración amarilla para flavonoides, naranja-guinda para flavonas, rojo-azuloso para chalconas y rojo-púrpura para quinonas.

7.4.10 Alcaloides

Prueba de Dragendorff: Se usó la modificación de Munier y Machelobuf para la determinación de alcaloides. Para ello se prepararon dos soluciones, la solución “A” con 0.85 g de nitrato de bismuto, los cuales se mezclaron con 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua y Solución B con 8 g de yoduro de potasio disuelto en 20 mL de agua. El reactivo se preparó mezclando 5 mL de “A”, 4 mL de “B” y 100 mL de agua, la prueba es positiva si se presentan coloraciones rojo o naranja, persistentes por 24 h.

7.4.11 Saponinas

Prueba del bicarbonato de sodio: La sal se preparó al 10 % en agua. Se disolvió de 1-2 mg del extracto disuelto en agua o etanol y se le agregó de 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se agitó ligeramente, luego se agregaron 2-3 gotas de la solución de bicarbonato de sodio. La aparición de burbujas y su permanencia por más de 1 min indican la presencia de saponinas.

Prueba de Salkowski para saponinas: Se disolvieron de 1-2 mg del extracto en 1 mL de cloroformo y se les añadió 1 mL de H₂SO₄. La prueba es positiva si hay aparición de color rojo (Verástegui, 2000).

7.4.12 Aromaticidad

Prueba del 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 del extracto disuelto en un disolvente no aromático, se añadieron unas gotas de la mezcla anterior y si aparece un color rojo-violeta, la prueba es positiva (Treviño, 2001).

7.5 Prueba de toxicidad sobre *Artemia salina*

Para llevar a cabo la estimación de la toxicidad de los extractos se realizó el ensayo de toxicidad por *Artemia salina*, para la cual se preparó agua de mar artificial al 4% p/v utilizando sal de mar Instant Ocean Aquarium System y agua bidestilada ajustando el pH a 7.8, una vez disuelta el agua se le agregaron 6mg de levadura Mead Johnson y se agitó hasta disolución.

7.5.1 Incubación y eclosión de los huevecillos

Para realizar la eclosión de los huevecillos se procedió a armar las cámaras de eclosión y rellenarlas con el agua preparada a un 80% de su capacidad y colocar la bomba de aire, una vez armadas y llenas se colocó la pared de división de la cámara dejando un espacio de 2 mm del fondo; Se pesaron 100 mg de huevecillos de *Artemia salina* (Brine Shrimp Eggs San Francisco Bay Brand INC) y se colocaron en uno de los espacios de la cámara, posteriormente se colocó una tapa oscura y del lado contrario se colocó una lámpara de 20 watts para ayudar a la migración de los nauplios y conservación de temperatura entre 22-29° C, 24 h después se revisó y rellenó el nivel de agua y se dejó eclosionar 24 h más en las mismas condiciones de luz y temperatura.

7.5.2 Preparación y aplicación de los extractos

Se pesaron 3 mg de cada extracto y se agregaron 3 mL de agua de mar artificial para obtener una solución stock de trabajo, posteriormente se realizaron diluciones tomando 480, 240, 200, 160 y 120 μ L de la solución stock y completando a 1 mL con agua de mar, preparadas las concentraciones a probar.

Transcurridas las 48 h de eclosión, se tomaron 100 μ L de agua conteniendo entre 10 y 15 nauplios y se depositaron en un pozo de una micro placa de 96 pozos, una vez depositados los nauplios, se le colocó a cada pozo 100 μ L de las soluciones de extractos a probar en concentraciones de 60 a 500 ppm utilizando como control positivo dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) a 400 ppm y como control negativo agua de mar artificial (cada concentración fue evaluada por triplicado); una vez llena la micro placa se procedió a dejarla bajo una lámpara de 20 watts por 24 h, transcurrido este periodo y con ayuda de un estereoscopio se realizó el conteo de nauplios vivos por dosis,

después de realizado el conteo se determinó la DL_{50} utilizando el análisis estadístico Probit con el programa estadístico SPSS.

7.6 Actividad citotóxica sobre línea celular normal (linfocitos humanos)

7.6.1 Obtención de sangre periférica

Para la toma de muestras se tomaron solo individuos sanos, si hábitos de alcohol, drogas y/o tabaco, sin antecedentes de enfermedades infecciosas previo a la toma de muestra; Las muestras se obtuvieron en la mañana, de individuos con ayuno mínimo de 8 horas, la técnica utilizada para la extracción fue con vacutainer utilizando EDTA (Ácido etilendiamino tetra-acético) como anticoagulante.

7.6.2 Aislamiento de linfocitos

Una vez obtenida la muestra, se procedió a la extracción de linfocitos en base a la técnica de densidad, para la cual se utilizó solución comercial Histopaque1077 (Sigma-Aldrich Inc.), la cual es una mezcla de polisucrosa diatrizoato sódico ajustado a una densidad de 1.007 ± 0.001 g/mL lo que facilita el aislamiento y rápida obtención de células mononucleares viables *in vitro* a partir de sangre total.

El proceso de obtención de linfocitos se trabajó en campana de flujo laminar para así evitar la contaminación de las muestras, para realizar el aislamiento el total de sangre obtenida se diluyó en solución salina (relación 1:1) completando así 1 L la mezcla, de los cuales se transfirieron 20 mL a un tubo cónico de 50mL al cual se le añadieron posteriormente con ayuda de una jeringa y siendo depositados lentamente por las paredes 20 mL de la solución de Histopaque 1077 (evitando movimientos que provocaran la mezcla de ambas fases), terminado este paso se procedió a centrifugar a 3000 rpm/ 30min/ temperatura ambiente, pudiéndose visualizar 3 fases al terminar este periodo, en las cuales la fase superficial corresponde al plasma sanguíneo, la del fondo con un color más oscuro contiene eritrocitos y la interfase de consistencia densa y color blanquecino contenía las células mononucleares, esta fase intermedia fue recuperada con la ayuda de una pipeta y transferida a un tubo cónico para sus lavados. Para realizar el lavado se agregó solución salina isotónica tamponada con fosfatos (PBS 1X) y se centrifugó durante 10 min/ 2000 rpm se descartó el sobrenadante y se repitió la acción 2 veces más hasta obtener un pellet suficiente del cual se transfirieron 50 μ L a un tubo Eppendorf conteniendo 3mL de medio DMEM (Dulbecco's Modified

Eagle Medium), se homogenizó y de la solución se transfirieron 12 μ L a una cámara de Neubauer para realizar el conteo de células viables.

7.6.3 Determinación de la viabilidad celular por exclusión con azul de tripano

Para determinar la viabilidad, crecimiento e integridad de los linfocitos, se llevó a cabo una coloración con azul de tripano, el cual es un colorante con capacidad de teñir células y tejidos muertos y se utiliza para evaluar la viabilidad celular por exclusión de captación ya que este colorante no puede penetrar y teñir células vivas y/o con membranas íntegras lo que permite poder distinguir células no viables (teñidas de azul) de células viables (no teñidas) al ser vistas al microscopio, esta característica se aplica para llevar a cabo el conteo en la cámara de Neubauer, donde se colocaron 12 μ L y se procedió a observar en el microscopio con el objetivo 400X para realizar el conteo se tomaron en cuenta solo los cuadrantes de 4x4 ubicados en la esquinas de la retícula, una vez llevado a cabo el conteo de los 4 cuadrantes, se calculó la media aritmética conforme la siguiente fórmula:

$$\text{No. de } \frac{\text{células}}{\text{mL}} = \frac{(\text{NO. de células cuadrante A} + \text{No. de células cuadrante B} + \text{No. de células cuadrante C} + \text{No. de células cuadrante D})}{4} * 10000 * 2$$

Una vez obtenida la densidad celular requerida, se procede a iniciar el ensayo de toxicidad.

7.6.4 Ensayo de toxicidad

Se prepararon soluciones stock (de los extractos con mejor actividad contra *H. pylori*) a una concentración de 10mg/mL; en placas de 96 pozos se colocaron 100 μ L de DMEM en cada uno de los pozos, a continuación se agregaron 100 μ L de la solución stock en los primeros 3 pozos y se homogenizaron con ayuda de una puntilla, enseguida realizar una dilución seriada hasta completar los 8 pozos una vez realizadas las diluciones se procedió a agregar 100 μ L de la solución con linfocitos, utilizando como control 20 μ L de concanavalina A siendo añadida a 3 pozos seleccionados, a los cuales se les retiró 20 μ L del contenido y se sustituyó por la concanavalina, de igual manera se corrieron controles de metanol y de metanol con CoA solvente (200 μ L de

metanol + 800 μ L del medio DMEM) y del solvente con CoA. Una vez llenas las placas se colocaron en la incubadora durante 4 h a 37° C, terminado este periodo se transfirió el contenido de los pozos a tubos eppendorf (el contenido de los triplicados fue colocado en un tubo) para centrifugarlos a 10000 rpm/ 10 min, transcurrido el tiempo se descartó el sobrenadante y se recuperó el pellet celular formado, al tubo que contenía este pellet se le agregaron 500 μ L de medio DMEM y se volvió a centrifugar a 10000 rpm/10 min, se decantó el sobrenadante y el pellet fue re suspendido y transferido a pozos de la microplaca (100 μ L por triplicado de cada tratamiento o dilución), una vez colocados los tratamientos se añadieron 20 μ L de MTT a cada uno de los pozos y se incubaron a 37° C/2h terminado este periodo se recolectó el contenido de los pozos en tubos eppendorf los cuales se centrifugaron a 10000 rpm/10 min, posteriormente se decantó el sobrenadante y se agregaron 350 μ L de DMSO, se homogenizó con ayuda de vortex y se colocaron 100 μ L en cada uno de los pozos, una vez colocados todos los tratamientos y controles por triplicado, se leyó la placa con ayuda de un lector de microplacas a 570 nm. Los resultados se analizan utilizando Probit para determinar la DL₅₀ y por ANOVA para determinar la diferencia entre los tratamientos.

7.7 Actividad antioxidante por el método de DPPH•

Los materiales para realizar el ensayo fueron, solventes grado analítico marca CTR, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) marca SIGMA y ácido ascórbico (SIGMA).

7.7.1 Curva de calibración

Para llevar a cabo el ensayo se realizó siguiendo lo mencionado por (Marina et al., 2008) con algunas modificaciones, obteniéndose primeramente una la solución del radical DPPH a 40 ppm, verificando que la absorbancia de la solución fuese de 1 ± 0.2 ; Posteriormente se realizó una curva de calibración preparó para la cual se utilizó una solución stock del ácido ascórbico (como sustancia antioxidante de referencia) en metanol a 1 mg/mL, la cual se sonicó hasta disolución total, posteriormente se alicuotó y disolvió con metanol para obtener soluciones de 5, 10, 20, 40, 80, 100 y 120 ppm, de las cuales se colocaron 100 μ L en celda desechables para espectrofotómetro y 1900 μ L de metanol, se homogenizaron y se dejaron reposar en la obscuridad por 30 min a

temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se procedió a leer las absorbancias con ayuda de un espectrofotómetro Jenway 6320D a 519 nm, cada punto de la curva fue realizado por triplicado.

7.7.2 Determinación de actividad de los extractos

Para determinar la capacidad de los extractos: Se elaboró solución stock de cada uno de los extractos a 50 µg/mL para EMCN, EACT, EMCT, a excepción del EACN del cual se preparó a 10 µg/mL.

Se probaron 6 concentraciones diferentes de cada uno de los extractos, se colocaron contacto con el DPPH a 40 ppm (cada concentración fue probada por triplicado), en obscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente, transcurrido el periodo de incubación se midieron las absorbancias en un espectrofotómetro Jenway 6320D a 519 nm. Los resultados se expresan como % de inhibición utilizando la siguiente fórmula y como CI₅₀.

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{\text{Abs.inicial} - \text{Abs.final}}{\text{Abs.inicial}} \times 100$$

Donde:

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

Abs. Inicial: absorbancia a 519 nm de la solución de DPPH antes de estar en contacto con el extracto evaluado.

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

7.8 *Helicobacter pylori*

7.8.1 Obtención y mantenimiento de la cepa

La cepa de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ATCC 43504, fue obtenida del cepario del Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Genética conservada en refrigeración.

Para poder ser utilizada, la cepa tuvo que ser acoplada al medio de cultivo, para lo cual se realizó una activación pasando una colonia proveniente de caja con agar Brucella a

un tubo conteniendo Infusión Cerebro Corazón (ICC) suplementado con 1 mL de yema de huevo estéril e incubando 24 horas a 40° C, éste procedimiento se repitió por 3 días consecutivos, una vez realizado este paso se tomó 1mL de este cultivo y se pasó a tubo con 3 mL de ICC (sin yema de huevo) y se incubaron 24 horas a 40° C, una vez obtenido el crecimiento típico (masa celular en el fondo, medio sin turbidez y biofilm en la parte superior) se repite el procedimiento de resiembra durante 3 días y así asegurar un cultivo sano y puro.

7.8.2 Cinética de Crecimiento

7.8.2.1 Activación de la cepa

Se inoculó 1 mL de *H. pylori* proveniente de un cultivo sano, puro y el cual no tenía más 24 horas de crecimiento en un tubo conteniendo 5 mL de caldo ICC y se incubó a 40° C/ 18 horas, el proceso se repitió 2 días consecutivos para asegurar que la bacteria se encontrara activa.

7.8.2.2 Cinética

Se utilizaron 63 tubos con 3mL de caldo ICC, utilizando 15 tubos para cada inóculo de 30, 60, 100 y 200 µL y 3 tubos sin inocular fueron utilizados como blanco, una vez inoculados se incubaron a 40° C y se les determinó la absorbancia a 635 nm (espectrofotómetro Jenway 6320D) cada hora por un periodo de 30 horas. Finalmente se obtienen los promedios de las lecturas las cuales se graficaron para obtener la curva de crecimiento del microorganismo.

7.8.2.3 Caracterización molecular de *Helicobacter pylori*

7.8.2.3.1 Extracción de ADN

De un cultivo fresco en medio sólido y en medio líquido (menor a 24horas) se realizó una resiembra, al alcanzar el tiempo de fase exponencial (4 horas) se tomaron varias asadas (del medio sólido) y muestra del biofilm (medio líquido) y se colocaron en un tubo eppendorf al cual se le agregaron 500 uL de agua estéril, se disgregó y se centrifugó a 4000g/ 10min, terminado el proceso las células se lavaron y resuspendieron en 100 µL de tampón Tris-EDTA 1X (pH 7.4), se centrifugó a 12000G por 1 minuto y se decantó el sobrenadante, se añadieron 100 µg de Lisozima (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se llevó a vortex por 30 segundos y se coló en baño a 37°C/ 20 min y 100 µg de Proteinasa K (Thermo-Fisher, Carlsbad, CA, USA) y se incubaron a 55 °C/ 20 min; luego, se realizó la extracción del ADN total con Trizol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); 1 mL de Trizol, (para asegurar la completa disociación de los

complejos nucleoproteínicos), se incubó por 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 200 μ L de cloroformo, se mezcló vigorosamente por 15 s protegiendo las muestras de la luz, y se incubaron enseguida a temperatura ambiente y en obscuridad durante 15 min, se volvió a centrifugar a 12000G/15 min/ 4° C con la finalidad de obtener una muestra con 3 fases la orgánica situada en el fondo conteniendo proteínas, la interfase conteniendo el ADN y la fase acuosa situada en la superficie conteniendo el ARN.

7.8.2.3.1 Purificación del ADN

Con ayuda de una puntilla se retiró la interfase y se transfirió a un tubo eppendorf al cual se le agregaron 300 μ L de etanol absoluto frío, se mezcló por inversión y se dejó reposar 3 minutos a temperatura ambiente, después de la incubación se centrifugó a 12000 G/ 10 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y al pellet obtenido se le añadió 1 mL de etanol al 75 % y se repitió la centrifugación, por último, se eliminó el etanol que contenía la muestra y el ADN se resuspendió en agua libre de nucleasas (Agua DEPC) y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

7.8.2.3.2 Cuantificación de ADN

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

7.8.2.3.3 Integridad del ADN

Se tomaron 5 μ L de ADN total y se diluyeron con 1 μ L de tampón de carga 6X, esta mezcla se transfirió al gel de agarosa al 1.3 % en tampón TBE 1X. La corrida electroforética se realizó a 90 volts/ 40 min, posteriormente, se tiñó en solución de bromuro de etidio (5 μ g/mL) finalmente se transfirió a un transiluminador de luz ultravioleta Gel Doc™ XR+ Imager (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), donde se visualizaron las bandas predominantes de ADN, tanto del marcador de peso molecular, como de la muestra.

7.9 Actividad antimicrobiana de extractos

7.9.1 Método de difusión en disco

7.9.1.1 Preparación de medios de cultivo

Se prepararon tubos y placas con medio ICC siguiendo las indicaciones del envase utilizando agua destilada, posteriormente se esterilizó el medio a 121° C/15Pa/15 min en el caso del medio líquido este fue colocado en tubos previo a la esterilización y el medio sólido fue esterilizado y posteriormente colocado en cajas Petri estériles. Los medios se colocaron en la incubadora a 40° C/24h para descartar el crecimiento bacteriano y/o contaminaciones con materia extraña; los tubos limpios se colocaron en refrigeración 4° C hasta su uso.

7.9.1.2 Preparación del inóculo

De los tubos con ICC preparado con anterioridad se colocaron en incubadora a 40°C por 1 hora para temperar; De un tubo previamente inoculado con 100 µL y de 18-24 hrs de crecimiento se inocularon los tubos para el ensayo tomando 30 µL para cada tubo y se incubaron por 4 horas (según lo indicado por la cinética).

7.9.1.3 Preparación de extractos y controles

Se preparó solución stock pesando 100 mg de cada uno de los extractos y disolviendo en metanol o etanol según correspondía. Se utilizó una solución inyectable de gentamicina a 4 mg/mL como control positivo y como control negativo fueron utilizados metanol, etanol y agua.

7.9.1.4 Preparación de discos

Los discos de papel filtro de 6 mm de diámetro fueron esterilizados a 121° C/15 min/15 Pa previo a su uso, una vez estériles y fríos fueron llevados a la campana y colocados en caja Petri estéril; Cada disco fue impregnado con 10 µL de extracto/control y se dejó secar al aire (dentro de la campana), una vez seco se voltearon y se los colocó 10 µL de extracto/control dejándolo secar nuevamente.

7.9.1.5 Inoculación de Caja y colocación de discos

Una vez terminado el periodo de incubación de los tubos (4 h), se tomaron 100 µL (por cada caja a inocular) y se colocaron en la caja de ICC y se estrió cubriendo toda la superficie de la caja hasta el borde a continuación se colocaron los discos con extracto (ya secos) ayudados con pinzas estériles. Las cajas inoculadas y con los discos colocados se colocaron de forma invertida en la incubadora a 40° C / 24 h.

7.9.1.6 Medición de halo de inhibición

Transcurrido el periodo de incubación de las cajas, se procedió a realizar una inspección visual en busca de inhibición de crecimiento, en los discos que se presentó se procedió a medir con la ayuda de una regla la zona clara formada, tomando 3 medidas del halo por disco, midiendo el diámetro y reportando el promedio de las 3 mediciones realizadas, expresando los resultados como % de inhibición utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{\text{\textcircled{O}} \text{ del halo de la muestra} - \text{\textcircled{O}} \text{ del halo del blanco}}{\text{\textcircled{O}} \text{ del halo del control positivo} - \text{\textcircled{O}} \text{ del halo del blanco}} \times 100$$

Donde:

Ø del halo de la muestra: medida del halo en cm creado por el extracto

Ø del halo del blanco: medida del halo en cm creado por el metanol/etanol/agua

Ø del halo del control positivo: medida del halo en cm creado por la gentamicina

7.10 Determinación de la concentración mínima inhibitoria utilizando la técnica de microdilución en caldo con el método de MTT.

7.10.1 Preparación de los extractos

Los extractos utilizados fueron los que presentaron la mejor actividad en la prueba de difusión en disco, para lo cual se utilizaron EERu, EERo, EHRo y EMCNd. Para lo cual se prepararon soluciones stock de 1 mg/mL, las cuales fueron sonicadas hasta disolución total.

7.10.2 Obtención de curva de antibiótico

El antibiótico utilizado en el ensayo como control positivo fue la Gentamicina. Para determinar la dosis a la cual debía ser utilizada en el ensayo se procedió a realizar una curva y observar su comportamiento, para lo cual primeramente se preparó un inóculo de *H. pylori* (en su fase exponencial) equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland.

De manera paralela se preparó una solución de gentamicina a 5 µg /mL la cual fue filtrada con filtros Millipore estériles de membrana MCE de 0.22 µm, esta solución fue utilizada como solución stock para realizar la prueba.

Para realizar la curva se colocaron en una placa de 96 pozos con fondo plano 50 uL de caldo ICC estéril en cada uno de los pozos a utilizar (cada dilución fue probada por

triplicado y se realizaron 30 diluciones del activo) después se agregaron 50 uL de la solución stock de Gentamicina en los primeros 3 pozos y se homogenizaron, posteriormente se realizaron diluciones seriadas tomando 50 µL de la solución del pozo y colocándola en la siguiente fila, homogenizando y repitiendo el paso hasta obtener el número de diluciones deseadas, finalmente se añadieron 50 µL del inóculo de *H.pylori* a cada uno de los pozos y se homogenizó, la microplaca se tapó y se incubó durante 4 h/ 40° C, finalizado el tiempo de incubación se le añadieron 15 µL de MTT (5 mg/mL) a cada pozo y se incubó nuevamente por 15 min/40° C, al terminar este periodo se añadieron 80 µL de DMSO estéril y se incubó nuevamente por 15 min/40° C, al terminar esta incubación la microplaca fue colocada en un lector de microplacas y se procedió a leer su absorbancia a 570nm.

7.10.3 Ensayo con extractos

En los ensayos se utilizaron placas de 96 pozos con fondo plano en las que se colocaron 50 µL de caldo ICC estéril en cada uno de los pozos a utilizar (cada dilución, de cada extracto fue probada por triplicado realizando 8 diluciones) después se agregaron 50 µL de la solución stock del extracto a probar en los primeros 3 pozos, se homogenizaron y posteriormente se realizaron diluciones seriadas tomando 50 µL de la solución del pozo y colocándola en la siguiente fila, homogenizando y repitiendo el paso hasta obtener el número de diluciones deseadas, este procedimiento se repite para cada uno de los extractos a probar, como control positivo se utilizó una solución de 50 µL Gentamicina a 0.3 µg /mL y como control negativo 50 µL de inóculo sin ningún otro agente así como un control de crecimiento donde solo se utilizaron 100 µL de caldo ICC sin inocular, una vez terminadas las diluciones, se añadieron 50 µL del inóculo de *H. pylori* a cada uno de los pozos y se homogenizó. La microplaca se tapó y se incubó durante 4 h/40° C, finalizado el tiempo de incubación se le añadieron 15 µL de MTT (5 mg/mL) a cada pozo y se incubó nuevamente por 15 min/40° C, al terminar este periodo se añadieron 80 µL de DMSO estéril y se incubó nuevamente por 15 min/40° C, al terminar esta incubación la microplaca fue colocada en un lector de microplacas y se procedió a leer su absorbancia a 570nm.

El ensayo fue realizando, colocando por triplicado cada concentración extracto en cada corrida y realizándolo en 3 ocasiones diferentes para validar los resultados.

7.11 Inhibición de la formación del biofilm

7.11.1 Preparación de extractos

Para realizar el ensayo se utilizaron los extractos EERo, EERu, EMCN y EMCNd a concentración de 10 mg/mL utilizando caldo ICC y 12.5% de etanol para realizar la disolución.

7.11.2 Obtención del inóculo e inoculación de tubos

El inóculo de *H. pylori* proviene de un subcultivo en medio ICC no mayor a 18h de crecimiento del cual se tomaron 100 µL para inocular cada uno de los tubos con 3 mL de ICC que se trabajó y se incubaron a 40° C/4 h (tiempo de fase exponencial), una vez transcurrido el tiempo se inocularon con 100 µL tubos con 3 mL de ICC (3 tubos por cada concentración).

7.11.3 Adición de los extractos y controles

A los tubos con 3 mL de caldo ICC se les agregó 0.9, 0.3 y 0.15 mL de la solución stock de los extractos, posteriormente se inocularon 100 µL de *H. pylori* en fase exponencial (4 horas de crecimiento a 40° C), como control positivo se utilizaron 150 µL de Gentamicina a 4 mg/mL, como control negativo se utilizó sólo el inóculo de *H. pylori* y como control de solvente se tomaron 100 µL de una solución de ICC y etanol (3:1) en tubos conteniendo 3 mL de caldo ICC.

7.11.4 Incubación, lavado y lectura

Una vez colocados los tratamientos e inóculos en los tubos, estos se incubaron a 40° C por 2 días, al terminar el periodo de incubación se procedió a decantar el caldo ICC (con sumo cuidado para no desprender el biofilm formado), posteriormente se agregaron 3 mL de PBS 1X para realizar un lavado y se decantó teniendo cuidado de no arrastrar el biofilm, este procedimiento de lavado se repitió 2 veces más se decantó, se colocaron en estufa a 50° C/ 30 min al terminar este tiempo, a cada tubo se le añadió 10 mL de colorante cristal violeta al 0.1% y se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente el colorante no unido se descartó y el colorante unido fue decolorado con una mezcla de etanol/ acetona (80:20), cuantificando el color espectroscópicamente a 570 nm.

8. RESULTADOS

8.1 Identificación del material vegetal y obtención de extractos

En total se obtuvieron 7 extractos, 3 metanólicos, 3 etanólicos y un desengrasado; como se muestra en la tabla 1, el extracto con mayor rendimiento fue el extracto metanólico de cáscara de nuez desengrasado (EMCNd) con 47.43% seguido por extracto metanólico de *Ganoderma lucidum* (EMG) con un 12%.

Nombre científico	Nombre común	Parte utilizada	% Rendimiento	Clave del extracto
<i>Ruta graveolens</i>	Ruda	Parte aérea (hoja y tallo)	3.19	EERu
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero	Parte aérea (hoja y tallo)	0.1	EERo
<i>Ganoderma lucidum</i>	Hongo repisa	Cuerpo fructífero	12	EMG
<i>Juglans regia</i>	Nogal	Cáscara del fruto (nuez)	2.8	EMCN
			47.43	EMCNd
<i>Citrus paradisi</i>	Toronja	Cáscara del fruto (toronja)	9	EMCT
<i>Ricinus communis</i>	Higuerilla	Hojas	0.96	EEH

Tabla 7. Identificación y rendimiento de extracción del material biológico

8.2 Tamizaje fitoquímico

Las pruebas coloridas realizadas sirvieron para determinar de forma parcial la presencia de grupos funcionales y metabolitos secundarios de interés presentes en los extractos obtenidos. Los resultados obtenidos se muestran la presencia de grupos carbonilos, esteroides, triterpenos, oxidrilos fenólicos entre otros, como se muestra en la tabla 8:

PRUEBA	EXTRACTOS EVALUADOS						
	EMCT	EMG	EMCN	EMCNd	EERO	EERU	EEH
KMnO4	+	+	+	+	-	+	-
CARBONILO	+	+	+	+	+	-	-
OXIDRILOS FENÓLICOS	-	+	+	+	+	+	+
ESTEROLES Y TRITERPENOS (SALKOWSKI)	-	+	-	-	+	+	+
CARBOHIDRATOS (MOLISH)	+	-	+	-	-	-	-
CUMARINAS	-	-	-	+	+	-	-
LACTONAS	+	+	-	-	-	-	-
FLAVONOIDES (H ₂ SO ₄)	+	-	+	+	-	-	-
SESQUITERPENLACTONAS	-	-	-	+	-	-	-
ALCALOIDES DRAGENDORFF	+	+	+	-	-	-	-
SAPONINAS (BICARBONATO DE SODIO)	-	-	-	-	-	+	+
SAPONINAS (SALKOWSKI)	-	-	-	+	+	-	-
AROMATICIDAD	+	-	+	+	+	-	+
FLAVONOIDES (SHINODA)	+	-	+	+	-	-	-

Tabla 8. Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos en estudio

(+= a presencia/ -= ausencia)

El extracto con presencia de más grupos funcionales fue el Extracto Metanólico de Cáscara de Nuez desengrasado (EMCNd), puede notarse que al desengrasar el EMCN los carbohidratos ya no se detectan y grupos como las cumarinas, sesquiterpenlactonas así como saponinas pueden ser detectables. Las sesquiterpenlactonas es el metabolito secundario con menor presencia en los extractos estando presente solamente en el EMCNd, mientras que los oxidrilos fenólicos presentan mayor prevalencia en la mayoría de los extractos.

8.3 Prueba de toxicidad sobre *Artemia salina*

La tabla 3, presenta los datos del ensayo de toxicidad utilizando nauplios de *A. salina*, en esta tabla pueden observarse la significancia del ensayo para cada uno de los extractos, la X^2 , la dosis letal media (DL₅₀) la cual fue determinada utilizando el análisis Probit así como su clasificación en base al nivel de toxicidad que presentaron.

Los extractos presentaron actividad variada teniendo resultados desde moderadamente hasta no tóxicos, siendo el de mayor toxicidad el EMCT y los de menor actividad tóxica EMG y EMCN.

Se observó que someter al proceso de desengrasado al EMCN obteniendo EMCNd éste aumentó su toxicidad pasando de no tóxico (1605.93 $\mu\text{g/mL}$) a moderadamente tóxico (307.445 $\mu\text{g/mL}$).

EXTRACTO	DL ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	CLASIFICACIÓN	SIGNIFICANCIA	X ²
EMG	1032.230	No tóxica	0.000	160.363
EMCN	1605.93	No tóxico	0.000	63.010
EMCNd	307.445	Moderada	0.181	24.418
EMCT	171.720	Moderada	0.000	202.767
EERu	296.105	Moderada	0.000	54.175
EERo	572.267	Débil	0.980	8.584
EEH	NR	NR	NR	NR

Tabla 9. Resultado de la determinación de la dosis letal media (DL₅₀) de cada uno de los extractos probados sobre *A. salina*

El porcentaje de mortalidad mostrado en la gráfica 1, causado por los extractos a diferentes concentraciones y evidencia que la actividad tóxica es dosis dependiente para la mayoría de los extractos, presentándose un decremento de la actividad tóxica conforme se disminuye la concentración del extracto.

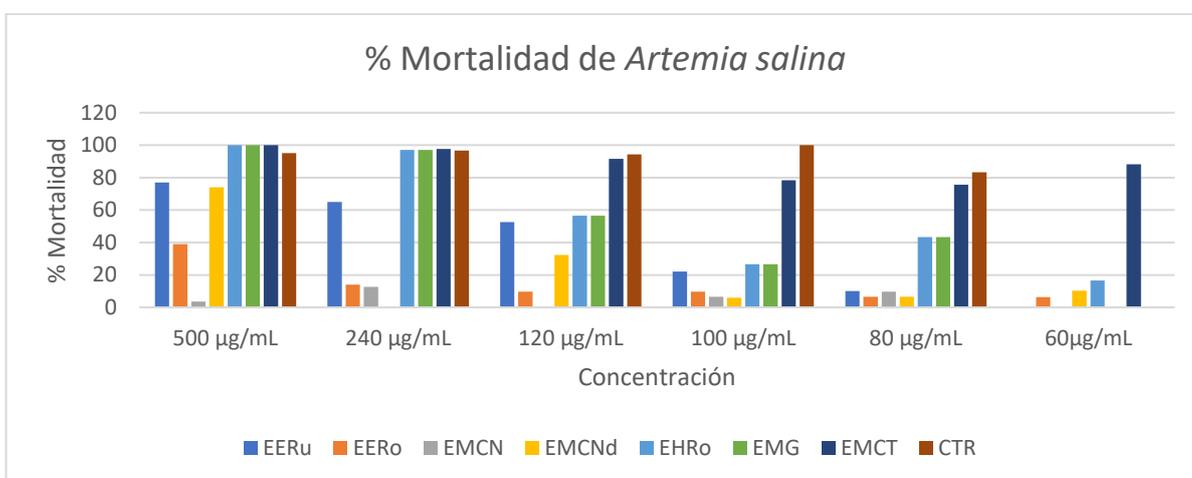


Figura 3. Mortalidad producida por los extractos sobre los nauplios de *A. salina*

8.4. Actividad citotóxica sobre línea celular normal (linfocitos humanos)

Se determinó la citotoxicidad de los extractos utilizando el ensayo de viabilidad celular sobre una línea celular de linfocitos humanos, con el cual se determinó

Este ensayo se desarrolló con la finalidad de determinar cambios en las células normales causadas por la adición de algunos de los extractos que actividad anti-*Helicobacter pylori* en el ensayo de difusión en disco, de los cuales se utilizaron concentraciones de 0.07, 0.15, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5 y 5 mg/mL y se compararon los resultados obtenidos de absorbancias de los extractos contra la de los controles de células sin tratamiento y células tratadas con concanavalina-A.

El análisis de los resultados fue analizado utilizando ANOVA bifactorial para determinar si existían diferencias entre las absorbancias obtenidas de los extractos contra las obtenidas por el control como se observa en la gráfica 2, concluyéndose que los extractos no poseen diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (linfocitos sin tratamiento), por lo que se puede decir que de manera general los extractos no presentan actividad tóxica contra una línea celular normal de linfocitos.

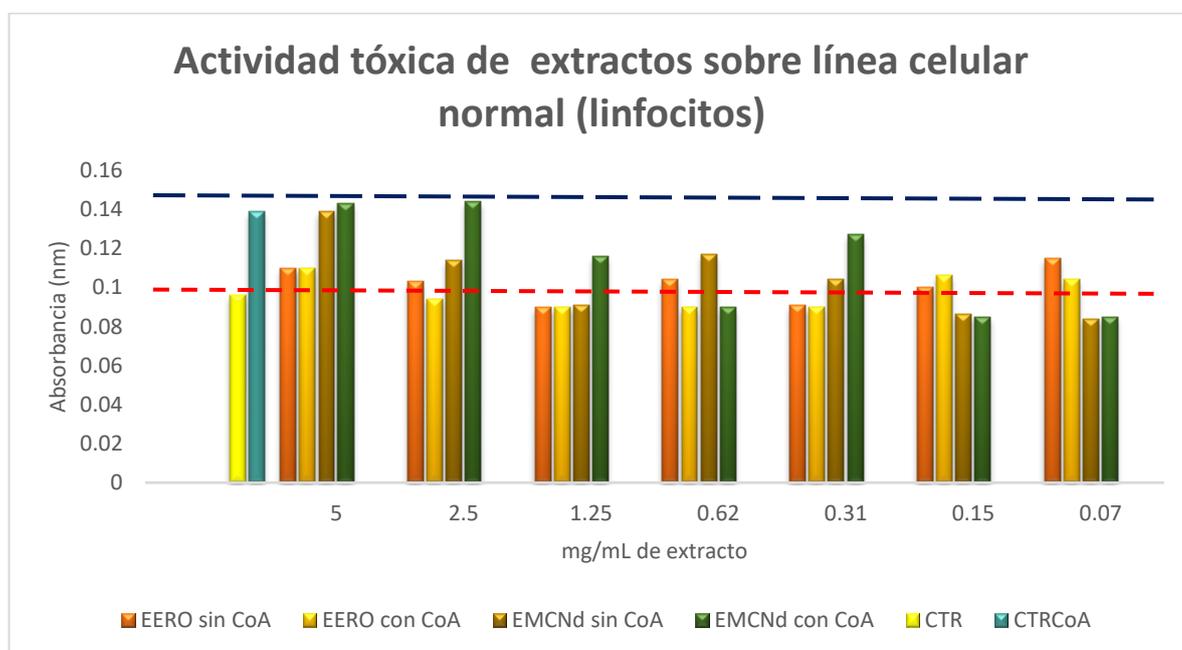


Figura 4. Efecto de los extractos sobre el desarrollo de linfocitos humanos

8.5 Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH•

Se determinó la actividad antioxidante de los extractos mediante la técnica de DPPH•, la cual es ampliamente utilizada por ser rápida, confiable, reproducible y económica.

Se realizó una curva de calibración utilizando como sustancia modelo la Vitamina C de la cual ya se conocen sus propiedades antioxidantes y se hizo reaccionar bajo los parámetros establecidos para el ensayo y así poder comparar los resultados obtenidos de ésta con los obtenidos de los extractos en estudio, posteriormente se realizó el ensayo para cada uno de los extractos.

De este ensayo se pudieron obtener como resultados: El porcentaje de inhibición, el cual se obtuvo del decremento de las absorbancias del reactivo DPPH al ponerse en contacto los extractos o controles e indica la cantidad (en porcentaje) de radicales que fueron neutralizados por el extracto a la concentración probada y La Concentración Inhibitoria media (CI₅₀), la cual se obtuvo mediante un análisis estadístico Probit, éste resultado indica la cantidad de extracto necesario para inhibir el 50% de los radicales presentes en una reacción *in vitro*. En la imagen puede observarse el comportamiento del control (Ácido ascórbico) y de los extractos a diferentes concentraciones.

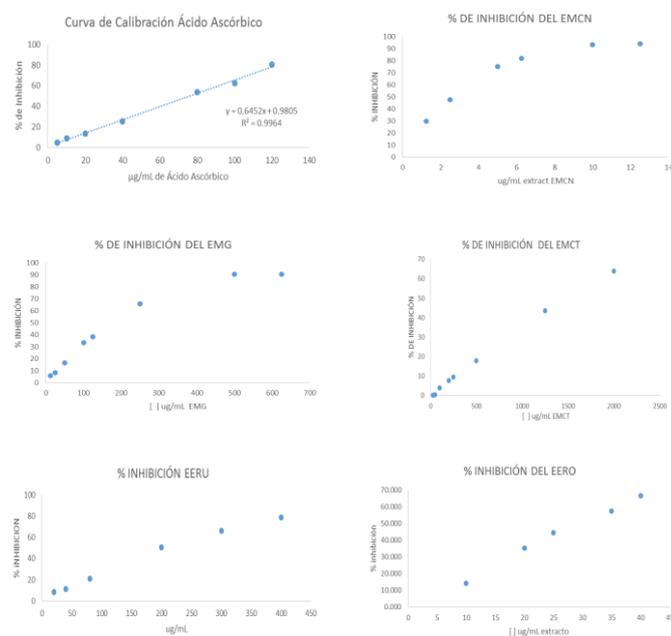


Figura 5. Comportamiento de los controles y extractos evaluados por la técnica de DPPH•

Como puede apreciarse en la Tabla 10, el extracto con la mayor actividad antioxidante es el EMNC con la CI₅₀ menor de todos los extractos probados incluso con un valor menor al control utilizado, destacándose que la actividad antioxidante de los extractos muestra un comportamiento dosis dependiente como puede apreciarse en la Figura 5.

EXTRACTO	CI₅₀ (µg/mL)	Xi²	Significancia
Ácido ascórbico	3.911	2.564	0.767 ^b
EMCN	2.759	13.357	0.010 ^a
EERo	31.653	8.965	0.062 ^b
EMG	235.863	35.543	0.000 ^a
EERu	237.843	9.984	0.076 ^b
EMCT	1458.496	10.905	0.143 ^a

Tabla 10. Resultados de la actividad antioxidante de los extractos analizados expresados como CI₅₀

8.6 Pruebas microbiológicas

8.6.1 Acoplamiento y mantenimiento de *Helicobacter pylori*

La cepa de *Helicobacter pylori* logró desarrollarse de manera adecuada al medio ICC desarrollándose de manera típica macroscópicamente hablando, en tubo puede apreciarse la formación biofilm en la parte superior, no se desarrolla gran turbidez en el resto del medio y la formación de una masa celular en el fondo del tubo y en caja donde puede observarse las colonias con punto central y formación de gota o ámpula típica de la cepa como se muestra en la Imagen 1.

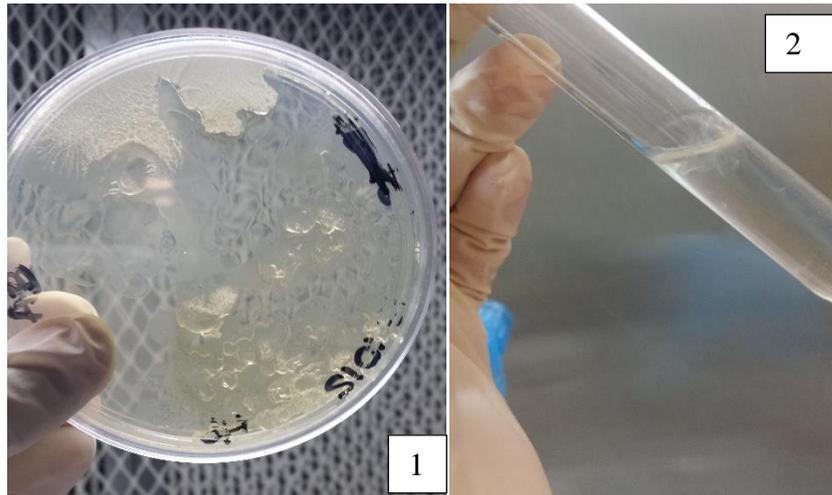


Imagen 1. Características macroscópicas del cultivo de *H. pylori* en medio ICC sólido y líquido.

Como puede observarse en la Imagen 2, en la fotografía de la izquierda (1) puede apreciarse el desarrollo de las colonias en medio sólido, mostrando crecimiento típico para *H. pylori* el cual se da forma de gotas, con color translúcido, presencia de biofilm grueso y firme; En la imagen de la derecha, (2) se puede observar el crecimiento en medio líquido, observándose formación típica de biofilm en la parte superior del tubo y sin turbidez en el medio.

8.6.2 Caracterización de *Helicobacter pylori*.

Una vez obtenidas las colonias típicas de *Helicobacter pylori*, se procedió a realizar la observación de estas al microscopio y visualizar sus características microscópicas, para lo cual se realizó un a tinción simple, así como tinción de Gram. En la Imagen 2 se puede observar la morfología de un bacilo helicoidal Gram negativo, concordando con la descripción típica de las características morfológicas de *H. pylori*.



Imagen 2. Tinción simple y tinción Gram de muestra de *H. pylori* en medio líquido, se observan características microscópicas típicas de la especie.

Según el manual de Bergey, *Helicobacter pylori* es una bacteria que da positivo en la prueba de ureasa. Para identificar la cepa cultivada, se realizó la prueba de ureasa, utilizando dos tubos con agar urea. En uno de los tubos, se inoculó una muestra aseptica de un cultivo puro de *H. pylori*, mientras que otro tubo se dejó como control negativo (sin ningún cultivo). Los tubos se incubaron a 40 °C, durante 72 horas, con intervalos de observación cada 24 horas, para detectar cualquier cambio en el color del medio, que genera vire de amarillo a rosa en presencia de la enzima ureasa.

Como puede observarse en la Imagen 3, el tubo con la cepa mostró un cambio de color amarillo a un rosa intenso después de 72 horas de incubación, lo que indica la presencia de ureasa y confirma la identificación de *H. pylori*.

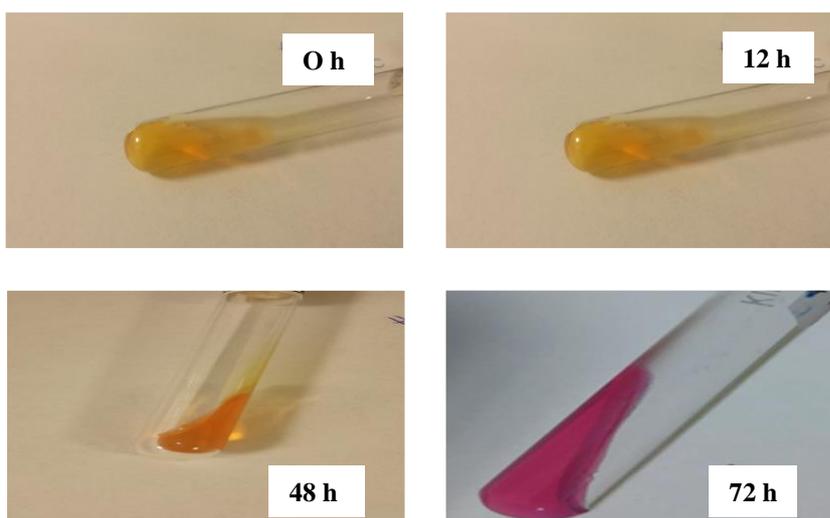


Imagen 3. Prueba bioquímica de ureasa. La coloración rosa en el tubo inoculado confirma la presencia de *Helicobacter pylori*.

8.6.3 Cinética de crecimiento de *Helicobacter pylori*

La cinética de crecimiento de *Helicobacter pylori* se evaluó mediante el uso de diferentes volúmenes de inóculo (30, 60, 100 y 200 μ L) en el medio y condiciones de cultivo especificadas. Los resultados se presentan en la Figura 6. que muestra el comportamiento del crecimiento de la bacteria a lo largo del tiempo y puede observarse que el inóculo de 30 μ L experimentó una fase de adaptación más prolongada, que se extendió hasta las 6 horas de incubación. En contraste, los inóculos de 60, 100 y 200 μ L alcanzaron la fase de crecimiento después de solo 2 horas de adaptación.

La fase de crecimiento exponencial para el inóculo de 30 μL ocurrió entre las horas 7 y 12, mientras que, para los inóculos de 60, 100 y 200 μL , esta fase se observó entre las horas 4 y 10. A partir de la hora 10, se inició la fase de declinación en el crecimiento bacteriano en todos los inóculos, lo que indica el comienzo de la fase de muerte celular.

Estos resultados sugieren que el volumen del inóculo tiene un impacto significativo en la cinética de crecimiento de *H. pylori*, afectando tanto la duración de la fase de adaptación como la rapidez y la duración de la fase de crecimiento exponencial antes de la fase de muerte.

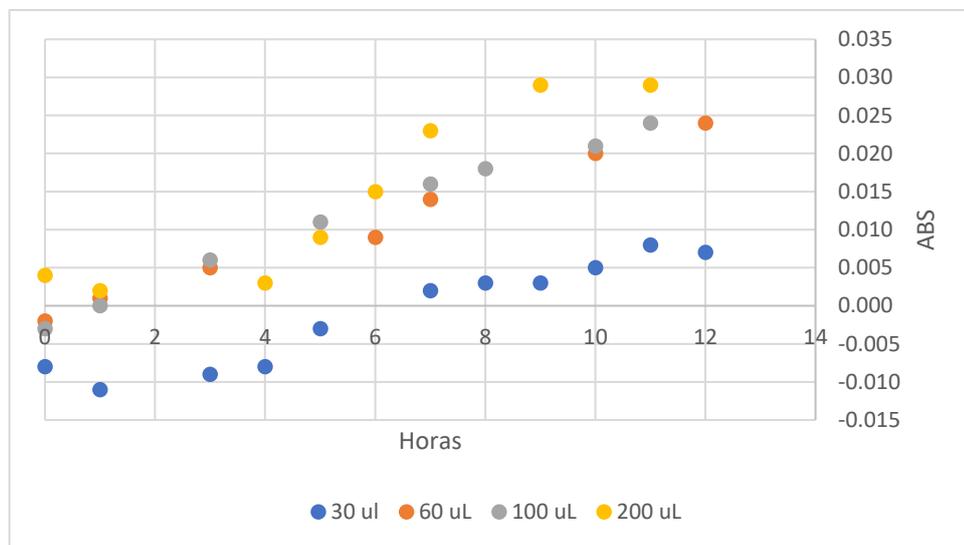


Figura 6. Resultado del ensayo cinético de crecimiento de *H. pylori* utilizando distintos volúmenes de inóculo.

8.6.4 Caracterización molecular de *Helicobacter pylori*

Para poder comprobar la pureza del cultivo obtenido, se realizó un análisis PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) bajo las condiciones señalada en la tabla 6 y revelando el gel de electroforesis de agarosa con bromuro de etidio, utilizando como Primer el diseño de oligonucleótido de la tabla 5 el cual codifica para el gen Vac A el cual es determinante para la cepa patógena de *H. pylori*.

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

Tabla 11. Diseño de oligonucleótidos para Priers del gen Vac A.

Condiciones de Termociclador			
Programación	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95	8 min	1
M Amplificación	95	30 s	35
	55	30s	
	72	30s	
Extensión	72	8 min	
Enfriamiento	12	1 min	1

Tabla 12. Parámetros del termociclador para la extracción de ADN de *H. pylori*

El revelado del gel se realizó utilizando bromuro de etidio y un transiluminador, donde pudo observarse un patrón de bandas como se muestra en la Imagen 4.

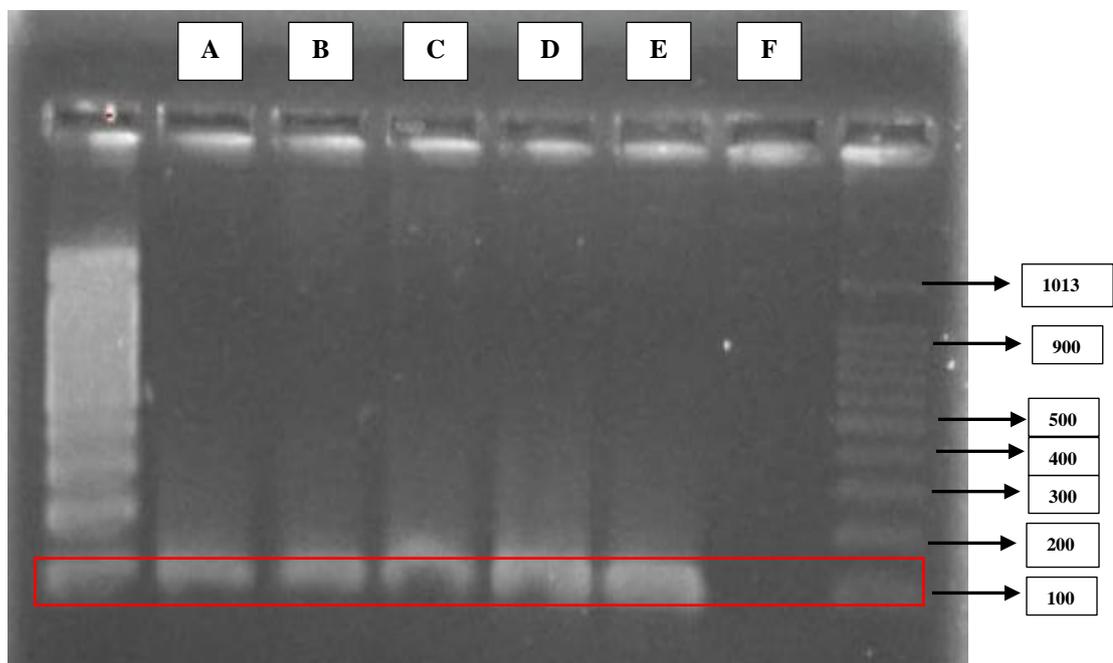


Imagen 4. Resultados del revelado del gel de agarosa.

La Imagen 4, muestra los resultados del revelado de un gel de agarosa, donde el carril identificado con M exhibe los marcadores de peso molecular utilizados, mostrando bandas que varían desde los 100 hasta los 1013 pares de bases (pb). El carril A corresponde al perfil de bandas de una cepa control de *H. pylori* ATCC, en el carril B se muestra una muestra de *H. pylori* cultivada en medio ICC líquido, mientras tanto en los carriles C y D se muestran las bandas pertenecientes a muestras de cultivo de la misma bacteria en medio ICC sólido, en el carril F se encuentran los resultados de las bandas generadas por cultivos en agar Brucella y finalmente en el carril F se presenta el control negativo el cual fue medio ICC sin inocular. En todas las muestras analizadas se logró identificar la banda de 100 pb, característica de *H. pylori* de igual forma el

patrón de bandas en todas las muestras es similar al control positivo, lo que sugiere la pureza de los cultivos probados.

8.6.5 Determinación de la actividad antibacteriana contra *Helicobacter pylori* por el método de difusión en disco

De los seis extractos evaluados, se observó que dos de ellos exhibieron actividad contra *H. pylori*, siendo el EERu el más destacado, seguido por el EERo, como se puede apreciar en la Imagen 5, donde se muestran los halos de inhibición generados por los extractos. Los demás extractos no mostraron actividad antimicrobiana. En la Tabla 13. Puede verse a detalle la información sobre los extractos que presentaron actividad y el tamaño de los halos formados.

Actividad antibacteriana de extractos		
Muestra	Actividad	Halo (cm)
EMCN	-	0
EMCNd	-	0
EMG	-	0
EERu	++	1.1
EERo	++	1.6
EMCT	-	0
EEHH	-	0
Gentamicina (C+)	++++	3.5
Metanol/ Etanol (C-)	-	0

Tabla 13. Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos sobre *H. pylori*

(-= sin actividad, + Actividad Débil, ++ Actividad Moderada, ++++ Actividad fuerte)

El porcentaje de inhibición inducido por los extractos se presenta en la Figura 7. Donde puede observarse que los extractos EERo y EERu mostraron actividad contra *H.pylori*,

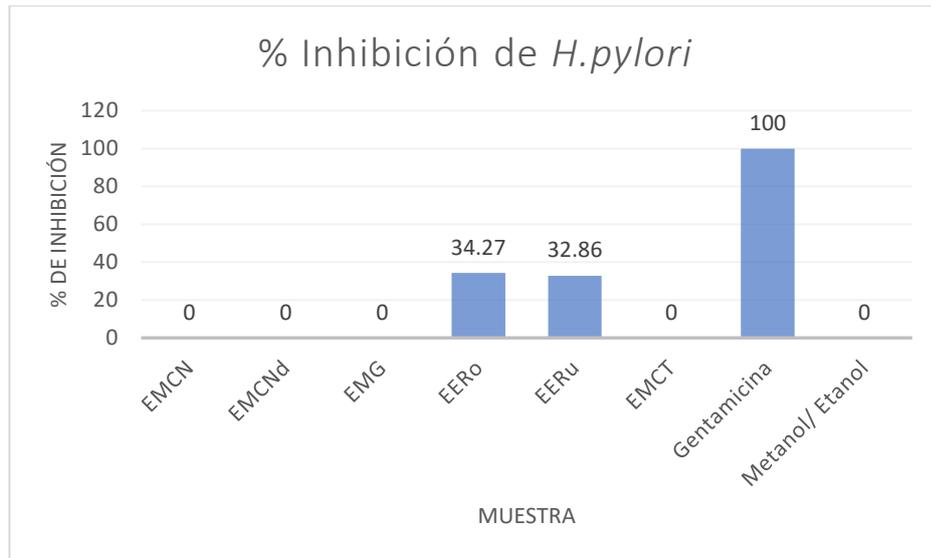


Figura 7. Inhibición porcentual sobre el crecimiento de *H. pylori* causado por los extractos.

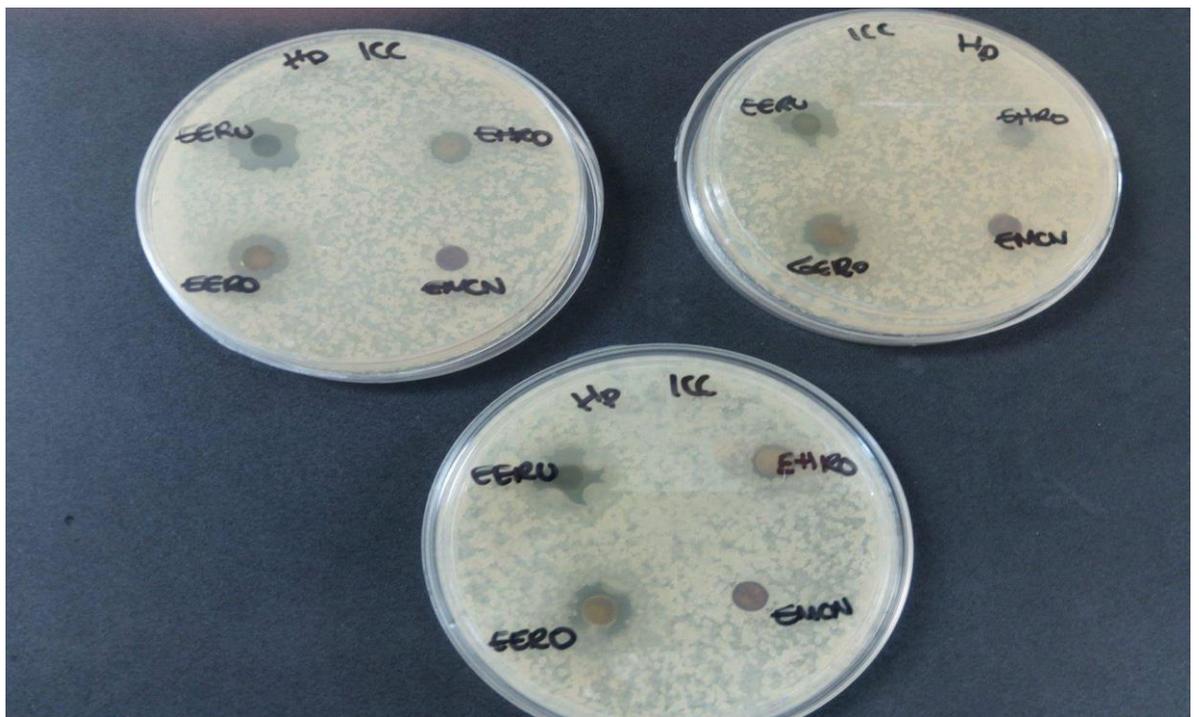


Imagen 5. Halos de inhibición formados por los extractos probados en cajas Petri con la técnica de difusión en disco.

8.6.6 Actividad biológica de los extractos sobre la viabilidad celular de *Helicobacter pylori* mediante el ensayo de MTT

Los extractos con mayor actividad antimicrobiana (EERo y EERu) así como el extracto de mayor actividad antioxidante (EMCN), fueron sometidos al ensayo de MTT para determinar la concentración a la cual los extractos presentan 50% de toxicidad sobre las células de *H. pylori*. Previo a la realización del ensayo se determinó la concentración a la cual el antibiótico (gentamicina) generó el 50% de viabilidad/toxicidad de las células de *Helicobacter pylori*, la cual fue de 0.3 µg/mL como se observa en la Tabla 14.

Gentamicina ug/mL	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio Abs	DE	% Viabilidad	% Citotoxicidad
0	0.535	0.585	0.777	0.632	0.128	100.000	0
2.5	0.189	0.18	0.159	0.176	0.015	27.833	72.167
1.25	0.162	0.15	0.154	0.155	0.006	24.565	75.435
0.6	0.151	0.14	0.14	0.144	0.006	22.720	77.280
0.3	0.145	0.5	0.139	0.261	0.207	41.328	58.672
0.15	0.152	0.153	0.44	0.248	0.166	39.273	60.727
0.078	0.171	0.149	0.149	0.156	0.013	24.723	75.277
0.039	0.152	0.15	0.146	0.149	0.003	23.616	76.384
0.019	0.118	0.145	0.143	0.135	0.015	21.402	78.598
0.009	0.271	0.171	0.164	0.202	0.060	31.945	68.055
0.0048	0.358	0.725	0.77	0.618	0.226	97.681	2.319
0.002	0.552	0.735	0.708	0.665	0.099	105.166	-5.166
0.001	0.565	0.675	0.693	0.644	0.069	101.898	-1.898
0.0006	0.507	0.578	0.565	0.550	0.038	82.707	17.293
0.0003	0.48	0.625	0.52	0.542	0.075	81.454	18.546
0.0001	0.684	0.575	0.59	0.616	0.059	92.682	7.318
0.00007	0.614	0.665	0.625	0.635	0.027	95.439	4.561
0.00003	0.564	0.664	0.674	0.634	0.061	95.338	4.662
0.00001	0.656	0.68	0.676	0.671	0.013	100.852	-0.852
0.000009	0.68	0.728	0.78	0.729	0.050	109.674	-9.674
0.000004	0.695	0.842	0.701	0.746	0.083	112.180	-12.180
0.000002	0.579	0.599	0.65	0.609	0.037	91.629	8.371
0.0000001	0.564	0.566	0.724	0.618	0.092	92.932	7.068
0.00000005	0.568	0.534	0.592	0.565	0.029	84.912	15.088
0.00000002	0.777	0.667	0.531	0.658	0.123	106.526	-6.526
0.00000001	0.564	0.78	0.586	0.643	0.119	104.099	-4.099
0.00000007	0.639	0.749	0.641	0.676	0.063	109.439	-9.439
0.00000003	0.637	0.685	0.656	0.659	0.024	106.688	-6.688
0.00000001	0.739	0.627	0.515	0.627	0.112	101.456	-1.456
0.000000009	0.618	0.629	0.646	0.631	0.014	102.104	-2.104
0.000000004	0.787	0.628	0.704	0.706	0.080	114.293	-14.293

Tabla 14. Resultados para la determinación de la concentración inhibitoria media (CMI) expresada poco CI₅₀ de la gentamicina sobre *H. pylori*

Para determinar la CMI, se realizó el ensayo de MTT de los extractos EMCN, EERo y EERu, la prueba se realizó por triplicado en 3 diferentes ocasiones, utilizando el programa estadístico SPSS® analizando los resultados mediante análisis estadístico de

PROBIT; los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 15. Para determinar cuál de los extractos posee mejor actividad se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con comparación múltiple de Tuckey, Los resultados revelaron que el EERo mostró la mejor actividad con una CIM de 0.511 mg/mL.

EXTRACTO	DOSIS (mg/mL)	%VIABILIDAD	% INHIBICIÓN	INDICE DE VIABILIDAD	CI ₅₀ (mg/mL)
EMCN	0.50	75.08	24.92	0.750	0.000002 mg/mL
	0.250	80.28	19.72	0.802	
	0.125	76.06	23.93	0.760	
	0.62	88.43	11.57	0.884	
	0.31	76.75	23.24	0.767	
	0.15	76.27	23.72	0.762	
	0.07	76.36	23.63	0.763	
	0.035	72.79	27.21	0.727	
	0	100	0	1	
EERu	500	100	0	1	0.136 mg/mL
	250	82	18	0.820	
	125	92	8	0.920	
	62.5	93	7	0.930	
	31.25	94	6	0.940	
	15.6	75	15	0.750	
	7.8	79	21	0.790	
	3.9	69	30	0.690	
	0	100	0	1	
EERo	500	36.78	63.12	0.367	0.511 mg/mL
	250	49.83	50.17	0.498	
	125	23.08	76.91	0.230	
	62.5	19.34	80.65	0.193	
	31.25	40.65	59.34	0.406	
	15.6	68.26	31.74	0.682	
	7.8	67.89	32.10	0.780	
	3.9	74.36	25.64	0.743	
	0	100	0	1	

Tabla 15. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los Extractos sobre *Helicobacter pylori*

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: respuesta

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	Hipótesis	74.847	1	74.847	660.475	.000
	Error	.907	8	.113 ^a		
extracto	Hipótesis	.099	3	.033	2.281	.105
	Error	.347	24	.014 ^b		
dosis	Hipótesis	.907	8	.113	7.827	.000
	Error	.347	24	.014 ^b		
extracto * dosis	Hipótesis	.347	24	.014	1.083	.384
	Error	.963	72	.013 ^c		

- a. MS(dosis)
- b. MS(extracto * dosis)
- c. MS(Error)

respuesta

DHS de Tukey^{a, b, c}

extracto	N	Subconjunto		
		1	2	3
1.00	21	.4271		
6.00	21		.5629	
4.00	27			.7840
2.00	27			.8311
3.00	27			.8516
5.00	27			.8633
Sig.		1.000	1.000	.084

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .011.

- a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 24.652
- b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.
- c. Alfa = 0.05.

Figura 8. Reporte de resultados de los análisis de varianza y Tuckey para los extractos que presenta actividad inhibitoria contra *H. pylori*

8.6.7 Efecto de los extractos sobre la inhibición de la formación de biofilm

Se sometieron a prueba los extractos EERo y EERu, que presentaron mayor actividad antimicrobiana en disco, junto con los extractos EMCN y EMCNd, destacados por su mayor actividad antioxidante, para determinar su capacidad para inhibir Tablas 16, 17, 18 y 19.

EXTRACTO EERo						
TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio de Absorbancias	% INHIBICIÓN
<i>H. pylori</i>	----	2.303	2.361	2.291	----	----
GENTAMICINA	----	0.412	0.393	0.447	----	----
ICC+ EtOH	----	0.583	0.915	0.645	----	----
2.1	3	0.455	0.368	0.366	0.396	82.791
2.2	1	2.385	2.306	2.777	2.489	-8.091
2.3	0.5	0.929	2.336	1.167	1.477	35.852

Tabla 16. Resultados del ensayo de inhibición de biofilm causada por el extracto de EERo.

EXTRACTO EERu						
TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio de Absorbancias	% INHIBICIÓN
<i>H. pylori</i>	----	2.303	2.361	2.291	----	----
GENTAMICINA	----	0.412	0.393	0.447	----	----
ICC+ EtOH	----	0.583	0.915	0.645	----	----
3.1	3	----	2.339	2.384	2.362	-2.540
3.2	1	2.338	2.43	2.337	2.368	-2.837
3.3	0.5	----	2.368	2.199	2.284	0.847

Tabla 17. Resulta del ensayo de inhibición de biofilm causada por el extracto de EERu.

EXTRACTO EMCN						
TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN (mg/mL)	Absorbancia1	Absorbancia2	Absorbancia 3	Promedio de Absorbancias	% INHIBICIÓN
<i>H. pylori</i>	----	2.303	2.361	2.291	----	----
GENTAMICINA	----	0.412	0.393	0.447	----	----
ICC+ EtOH	----	0.583	0.915	0.645	----	----
5.1	5	1.42	2.383	2.457	2.087	-406.472
5.2	2	2.294	2.116	2.352	2.254	-447.087
5.3	0.5	1.975	1.144	2.328	1.816	-340.696

Tabla 18. Resulta del ensayo de inhibición de biofilm causada por el extracto de EMCNd.

EXTRACTO EMCNd						
TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio de Absorbancias	% INHIBICIÓN
<i>H. pylori</i>	----	2.303	2.361	2.291	----	----
GENTAMICINA	----	0.412	0.393	0.447	----	----
ICC+ EtOH	----	0.583	0.915	0.645	----	----
6.1	5		1.928		1.928	-367.961
6.2	2	2.36	1.619	2.402	2.127	-416.262
6.3	0.5	2.492	1.907	2.374	2.258	-447.977

Tabla 19. Resulta del ensayo de inhibición de biofilm causada por el extracto de EMCN.

En la Figura 9. Se visualiza el porcentaje de inhibición sobre el biofilm que tuvieron cada uno de los extractos evaluados, en esta puede apreciarse que el único extracto que presentó actividad fue el EERo, así mismo se evidenció que la respuesta de inhibición es dosis-dependiente ya que a mayor concentración el porcentaje de inhibición de formación de biofilm aumenta.

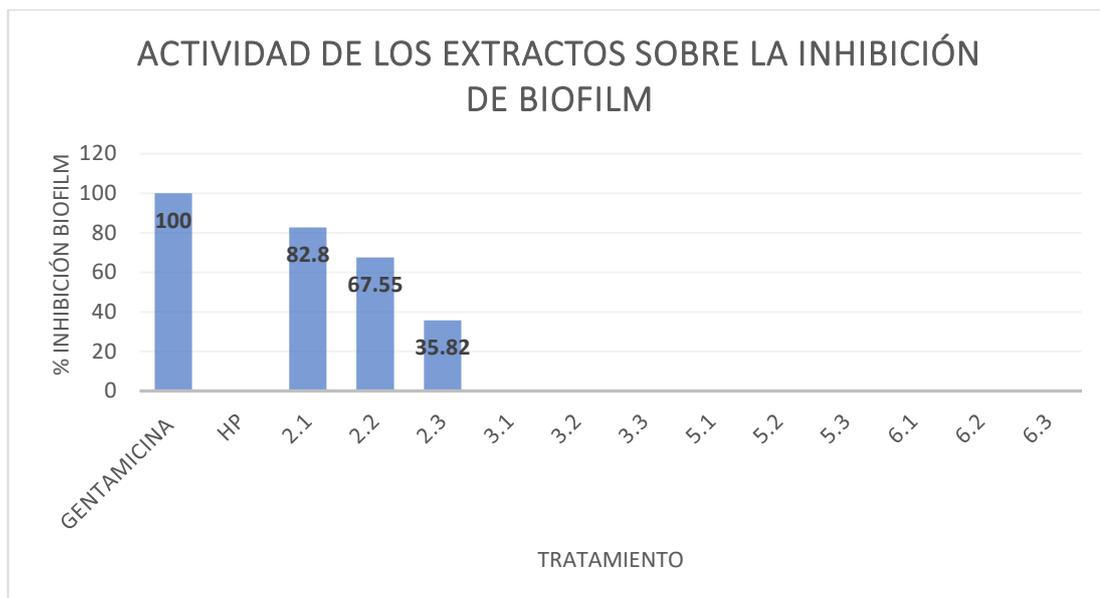


Figura 9. Porcentaje de inhibición de la formación del biofilm.

A los resultados obtenidos del EERo se les realizó un análisis estadístico PROBIT utilizando el programa estadístico SPSS para determinar la CI_{50} , los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 20.

TRATAMIENTO	χ^2	SIGNIFICANCIA	IC_{50} mg/mL
EERo	27.852	0.000b	1.599

Tabla 20. Resultados del Análisis Estadístico PROBIT para Determinar la CI_{50} del EERo

En la Imagen 6. Puede apreciarse visualmente el resultado del ensayo con cristal violeta evidenciando la inhibición de la formación de biofilm en los diferentes tratamientos probados.

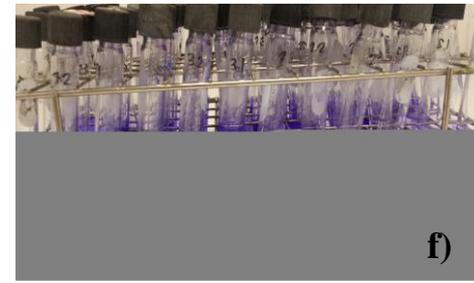
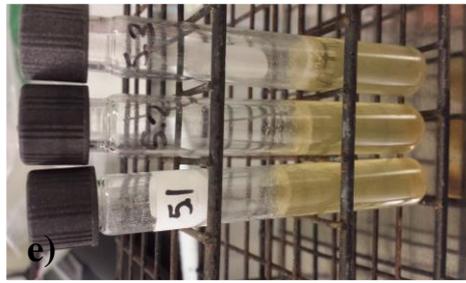
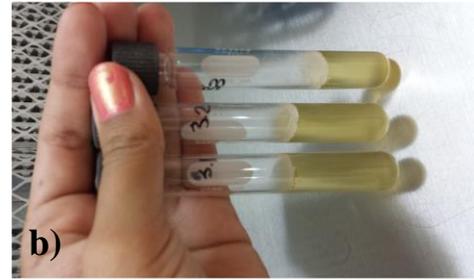
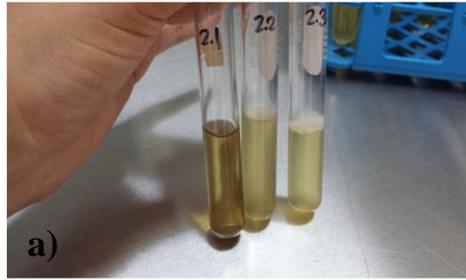


Imagen 6. Resultado del ensayo de inhibición de biofilm. En las fotografías se observa el desarrollo o ausencia de biofilm en los tratamientos: a) EERo, b) EERu, c) Gentamicina, d) EMCN, e)EMCNd y f) Todos los tratamientos con colorante.

9. DISCUSIÓN

9.1 Material vegetal y extracción

Actualmente es aceptado el hecho de que *Helicobacter pylori* es el agente causal de una infección gástrica, la cual se expresa a través de diversas formas clínicas entre ellas gastritis, úlceras y en su punto final cáncer, por lo que resulta evidente la necesidad de buscar abordar el problema con propuestas que además de curar las sintomatologías y efectos secundarios de los fármacos actualmente utilizados, ataquen de manera eficaz la infección, sean una alternativa a los antibióticos que ya han generado resistencia y que además tengan poco o ningún efecto secundario. La elección del material vegetal utilizado se realizó mediante la referencia bibliográfica y su uso en la medicina tradicional del país y la región para el tratamiento de afecciones gastrointestinales.

9.2 Identificación preliminar de grupos funcionales y metabolitos secundarios

En los extractos analizados los metabolitos secundarios encontrados en la mayoría fueron flavonoides, alcaloides, triterpenos, esteroides y compuestos que dentro de sus estructuras contienen oxidrilos fenólicos. Bonifacio *et al.* 2014 establecen una relación entre la presencia de metabolitos secundarios, como chalconas y flavonoides y la capacidad para inhibir, interrumpir o reducir la actividad de factores de virulencia bacteriana durante la infección. Estos compuestos pueden influir inhibiendo la acción de la ureasa, neutralizando factores de virulencia (VacA) e interfiriendo en la señalización. Algunos flavonoides han presentado actividad antimicrobiana directa *in vitro*. Además. Por lo tanto, se ha sugerido que moléculas como polifenoles de alto peso molecular, taninos y antocianidinas podrían ser prometedores para el desarrollo de terapias novedosas (Palacios-espinoza *et al.*, 2014).

9.3 Actividad antioxidante por el método de DPPH•

De acuerdo con (Kedare and Singh, 2011); la técnica de DPPH• es utilizada para evaluar la capacidad antioxidante de una amplia gama de muestras incluyendo extractos de plantas y compuestos de naturaleza fenólica, debido a que es rápida, confiable y económica. El DPPH• es un radical estable, soluble en metanol, presenta su máxima absorbancia a una longitud de onda de 517 nm y su actividad se basa en la

donación de hidrógenos. Además, en presencia de sustancias antioxidantes cambia su coloración de púrpura intenso a un leve amarillo, característica que puede medirse mediante el decremento de la absorbancia (Oliveira et al., 2008).

En este trabajo se valuó la actividad antioxidante de diversos extractos (Tabla 3). El EMCN tuvo la mayor actividad antioxidante, reportándose una CI_{50} de 2.75 $\mu\text{g/mL}$, mostrando tener una actividad antioxidante alta incluso mayor que la del control positivo, para el cual, se obtuvo una CI_{50} de 3.91 $\mu\text{g/mL}$; tanto el EMCN así como los demás extractos mostraron tener un efecto dosis dependiente.

Los valores obtenidos para el EERU ($CI_{50} = 237.843 \mu\text{g/mL}$) resultaron ser menores a los reportados por (Pacífico et al., 2016) en los cuales reportaron $CI_{50} = 21.1-117 \mu\text{g/mL}$ obtenidas del análisis de diferentes variedades del género *Ruta* así como diversa estacionalidad y lugares colecta, donde se observó que la actividad antioxidante se veía afectada por la temporada de colecta, siendo la primavera la estación en donde se refleja la mayor actividad (Pacífico et al., 2016), lo cual pudiera explicar por qué la actividad de la planta estudiada no fue tan buena, ya que fue colectada en otoño.

Por otro lado, el EERO mostró una CI_{50} de 31.653 $\mu\text{g/mL}$, contenido cercano al reportado por Manoela A. Pines *et al* 2017 de 22.46 $\mu\text{g/mL}$ y a los reportados por M. Maldini *et al* 2016 quien estudió *Romero* de diversas áreas de Sardinia y reporta actividades desde 26 a 217 $\mu\text{g/mL}$.

El EMG mostró una actividad antioxidante con una $CI_{50} = 235.863 \mu\text{g/mL}$, lo que resulta ser menor a lo reportado por Mary Obodai et al 2017, donde fueron evaluadas diversas especies de *Ganoderma silvestres* en la región de Ghana, obteniendo $CI_{50} = 380-450 \mu\text{g/mL}$; de igual manera Roberta Saltarelli *et al* 2015 reporta valores para *G. lucidum* de diversas colecciones con valores entre de $CI_{50} = 640-1500 \mu\text{g/mL}$. Mary Obodai *et al* 2017 menciona que la diferencias entre los resultados de sus estudios se ven afectados por factores bióticos como el tipo de cepa estudiada, así como factores abióticos como el lugar de la colecta, lo que puede justificar la diferencia entre los resultados obtenidos en este estudio y lo reportado por otros autores.

Finalmente el EMCT mostro una actividad antioxidante $> a 1000 \mu\text{g/mL}$ coincidiendo con lo reportado por Kawthar 2016 quien utilizó cáscaras de *Citrus paradisi* colectadas en El -Nubaria Egipto y etanol al 80% para la obtención del extracto, como

lo menciona M.K. Khan *et al* 2010, la capacidad antioxidante esta correlacionada con la cantidad de compuestos fenólicos presentes en la muestra lo que también concuerda para nuestros resultados ya que el EMCT fue de las muestras con menor cantidad de ellos.

9.4 Determinación de la toxicidad sobre *Artemia salina*

El ensayo de toxicidad mediante la letalidad de *A. salina* se basa en causar la muerte a nauplios del crustáceo cultivados en condiciones de laboratorio, para posteriormente determinar la LD₅₀ de las sustancias puestas a prueba. Los resultados del ensayo se muestran en la tabla 4, donde se señala para cada extracto su LD₅₀ y su clasificación tóxica según los lineamientos reportados por Fernández-Calienes y colaboradores en 2009; siendo no tóxico los EMG y EMCN, débilmente tóxico el EERo y moderadamente tóxicos los EMCT y EERu, según esta clasificación el 100% de los extractos evaluados se ubican en la categoría de menor toxicidad (>100 µg/mL). Logarto y colaboradores en 2001 realizaron trabajos donde correlacionaron la toxicidad aguda en ratones y el ensayo de letalidad de *A. salina* obteniendo buenos resultados, por lo que esta metodología puede ser un paso previo para determinar el nivel de toxicidad de extractos de plantas y otras sustancias y así determinar si es apto para su uso R. Hamidi y colaboradores 2014 mencionan que existe una buena correlación entre el ensayo con *A. salina* y el uso de modelos animales y señalan que es adecuado como una alternativa, señalan que el uso de *A. salina* para pruebas preliminares de toxicidad.

Los resultados obtenidos muestran el potencial de los extractos en estudio para su uso y aplicación debido a que la mayoría de ellos presentan toxicidades bajas, para los extractos con toxicidad moderada su uso se vería limitado y habrían de ensayarse nuevas dosis para determinar la concentración segura para su uso.

9.5 Citotoxicidad sobre linfocitos humanos

Se determinó la citotoxicidad de los extractos mediante el ensayo de viabilidad celular sobre linfocitos humanos, con la finalidad de determinar cambios en estas células causadas por la adición de los extractos que presentaron actividad anti- *Helicobacter pylori* en el ensayo de difusión en disco, el análisis de los resultados se realizó mediante ANOVA bifactorial para determinar si existían diferencias entre las absorbancias obtenidas de los extractos contra las obtenidas por el control,

concluyéndose que los extractos no poseen diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (linfocitos sin tratamiento), por lo que se puede concluir que los extractos no presentan actividad tóxica contra una línea celular normal de linfocitos, concordando con lo reportado por Mena Huerta et. al 2016, donde realizaron estudios con linfocitos y aceites esenciales de romero, especie para la cual tanto el aceite puro como todas las concentraciones utilizadas no presentaron toxicidad, mientras que para la ruda solamente el aceite puro presentó citotoxicidad, más no las diluciones de éste; mencionan que la actividad citotóxica puede deberse a la alta concentración de antioxidantes en el aceite, ya que en algunas células procariotas este tipo de sustancias pueden actuar como prooxidantes causando efecto tóxico, éste efecto podría causar cambios en la permeabilidad de la membrana u ocasionar cambios en la actividad enzimática de la mitocondria lo que conduce a la muerte celular.

9.6 Actividad antibacteriana

Se utilizó el método de difusión en disco para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos sobre *H. pylori*, observándose que, de los 6 extractos probados, sólo 2 de ellos mostraron poseer actividad contra la cepa, siendo el EERU el que demostró tener mejor actividad seguido por el EERO. Se ha reportado para extractos polares de hojas de romero zonas de inhibición con valores de 20mm y CIM de entre 1.25 y 10 mg/mL (B. Salehi et al., 2018) para el caso de extractos de ruda reporta zonas de inhibición de 10mm y MIC de entre 1.25 y 10 mg/mL, Samir M. Osman¹ et. al 2015, reporta también para *Ruta chalepensis* CIM menores a 5 mg/mL, valores similares a los obtenidos en el presente estudio.

El porcentaje de inhibición causado por los extractos de EERo y EERu fueron de un 34 y un 33 % siendo esta actividad de aproximadamente un tercio comparada con la de la gentamicina utilizada como control positivo.

“El porcentaje de inhibición ocasionado por los extractos puede verse limitado por las cuestiones de permeabilidad de la célula a compuestos de carácter polar como los que se encuentran en los extractos etanólicos probados lo que limita su pase al interior de la célula y condiciona por lo tanto su actividad” (Perales Flores, L. J. D. et.al., 2022).

9.7 Actividad sobre la formación de biofilm

La inhibición de la formación de biofilm fue una actividad que solo presentó el EERo. Xun Song *et.al* 2018 reportan la actividad de *R. officinalis* contra la formación del biofilm de bacterias como *S. mutans* y *P. gingivalis* a dosis de 0.1 % v/v, teniendo una inhibición del 50% del biofilm, mientras que para el biofilm formado por *H. pylori*, reportan actividad únicamente del extracto de *Curcuma longa*, con actividad sobre cepas de *H. pylori* AATCC 43504 con una dosis de 16 ug/mL.

Los datos sobre el uso de los extractos en estudio sobre la inhibición de la formación de biofilm por *H. pylori*, son limitados, por lo que los datos obtenidos abren una ventana de estudio a las propiedades del EERo.

10. CONCLUSIONES

El estudio llevado a cabo involucró la obtención de siete extractos de plantas utilizadas en la medicina tradicional del Noreste de México, para su obtención se utilizó la técnica de maceración asistida por sonicación, utilizándose diversos solventes orgánicos para tal fin.

Pudo observarse que el extracto con mayor rendimiento fue el EMCNd, seguido por el EMCT, mientras que el EERo mostró el menor rendimiento. Con referencia al tamizaje fitoquímico el EMCNd fue identificado como el extracto con la mayor cantidad de metabolitos secundarios presentes; las pruebas de respuesta positiva con mayor frecuencia incluyeron grupos carbonilo, $KMNO_4$ y oxidrilos fenólicos; al desengrasar el extracto EMCN, se eliminaron los carbohidratos detectables por la prueba de Molish y los alcaloides detectados por Dragendorff, mientras que se detectaron cumarinas y saponinas mediante la prueba de Salkowski.

Las pruebas de toxicidad realizadas a los extractos demuestran que los EMCN y EMG no poseen toxicidad sobre los nauplios de *A. salina* y se observó una relación dosis-dependiente en la mortalidad causada por los extractos en todos los casos; en cuanto a la evaluación de la toxicidad sobre linfocitos humanos, este ensayo indicó que los extractos EERo y EMCNd no poseen toxicidad significativa.

En cuanto a la actividad antioxidante de los extractos el EMCN mostró una actividad antioxidante destacada, con una CI_{50} menor que la de la vitamina C utilizada como control, este resultado posiblemente está relacionado con la presencia de compuestos como triterpenos, cumarinas y saponinas.

Referente a la actividad antibacteriana, se logró establecer el cultivo de la cepa de *H. pylori* en medio ICC sin suplementar; tanto el EERo como el EERu demostraron actividad *in vitro* contra la cepa, siendo el EERu el extracto con la menor Concentración Inhibitoria Mínima (CMI). Finalmente, se destacó que el extracto EERo fue el único extracto capaz de inhibir *in vitro* la formación de biofilm producido por la bacteria.

11. PERSPECTIVAS

Los extractos obtenidos de las plantas estudiadas resultaron poseer actividades muy variadas, entre las que destacan la actividad antibacteriana y antioxidante.

Para futuras investigaciones, resultaría relevante profundizar en la caracterización de los metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos, especialmente aquellos identificados en el EMCNd. Además, sería interesante explorar el potencial de otros solventes para extraer los compuestos de interés de las plantas estudiadas.

Considerando la ausencia de toxicidad observada en los extractos EERo y EMCNd sobre linfocitos humanos, sería valioso examinar su efecto sobre otras líneas celulares relevantes para la salud humana. También sería útil investigar más a fondo la actividad antioxidante del extracto EMCN y su potencial en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, así como su uso como ingrediente bioactivo en formulaciones alimenticias y cosméticas. Asimismo, sería esencial explorar los mecanismos subyacentes a la actividad antibacteriana contra *H. pylori*, así como la potencial aplicación de los extractos EERo y EERu como agentes terapéuticos alternativos para el tratamiento de la infección que causa la bacteria.

Por último, sería valioso profundizar en la comprensión del papel de los extractos de plantas en la inhibición de la formación de biofilm producido por *H. pylori*, con el fin de desarrollar estrategias más efectivas para combatir esta patología.

Estas perspectivas para futuras investigaciones podrían contribuir significativamente al desarrollo de nuevos productos y terapias basadas en extractos de plantas con aplicaciones en las áreas médica, alimenticia y cosmética.

12. REFERENCIAS

- Artemia, E. D. E., Herramienta, Ú., Para, D. E. T., Pérez, O. P., & Lazo, F. J. (2010). *Artículo reseña Ecotoxicólogos y químicos de Productos Naturales Artemia Bioassay : Useful Working Tool For Ecotoxicologists And Chemists Of Natural Products*. 22(1), 34–43.
- Asgarpanah, J., & Khoshkam, R. (2012). Phytochemistry and pharmacological properties of *Ruta Graveolens* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(23), 3942–3949. doi:10.5897/jmpr12.040
- Ayala, G., Escobedo-Hinojosa, W. I., Cruz-Herrera, C. F. De, & Romero, I. (2014). *Exploring alternative treatments for Helicobacter pylori infection*. 20(6), 1450–1469. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i6.1450>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity : A review \$. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bhakuni, D. S., & Rawat, D. S. (2005). Bioactive marine natural products. In *Bioactive Marine Natural Products*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/1-4020-3484-9>
- Bonifácio BV, dos Santos Ramos MA, da Silva PB, Bauab TM. Antimicrobial activity of natural products against *Helicobacter pylori*: a review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2014 Nov 19;13:54. doi: 10.1186/s12941-014-0054-0. PMID: 25406585; PMCID: PMC4243293.
- Chatterjee, A., Chatterjee, S., & Bandyopadhyay, S. K. (2012). *H . pylori-induced Gastric Ulcer : Pathophysiology and Herbal Remedy Review article H . pylori -induced Gastric Ulcer : Pathophysiology and Herbal Remedy*. January.
- CONAFORT. (n.d.). *SIRE-Paquetes Tecnológicos Juglans regia 2 2.3.2.1 Clasificación 2.3.2.2 Textura*. Retrieved January 25, 2022, from <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/932Juglans%20regia.pdf>
- Da, L., Clementino, S., & Rosado, F. R. (2011). Cultivo Submerso de *Ganoderma lucidum* (Curt. ex Fr.) Karst em Diferentes Meios de Cultura. *Revista Em Agronegócio e Meio Ambiente*, 4(1). <https://doi.org/10.17765/2176-9168.2011V4N1P>

- Djeddi, S., & Skocibusic, M. (2007). *Composition and antimicrobiological activity of the essential oil of Rosmarinus officinalis from Algeria Related papers Composition and antimicrobial activity of the essential oil of six Hypericum species from Serbia*. Abdolhossein Rustaiyan *CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF ARTEMISIA HER...* *IJESRT Journal Phytochemical and Antimicrobial Evaluation of the Essential Oil of Croatian Salvia brachyodon Vandas*.
- Domínguez, S.X.A., Rojas, M.G.N., De Lara, A.G., 1969. "Estudio químico preliminar de 31 cactáceas". *Rev Soc Quim, Méx.*, 13: 8-12.
- Fernández-Calienes Valdés, Aymé, Mendiola Martínez, Judith, Monzote Fidalgo, Lianet, García Parra, Marley, Sariego Ramos, Idalia, Acuña Rodríguez, Deyanira, Scull Lizama, Ramón, & Gutiérrez Gaitén, Yamilet. (2009). Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L.. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 61(3), 254-258.
- França Orlanda, J. F., & Nascimento, A. R. (2015). Chemical composition and antibacterial activity of *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) volatile oils, from São Luís, Maranhão, Brazil. *South African Journal of Botany*, 99, 103–106. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.03.198>
- Franklin Torres Jiménez, & Carlos Torres Bayona. (2016). Fisiopatología molecular en la infección por *Helicobacter pylori*. *Salud Uninorte. Barranquilla*, 32(3), 500–512. <http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v32n3/v32n3a13.pdf>
- Goodwin, C. S., Armstrong, J. A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M. D., Sly, L., McConnell, W., & Harper, W. E. S. (1989). Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(4), 397–405. <https://doi.org/10.1099/00207713-39-4-397/CITE/REFWORKS>
- Gupta V, & Kohli K. (2011). INTERNATIONAL JOURNAL OF PHYTOTHEAPY RESEARCH Review Article PHARMACOLOGICAL POTENTIALS OF CITRUS PARADISI-AN OVERVIEW. www.earthjournals.org

- Hamidi, Mentor & Jovanova, Blagica & Kadifkova Panovska, Tatjana. (2014). Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*. 60. 9-18. 10.33320/maced.pharm.bull.2014.60.01.002.
- Huang, Y., Onyeri, S., Siewe, M., Moshfeghian, A., & Madihally, S. V. 2005. *In vitro* characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 26(36):7616–7627.
- Jones, D. M., Curry, A., & Fox, A. J. (1985). An ultrastructural study of the gastric campylobacter-like organism “*Campylobacter pyloridis*.” *Journal of General Microbiology*, 131(9), 2335–2341. <https://doi.org/10.1099/00221287-131-9-2335/CITE/REFWORKS>
- Jones WP, Kinghorn AD. Extraction of plant secondary metabolites. *Methods Mol Biol*. 2012;864:341-66. doi: 10.1007/978-1-61779-624-1_13. PMID: 22367903.
- Kabubii, Z. N., Mbaria, J. M., & Mbaabu, P. M. (2015). Phytochemical Composition and Brine Shrimp Cytotoxicity Effect of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemical Composition and Brine Shrimp Cytotoxicity Effect of Rosmarinus Officinalis*, 11(1), 127–135. <http://asrjetsjournal.org/>
- Kannan R, Babu UV. Identity and pharmacognosy of *Ruta graveolens* Linn. *Anc Sci Life*. 2012 Jul;32(1):16-9. doi: 10.4103/0257-7941.113792. PMID: 23929988; PMCID: PMC3733200.
- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>
- Kumar, R., Gupta, A., Ganguly, R., Pandey, A.K. (2019). *In-vitro* Models to Assess Antioxidant Potential. In: Kumar, S., Egbuna, C. (eds) *Phytochemistry: An in-silico and in-vitro Update*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6920-9_12
- Kusters, J. G., Vliet, A. H. M. Van, & Kuipers, E. J. (2006). *Pathogenesis of Helicobacter pylori Infection*. 19(3), 449–490. <https://doi.org/10.1128/CMR.00054-05>

La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. (n.d.). Retrieved January 25, 2022, from <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed#:~:text=urgentemente%20nuevos%20antibi%C3%B3ticos-,La%20OMS%20publica%20la%20lista%20de%20las%20bacterias%20para,se%20necesitan%20urgentemente%20nuevos%20antibi%C3%B3ticos&text=La%20Organizaci%C3%B3n%20Mundial%20de%20la,peligrosas%20para%20la%20salud%20humana.>

Libralato, G. (2014). The case of *Artemia* spp . in nanoecotoxicology. *Marine Environmental Research*, 101, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.08.002>

Libralato, G., Prato, E., Migliore, L., Cicero, A. M., & Manfra, L. (2016). A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp . *Ecological Indicators*, 69, 35–49. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.04.017>

Lifeder. (22 de septiembre de 2023). *Ricinus communis*. Recuperado de: <https://www.lifeder.com/ricinus-communis/>.

Logarto Parra A, Silva Yhebra R, Guerra Sardiñas I, Iglesias Buela L. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*. 2001 Sep;8(5):395-400. doi: 10.1078/0944-7113-00044. PMID: 11695884.

Maldini, M., Montoro, P., Addis, R., Toniolo, C., Petretto, G. L., Foddai, M., ... & Pintore, G. (2016). A new approach to discriminate *Rosmarinus officinalis* L. plants with antioxidant activity, based on HPTLC fingerprint and targeted phenolic analysis combined with PCA. *Industrial crops and products*, 94, 665-672.

Malik, S., Moraes, D.F.C., do Amaral, F.M.M., Ribeiro, M.N.S. (2017). *Ruta graveolens*: Phytochemistry, Pharmacology, and Biotechnology. In: Jha, S. (eds) *Transgenesis and Secondary Metabolism. Reference Series in Phytochemistry*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28669-3_4

- Marina, D., Avella, G., Alberto, C., García, O., & Cisneros, A. M. (2008). Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. *Simposio Metrologia 2008*, 1–5.
- Moon, S. H., Lee, J. H., Kim, K., & Park, Y. (2013). Antimicrobial Effect of 7-O-Butylnaringenin , a Novel Flavonoid , and Various Natural Flavonoids against *Helicobacter pylori* Strains. <https://doi.org/10.3390/ijerph10115459>.
- Munteanu IG, Apetrei C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 25;22(7):3380. doi: 10.3390/ijms22073380. PMID: 33806141; PMCID: PMC8037236.
- Norma Oficial Mexicana Nom-007-Recnat-1997.* (n.d.). Retrieved January 25, 2022, from <http://siga.jalisco.gob.mx/assets/documentos/normatividad/nom007semarnat1997.htm>
- Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I. C. F. R., Bento, A., Estevinho, L., & Pereira, J. A. (2008). Total phenols , antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L .) green husks. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2326–2331. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.03.017>
- Osman, S. M., Gamil, L., & Ramadan, M. A. (2015). Bioactivity guided study of anti-helicobacter activity of *Ruta graveolens*. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 8(3), 1–5. www.ijarnp.org
- Pacifico, S., Piccolella, S., Galasso, S., Fiorentino, A., Kretschmer, N., Pan, S.-P., Bauer, R., & Monaco, P. (2016). Influence of harvest season on chemical composition and bioactivity of wild rue plant hydroalcoholic extracts. *Food and Chemical Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.02.009>
- Palacios-espinoza, J. F., Arroyo-garcía, O., García-valencia, G., Linares, E., Bye, R., & Romero, I. (2014). Evidence of the anti- *Helicobacter pylori* , gastroprotective and anti-in fl ammatory activities of *Cuphea aequipetala* infusion. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(2), 990–998. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.12.012>.

- Patel, S., & Goyal, A. (2011). Recent developments in mushrooms as anti-cancer Therapeutics: A review. *3 Biotech*, 2(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s13205-011-0036-2>.
- Pattiyathane, P., Vilaichone, R., & Chaichanawongsaroj, N. (2009). *Effect of curcumin on Helicobacter pylori biofilm formation*. 8(19), 5106–5115. <https://doi.org/10.5897/AJB09.860>
- Perales Flores, L. J. D., Verde-Star, D. M. J., Viveros Valdéz, D. J. E., Barrón-González, D. M. P., Garza-Padrón, D. R. A., Aguirre Arzola, D. V. E., & Rodríguez Garza, D. R. G. (2022). Actividad antioxidante, tóxica y antimicrobiana de *Rosmarinus officinalis*, *Ruta graveolens* y *Juglans regia* contra *Helicobacter pylori*. *Biotecnia*, 25(1), 88–93. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v25i1.177>
- Quave, C. L., Plano, L. R. W., Pantuso, T., & Bennett, B. C. (2009). *NIH Public Access*. 118(3), 418–428. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.05.005.Effects>
- Ricinus communis* - ficha informativa. (n.d.). Retrieved January 25, 2022, from <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/euphorbiaceae/ricinus-communis/fichas/ficha.htm>
- Salehi, B., Mishra, A. P., Shukla, I., Sharifi-Rad, M., Contreras, M. del M., Segura-Carretero, A., Fathi, H., Nasrabadi, N. N., Kobarfard, F., & Sharifi-Rad, J. (2018). Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. In *Phytotherapy Research* (Vol. 32, Issue 9, pp. 1688–1706). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/ptr.6109>
- Rakesh, M.R.; Kabra, M.P.; Rajkumar, V.S. Evaluation of Antiulcer Activity of Castor Oil in Rats. *Int. J. Res. Ayurveda Pharm.* **2011**, 2, 1349–1353.
- Salehi, P., Fakhari, A. R., Ebrahimi, S. N., & Heydari, R. (2007). Rapid essential oil screening of *Rosmarinus officinalis* L. by hydrodistillation-headspace solvent microextraction. *J*, 22, 280–285. <https://doi.org/10.1002/ffj>
- Scheuer, C., Boot, E., Carse, N., Clardy, A., Gallagher, J., Heck, S., Marron, S., Martínez-Alvarez, L., Masarykova, D., Mcmillan, P., Murphy, F., Steel, E., Ekdöm, H. van, & Vecchione, H. (2002). The discovery that *Helicobacter pylori*, a spiral bacterium, caused peptic ulcer disease. *Physical Education and Sport for Children and Youth with*

Special Needs Researches – Best Practices – Situation, 165–202.
<https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS>

Shahid, M., Shahzad, A., Sobia, F., Sahai, A., Tripathi, T., Singh, A., Khan, H. M., & Umesh. (2009). Plant natural products as a potential source for antibacterial agents: Recent trends. In *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry* (Vol. 8, Issue 3, pp. 211–225). Bentham Science Publishers B.V.
<https://doi.org/10.2174/187152109788680199>

Shuford, J. A., Steckelberg, J. M., & Patel, R. (2005). Effects of fresh garlic extract on *Candida albicans* biofilms [1]. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 49, Issue 1, p. 473). <https://doi.org/10.1128/AAC.49.1.473.2005>

Singh, R., & Khoshkam, G. (2015). Phytochemical and Pharmacological Investigations of *Ricinus communis* Linn. *Algerian Journal of Natural Products*, 3(1), 120–129.
doi:10.5897/jmpr12.040

Song, X., Xia, Y. X., He, Z. D., & Zhang, H. (2018). A review of natural products with anti-biofilm activity. *Current Organic Chemistry*, 22(8), 789-817. <https://doi.org/10.2174/1385272821666170620110041>

Swallah MS, Sun H, Affoh R, Fu H, Yu H. Antioxidant Potential Overviews of Secondary Metabolites (Polyphenols) in Fruits. *Int J Food Sci*. 2020 May 7;2020:9081686. doi: 10.1155/2020/9081686. PMID: 32455130; PMCID: PMC7229537.

Taha, N. A., & Al-wadaan, M. A. (2011). *Utility and importance of walnut , Juglans regia Linn : A review*. 5(32), 5796–5805. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.610>

Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med*. 2018 Apr 17;13:20. doi: 10.1186/s13020-018-0177-x. PMID: 29692864; PMCID: PMC5905184.

Términos - APMTM (n.d.). Retrieved January 25, 2022, from <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=ricinus-communis>

Tschiggerl, C., & Bucar, F. (2010). Investigation of the volatile fraction of rosemary infusion extracts. *Scientia Pharmaceutica*, 78(3), 483–492.
<https://doi.org/10.3797/scipharm.1004-23>.

- Vale, F. F., Oleastro, M., Vale, F. F., Molecular, C. D. P., & Re-, U. (2014). *Helicobacter pylori* Overview of the phytomedicine approaches against. 20(19), 5594–5609. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i19.5594>
- Veeresham, C. (2012). Natural products derived from plants as a source of drugs. In *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research* (Vol. 3, Issue 4, pp. 200–201). <https://doi.org/10.4103/2231-4040.104709>
- Vibrans, H. (2009). *Ricinus communis* L. Retrieved from <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/euphorbiaceae/ricinus-communis/fichas/ficha.htm>
- Yin, X., Gyles, C. L., & Gong, J. (2012). International Journal of Food Microbiology Grapefruit juice and its constituents augment the effect of low pH on inhibition of survival and adherence to intestinal epithelial cells of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* PT193. *International Journal of Food Microbiology*, 158(3), 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.022>