

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



VALORACIÓN *in vitro* DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS *Prosopis laevigata*, *Stenocereus marginatus* Y *Pimpinella anisum* SOBRE *Helicobacter pylori*

POR

LUIS ANGEL CONTRERAS HERNÁNDEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAestrÍA EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

2026

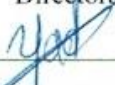
**VALORACIÓN *IN VITRO* DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE
EXTRACTOS *Prosopis laevigata*, *Stenocereus marginatus* Y *Pimpinella anisum*
SOBRE *Helicobacter pylori***

Comité de Tesis




Dra. María Porfiria Barrón González

Directora de Tesis



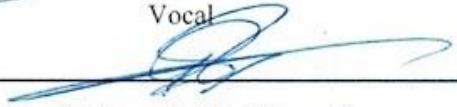
Dra. Yadira Quiñones Gutiérrez

Secretaria



Dr. Efrén Ricardo Robledo Leal

Vocal




Dr. Ramón Gerardo Rodríguez Garza

Vocal



Dra. María Julissa Ek Ramos

Vocal



Dra. Kazushka Arévalo Niño
Subdirectora de Posgrado



**SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO**

**VALORACIÓN *IN VITRO* DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE
EXTRACTOS *Prosopis laevigata*, *Stenocereus marginatus* Y *Pimpinella anisum*
SOBRE *Helicobacter pylori***

Comité de Tesis



Dra. María Porfiria Barrón González

Directora de Tesis



Dr. Frank Eduardo Meléndez Anzures

Director externo

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.

Ciencia y Tecnología

Secretaría de Ciencia, Humanidades,
Tecnología e Innovación



Agradezco a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación, al Laboratorio de Biología Celular y Genética de la Universidad Autónoma de Nuevo León por brindarme el apoyo económico y la infraestructura para realizar este proyecto

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, que sin su apoyo, comprensión y cariño no estaría escribiendo esto, no se han inventado las palabras precisas que hagan honor a lo agradecido que estoy con el universo de tener el privilegio de llamarme su hijo, y que mis logros son los suyos y cada noche que pasé estudiando, investigando y cada paso que doy en este camino, ustedes estaban a mi lado siendo el motor que me mueve a esto que me apasiona.

A la Dra. María Porfiria Barrón González y Dra. Yadira Quiñones Gutiérrez, por confiar en mí desde el principio, por encaminarme en este hermoso y humilde sendero que es la ciencia, gracias por el espacio que me han brindado en el laboratorio de Biología Celular, sé que siempre podré contar con el laboratorio como mi segunda casa, les agradezco sus pláticas, su calidez, sus observaciones certeras y por confiar y abrirme el espacio entre sus tan ocupados días.

A mi equipo de trabajo y a todos los colaboradores en el laboratorio de Biología Celular, no estaría hoy aquí sin ustedes, por completar las partes donde están mis flaquezas.

A la vida, por enseñarme del autocuidado, de la compasión y la autocomprensión, que está bien no estar bien todo el tiempo, que los procesos emocionales no se pueden contar con la misma medida que el tiempo mismo.

A mis padres,

A la vida

Y a los impetuosos y bienaventurados caminos que me depara el universo.

«Llegará una época en la que una investigación diligente y prolongada sacará a la luz cosas que hoy están ocultas. La vida de una sola persona, aunque estuviera toda ella dedicada al cielo, sería insuficiente para investigar una materia tan vasta [...]. Por lo tanto, este conocimiento sólo se podrá desarrollar a lo largo de sucesivas edades. Llegará una época en la que nuestros descendientes se asombrarán de que ignoramos cosas que para ellos son tan claras.. Muchos son los descubrimientos reservados para las épocas futuras, cuando se haya borrado el recuerdo de nosotros. Nuestro universo sería una cosa muy limitada si no ofreciera a cada época algo que investigar... La naturaleza no revela sus misterios de una vez para siempre.»

Séneca. *Questiones naturales*, libro 7, siglo I

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	12
2. INTRODUCCIÓN.....	13
3. ANTECEDENTES.....	15
3.1 <i>Helicobacter pylori</i>	15
3.1.1 Historia.....	15
3.1.2 Generalidades de la bacteria	16
3.1.3 Patogenicidad.....	17
3.1.4 <i>H. pylori</i> y prevalencia.....	19
3.1.5 <i>H. pylori</i> y enfermedad.....	19
3.1.6 Tratamiento contra <i>H. pylori</i>	20
3.2 Material vegetal	21
3.2.1 <i>Stenocereus marginatus</i>	22
3.2.2 <i>Pimpinella anisum</i>	24
3.2.3 <i>Prosopis laevigata</i>	25
3.2.4. Toxicidad sobre <i>Artemia salina</i>	27
3.3 Nanotubos	28
4. JUSTIFICACIÓN	30
5. HIPÓTESIS.....	31
6. OBJETIVO.....	31
6.1 OBJETIVOS PARTICULARES	31
7. MATERIAL Y MÉTODOS	32
7.1 Material biológico	32
7.1 <i>Helicobacter pylori</i>	32
7.2. <i>S. marginatus</i>, <i>P. laevigata</i> y <i>P. anisum</i>	33
7.2.1 Procesamiento del material vegetal	33
7.3 Activación y mantenimiento de bacterias	33
7.2.1 Caldo MPT	33
7.3 Cinética de crecimiento	34
7.3.1 Preparación de soluciones a base de extractos.....	34
7.3.2 Pruebas fitoquímicas.....	34

7.3.3 Ensayo de citotoxicidad	37
7.3.4 Ensayo de toxicidad de los extractos etanólicos sobre <i>Artemia salina</i>	39
7.4 Bioensayos.....	40
7.4.1 Evaluación de la actividad biológica de los extractos etanólicos de <i>S. marginatus</i> , <i>P. laevigata</i> y <i>P. anisum</i> sobre el crecimiento de <i>H. pylori</i>	40
7.5 Determinación de la Concentración letal media (CL50)	41
7.6 Análisis Estadístico	42
7.6.1 Diseño experimental	42
7.8. Nanotubos	43
8. RESULTADOS	46
8.1. Materia vegetal.....	46
8.1.1 Determinación de grupos funcionales en los extractos etanólicos de <i>S.</i> <i>marginatus</i> , <i>P. laevigata</i> y <i>P. anisum</i>	46
8.2 <i>Helicobacter pylori</i>.....	46
8.2.1 Morfología macroscópica	46
8.2.2 Cinética de crecimiento	47
8.3 Actividad biológica de los extractos etanólicos de <i>S. marginatus</i>, <i>P. laevigata</i> y <i>P.</i> <i>anisum</i> sobre <i>H. pylori</i>.	48
8.4 Caracterización morfológica de nanotubos de TiO₂.....	51
9. CONCLUSIONES.....	54
10. BIBLIOGRAFÍA.....	55

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

cm	Centímetros
DMSO	Dimetil sulfoxido
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
EDTA	Ácido Etilendiamin-Tetra-Acético
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
g	Gramos
kg	Kilogramos
mg	Miligramos
mL	Militros
Mm	Milímetros
MON	Nanotubos de óxido mixto
MTT	3-(4,5-dimetil tiazol-2-y1)-5-diphenyl tetrazolium bromide
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>P. laevigata</i>	<i>Prosopis laevigata</i>
<i>S. marginatus</i>	<i>Stenocereus marginatus</i>
<i>P. anisum</i>	<i>Pimpinella anisum</i>
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
Pl EE	Extracto etanólico de <i>Prosopis laevigata</i>
Sm EE	Extracto etanólico de <i>Stenocereus marginatus</i>
Pa EE	Extracto etanólico de <i>Pimpinella anisum</i>
UFC	Unidad formadora de colonia

UFC/mL	Unidad formadora de colonia por mililitro
HCl	Ácido Clorhídrico
N	Normalidad
NaOH	Hidróxido de sodio
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
RBP	Recuento bacteriano en placa
ATCC	American Type Culture Collection
NH ₄ F	Fluoruro de amonio
HF	Ácido fluorhídrico
HNO ₃	Ácido nítrico
V	Voltio
M	Molaridad
TiO ₂	Óxido de titanio

VALORACIÓN *in vitro* DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS *Prosopis laevigata*, *Stenocereus marginatus* Y *Pimpinella anisum* SOBRE *Helicobacter pylori*

1.RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria gramnegativa helicoidal, microaerofílica que posee una especial capacidad para sobrevivir en uno de los lugares más complicados en nuestro organismo: el estómago. *H. pylori* representa problemas para el epitelio gástrico, la mucosa estomacal activa una respuesta inmune e inflamatoria al estimular la producción de citocinas mediante las células epiteliales, esta respuesta da origen a un proceso inflamatorio crónico que trae por consecuencia el desarrollo de enfermedades gástricas severas tales como gastritis crónica atrófica, úlcera péptica o úlcera duodenal, cuando esta infección se vuelve crónica. También existe la evidencia de cepas altamente resistentes a la antibioticoterapia empleada en los esquemas terapéuticos usados en gastroenterología. En México se encuentra una basta cantidad de especies vegetales con potencial antimicrobiano, debido a los fitometabolitos secundarios que poseen, por ello en este trabajo se planeta como objetivo obtener fitoextractos de *Proposis laevigata*, *Pimpinella anisum* y *Stenocereus marginatus* y evaluar su actividad celular sobre cultivos de *H. pylori* e identificar los grupos funcionales, actividad tóxica, actividad citotóxica y observación de alteraciones al microscopio de barrido, posteriormente elaborar nanotubos de TiO₂ funcionalizados con el fitoextracto que haya presentado mayor actividad anti *H. pylori* y menor citotoxicidad, así como determinación de moléculas inhibidoras de *H. pylori* a microscopio de barrido.

2. INTRODUCCIÓN

H. pylori es una bacteria gramnegativa helicoidal, microaerofílica que presenta de dos a seis flagelos, es considerado un microorganismo exigente ya que requiere de medios de cultivos enriquecidos para su crecimiento, puede causar infecciones entéricas a nivel gástrico y duodenal. Fue aislada por primera vez por Barry J. Marshall y J. Warren en 1982 (Warren JR. & Marshall BJ., 1983) fue descubierta accidentalmente por la incubación prolongada de un cultivo puro de la mucosa gástrica humana (Marshall BJ, et al., 1984).

H. pylori posee una especial capacidad para sobrevivir en uno de los lugares más complicados en nuestro organismo: el estómago, este presenta un pH inferior a 4 (Cervantes García E., 2016). La naturaleza ácida del estómago es uno de los mecanismos de defensa de nuestro organismo en contra de microorganismos ingeridos mediante alimentos. Son escasos los organismos que logran desarrollarse en un ambiente tan ácido. A pesar de ello, este microorganismo presenta factores de patogenicidad que le confieren la capacidad de adaptabilidad al medio, debido a que es capaz de producir sustancias que neutralizan los ácidos formando una capa protectora a su alrededor, lo que le permite al microorganismo diseminarse dentro de la pared gástrica hasta encontrar un sitio al cual adherirse (Kuster, JG. *et al.* 2006).

Cuando *H. pylori* presenta problemas para el epitelio gástrico, la mucosa estomacal activa una respuesta inmune e inflamatoria al estimular la producción de citocinas mediante las células epiteliales. Esta respuesta da origen a un proceso inflamatorio crónico que trae por consecuencia el desarrollo de enfermedades gástricas severas tales como gastritis crónica atrófica, úlcera péptica o úlcera duodenal (Crowe S.E., 2019). Una vez que el microorganismo coloniza el epitelio gástrico, la infección se vuelve crónica, *H. pylori* es considerado como principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades de mayor mortalidad significativa tales como el desarrollo de linfoma derivado del tejido linfoide asociado a mucosa gástrica (MALT) y adenocarcinoma gástrico (López Vidal y Ponce de León, 2006)

Este microorganismo ha sido aislado de saliva, heces y placa dental de los pacientes ya sean asintomáticos o sintomáticos, lo que puede sugerir una vía gastro-oral, fecal-oral o oral-oral como transmisión e inoculación (Palomino Carmargo C. y Tomé Boschian E., 2012). Otros medios posibles de transmisión pueden incluir la ingesta de agua o alimentos contaminados o incluso el traspaso de fluidos a través de fómites de forma oral con una persona infectada.

Por otro lado, el aumento de la resistencia a los antibióticos y las complicaciones específicas son los mayores problemas de las terapias médicas utilizadas, los cuales demandan la búsqueda de nuevos compuestos, especialmente de fuentes naturales como lo son las plantas medicinales (Zahra Hosseininejad, *et al.*, 2011).

Se ha reportado desde hace varios años, que existen compuestos como polifenoles, flavonoides y glucosinolatos que presentan propiedades bioactivas, atribuidas a las plantas de los cuales se obtienen (Avaz, *et al.*, 2008 y Hu, *et al.*, 2004). A nivel mundial, se reportan cada vez más, una gran variedad de compuestos con actividad anti-*Helicobacter pylori in vitro*, destacándose flavonoides, taninos, cumarinas, terpenos, quinolonas, saponinas y alcaloides. Sin embargo, sólo a muy pocos de ellos se les ha demostrado que mantienen su actividad *in vivo* (Palacios, *et al.*, 2011).

La presente investigación está enfocada a la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de *Stenocereus marginatus* (cactus-tallo), *Prosopis laevigata* (hojas) y *Pimpinella anisum* (semilla) sobre *H. pylori* e identificar parcialmente los grupos funcionales, actividad tóxica y citotóxica y posteriormente elaborar nanotubos funcionalizados con el extracto que haya presentado mayor inhibición sobre *H. pylori* y menor citotoxicidad para evaluar la eficacia de la liberación del extracto en los nanoestructurados.

3. ANTECEDENTES

3.1 *Helicobacter pylori*

3.1.1 Historia

En los años de 1970, el médico Robin Warren realizó diversas investigaciones histológicas de muestras de biopsias gástricas de pacientes con gastritis crónica, descubriendo que, mediante ciertas técnicas de recolección de tejidos, existía en ellos una bacteria que predominaba en todas las lesiones histológicas de gastritis (Alban Briones, M.C., 2018), hasta ese entonces se creía que ningún microorganismo podía sobrevivir al ambiente altamente ácido del estómago.

Tiempo después, en 1981 el médico Barry Marshall complementó sus trabajos de investigación, demostrando que en muestras de mucosa gástrica de pacientes sanos no se encontraba presente el microorganismo demostrando así que solo se encontraba en mucosa gástrica inflamada. Marshall continuó apoyando a Warren al tratar de aislar y cultivar dicha bacteria, a la cual se le dio el nombre de *Campylobacter pylori*, por su parecido morfológico a dicho género y por su localización principal en la región antro pilórica del estómago. (Pajares & Gisbert, 2006).

Este nuevo microorganismo había sido incluido de manera provisional en el género *Campylobacter*, con los miembros de este género compartía una morfología espiral, capacidad de desarrollarse en ambientes microaerófilos, la posibilidad de crecer en medios de cultivos. Sin embargo, diferían en la presencia de múltiples flagelos en uno de los extremos y en el alto contenido de la enzima ureasa (Jones et al. 1985).

Debido a ello eran necesarios nuevos estudios moleculares para determinar la ubicación taxonómica del microorganismo, ello para demostrar que *Campylobacter pylori* era un miembro realmente diferente a todos los del género *Campylobacter* sp., ya que presentaba características morfológicas y bioquímicas más parecidas al nuevo género *Helicobacter*. En 1989, con la base científica de los datos existentes, publican un artículo en el que expuso los hechos que avalaron el cambio de nombre de

Campylobacter a *Helicobacter pylori*. Desde entonces, este nombre ha sido reconocido y aceptado por la comunidad científica de todo el mundo (Goodwin et al. 1989).

3.1.2 Generalidades de la bacteria

Helicobacter pylori es una bacteria gramnegativa, usualmente en forma de espiral (de donde deriva su nombre), que puede ser convertida en células cocoides, bajo un ambiente hostil (Boyanova, *et al.*, 2011). Esta bacteria presenta varias características estructurales y morfológicas que favorecen su penetración dentro de la mucosa y consecuentemente la colonización de la cavidad gástrica y la mucosa del duodeno humano (Umamaheshwari y Jain, 2004), Figura 1.

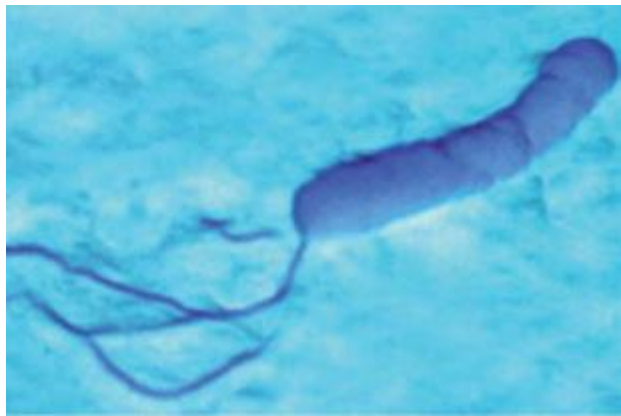


Figura 1. *Helicobacter pylori*

Cervantes-García, E. (2016)

Clasificación taxonómica de *H. pylori*

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

3.1.3 Patogenicidad

Sus mayores factores de virulencia residen en 4 a 6 flagelos que potencian su movilidad, la producción de ureasa, la secreción de fosfolipasa, la producción de citotoxina y su habilidad de adherencia a las células blanco (Boyanova, *et al.*, 2011; Umamaheshwari y Jain, 2004), Figura 2.

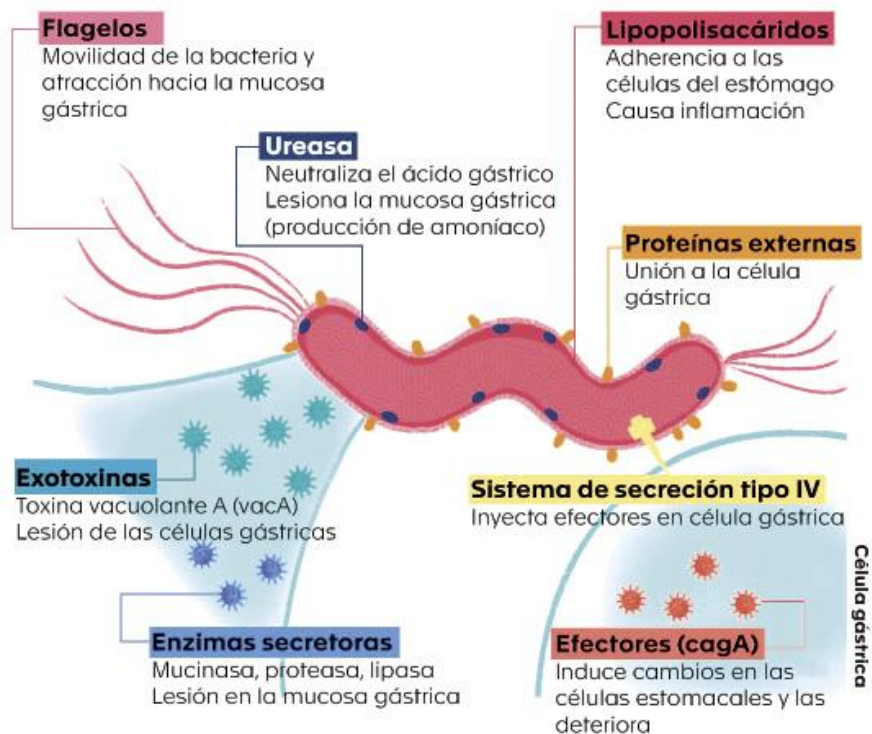


Figura 2. Factores de virulencia de *Helicobacter pylori*

Estos factores de virulencia permiten su movilidad a través de la mucosa gástrica y la colonización de la superficie situada entre las células epiteliales y la capa de mucosa (Umamaheshwari y Jain, 2004; Jang, *et al.*, 1999), Figura 3.

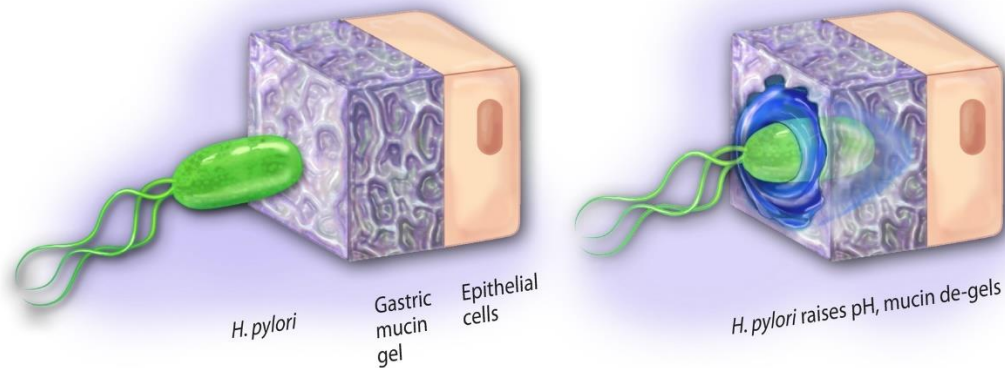


Figura 3. *Helicobacter pylori* atravesando la mucosa gástrica

sepeap.org/helicobacter-pylori-tratar-o-no-tratar/

Las células que recubren el epitelio gástrico se encuentran protegidas por una capa de moco que logra un espesor aproximado de 300um, esta barrera evita que microorganismos logren llegar a las células que recubren el epitelio y poder colonizarlo (Veleda, X., & Buela-Salazar, L. M. 2020), *H. pylori* requiere penetrar la capa mucosa, para ello la movilidad dada por sus flagelos cumplen un papel fundamental. Además, la motilidad bacteriana acciona de manera quimiotáctica a diferentes moléculas presentes en la capa mucosa y en el epitelio gástrico, tales como urea, cloruro de sodio, bicarbonato de sodio y otros aminoácidos (Gu, H. 2017).

3.1.4 *H. pylori* y prevalencia

En México, el promedio nacional de prevalencia de anticuerpos contra *H. pylori* en la población general es del 66% (Alvarado C., 2013). Asimismo, la mortalidad por cáncer gástrico ha aumentado de 4.5 a 6.5 por cada 100,000 habitantes en un lapso aproximado de diez años, comparando datos de 1980 con cifras más recientes (Ladrón de Guevara, L., 2019)

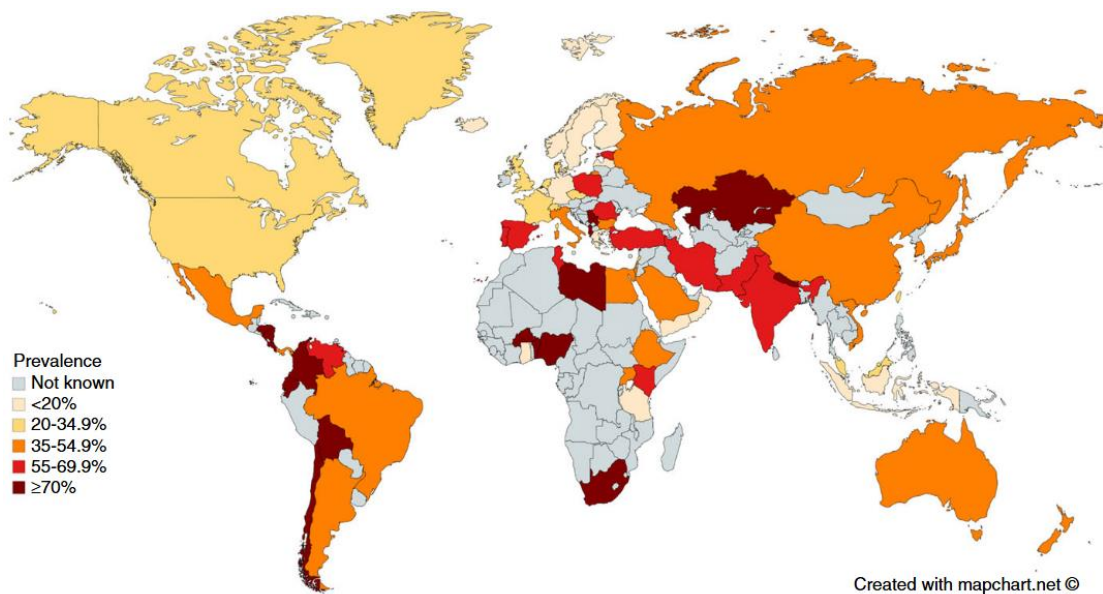


Figura 4. Mapa de prevalencia mundial de *H. pylori* a nivel mundial, destacando la prevalencia entre 35 a 54% en México según los más recientes reportes. (M. Zamani et al., 2018)

3.1.5 *H. pylori* y enfermedad

Condiciones como gastritis atrófica, dispepsia, úlcera péptica, y adenocarcinoma gástrico, son usualmente asociadas con una infección de *H. pylori* (Covacci, et al., 1999). De hecho, *H. pylori* ha sido designada como carcinógeno de clase I por la OMS, y su erradicación ha sido reportada como beneficiosa en la prevención de desórdenes gástricos, especialmente, úlceras y cáncer (IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 1994), Figura 4.

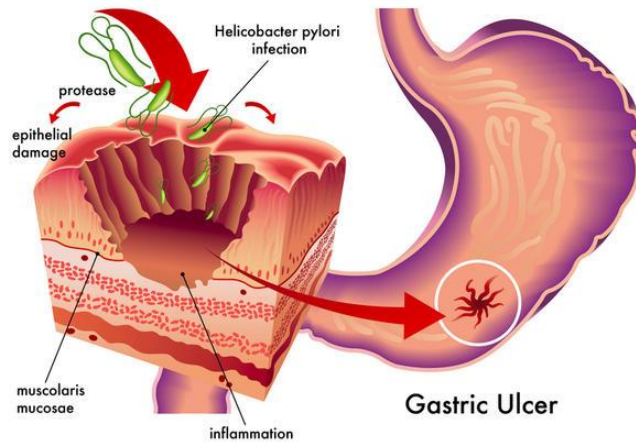


Figura 4. Desarrollo de la infección por *Helicobacter pylori*.

Cervantes-García, E. (2016)

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

3.1.6 Tratamiento contra *H. pylori*

Hay diversos esquemas para el tratamiento de una infección causada por *H. pylori*. Sin embargo, un tratamiento óptimo aún no ha sido definido, y no existe un tratamiento con un sólo antibiótico que pueda erradicarla. Históricamente, una combinación de varios antibióticos ha sido usada para la erradicación de la infección. Estos incluyen claritromicina, amoxicilina, metronidazol, tetraciclina, fluoroquinolones, tinidazol, entre otros. Estos antibióticos, generalmente se usan en combinación con agentes antisecretores, tales como bombas inhibidoras de protones, o con sales de bismuto. Varias combinaciones de estos agentes han mostrado ser efectivos con diferentes tasas de eficacia en la erradicación y tolerabilidad (Garza González, *et al.*, 2014).

Ceftriaxona

Es un antibiótico bactericida, de acción prolongada para uso parenteral, de la clase de las cefalosporinas de tercera generación, por lo que tiene acciones de amplio espectro en contra de organismos grampositivos y gramnegativos. El anillo betalactámico es parte de la estructura de las cefalosporinas, por lo tanto, la ceftriaxona es un antibiótico betalactámico. El modo de acción de estos antibióticos es la inhibición de la síntesis de la pared celular de las bacterias, específicamente por unión a unas proteínas bacterianas llamadas “proteínas ligandos de la penicilina (PBS)”. Este antibiótico se usa con frecuencia en combinación con antibióticos macrólidos y/o aminoglucósidos para el tratamiento de neumonía comunitaria y nosocomial. Es también el primer tratamiento de la meningitis bacteriana (Goodman y Gilman, 2006).

3.2 Material vegetal

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

Las plantas son ricas en una gran variedad de fitoquímicos, tales como taninos, alcaloides, terpenoides y flavonoides, entre otros, que se han aislado y caracterizado, y se ha comprobado que tienen propiedades antimicrobianas (Dorman y Deans, 2000; Talib y Mahasneh, 2010).

Aunque el mecanismo de acción y la eficacia de estos extractos crudos vegetales, aun no se ha validado completamente de manera científica, se sabe que sus componentes activos son los responsables de mediar respuestas importantes del hospedero (Cruz, *et al.*, 2007; Ruberto, *et al.*, 2000).

La prevalencia a nivel mundial, de este tipo de enfermedades infecciosas, causadas principalmente por bacterias, es un gran problema de salud pública (Zhang, *et al.*, 2006; Paterson, 2008). Aunado al reciente surgimiento de la resistencia a antibióticos (Egleston, *et al.*, 2010) y problemas de toxicidad relacionados, se limita el uso de antibióticos, provocando el resurgimiento en la investigación de la función antimicrobiana de las plantas contra cepas de bacterias resistentes (Alviano y Alviano, 2009).

3.2.1 *Stenocereus marginatus*

S. marginatus (Figura 5) es una cactácea, columnar, con tronco solitario, en ocasiones ramificado, costillas de 4 a 7, elevadas, anchas, con areolas confluentes, espinas centrales 1 a 3, amarillentas a gris, de 10 a 15 mm de longitud, espinas radiales de 5 a 9, de 2 a 4 mm de longitud, amarillentas a gris, flores rojizas, de 3 a 4 cm de longitud (Guillot, 2009).



Figura 5. *Stenocereus marginatus* (imagen propia)

La descripción taxonómica de *S. marginatus*, de acuerdo con Britton y Rose (1909), es la siguiente:

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Familia	Cactaceae
Subfamilia	Cactoideae
Género	Lophocereus
Especie	<i>L. marginatus</i>

En México, se le conoce como cactus, órgano, chilayo, pitayo y orégano de zopilote. El nombre del género proviene del griego stenós, que significa delgado, debido a que los tallos y los artículos son más delgados que en el resto de las plantas de tipo cereus.

Esta planta ramifica prácticamente desde la base; posee entre a y 6 costillas, aunque ocasionalmente se dan 7. Sus areolas son próximas entre sí, y están cubiertas por un fieltro de color marrón o grisáceo. Las espinas son escasas, cortas y caducas, sin embargo, en un comienzo son oscuras y rígidas. Produce flores de color blanco, que aparecen lateralmente. Presenta multiplicación por esqueje, es decir, si un tallo se injerta en otro o se introduce en la tierra, puede reproducirse o multiplicarse. Requiere forzosamente de condiciones de luz natural y calor.

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

Además, por su morfología se utilizan como “cercas vivas” alrededor de terrenos y corrales. Los segmentos de tallo pueden servir de esquejes que producen brotes múltiples si se colocan de manera horizontal en el suelo. De esta manera, saldrán brotes nuevos, verticales, a partir de las areolas localizadas hacia arriba, y las raíces se desarrollarán a partir de las areolas del tallo en contacto con el suelo. Se ha comprobado, que la propagación de esta manera asegura un crecimiento mucho más rápido que las plantas obtenidas a partir de semillas.

3.2.2 *Pimpinella anisum*

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



Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Familia	Apiaceae
Subfamilia	Apioideae
Género	<i>Pimpinella</i>
Especie	<i>P. anisum</i>

3.2.3 *Prosopis laevigata*

Numerosas especies del género *Prosopis* spp., se encuentran distribuidas y adaptadas a climas áridos y semiáridos, *P. laevigata* (Humb. et Bonpl. ex Willd) M. C. Johnston es el mezquite típico del centro y sur de México (Rzedowski 1988). Es un árbol que puede medir hasta 13 m de altura y con un diámetro normal de hasta 80 cm, sus hojas son pecioladas de con 1 a 3 pares de pinnas, cada una con 10 a 20 pares de folíolos sésiles (Figura 6); sus flores son sésiles o casi sésiles y sus frutos son en vaina o legumbre lineal (CONAFOR 2008).



Figura 6. Aspecto general de *Prosopis laevigata*.

(imagen propia)

Al mezquite se le atribuyen diversas propiedades y sus usos medicinales en la comunidad son utilizadas principalmente en ojos, piel y estómago: algunas partes de la planta como es el bálsamo de mezquite, obtenido de las hojas, se utiliza para combatir la disentería e infecciones en los ojos; y la corteza es utilizada como vomitivo-purgante (Ramírez et al. 2013).

Algunas investigaciones se han basado en el estudio de los extractos de diversas partes del árbol *P. laevigata* y estudiar su capacidad antibacteriana, por ejemplo, se ha demostrado que los extractos de las hojas y el tallo de *P. laevigata* en hexano, metanol y acetona presentaron actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y actividad antifúngica contra *C. albicans* (Salinas et al. 2009). Otra propiedad atribuida a *P. laevigata* es el efecto antihelmintico que posee el extracto *n*-hexánico de las hojas de esta planta (De Jesus et al. 2009).

Reino	Plantae
División	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Familia	Fabaceae

Subfamilia	Mimosoideae
Género	<i>Prosopis</i>
Especie	<i>P. laevigata</i>

3.2.4. Toxicidad sobre *Artemia salina*

Uno de los modelos biológicos más utilizados en las etapas preliminares de la investigación fitoquímica, es el bioensayo de letalidad frente a *Artemia salina* (Figura 7), el procedimiento consiste en exponer compuestos activos y/o extractos de plantas a nauplios de *Artemia salina*, para determinar valores de concentración letal 50 (CL₅₀), expresada en g/ml (Martínez y Beltrán, 1999). Sin embargo, los valores obtenidos de CL₅₀, no advierten una actividad biológica o fisiológica en particular; son indicadores de toxicidad a nivel celular que pueden orientar investigaciones más específicas. La toxicidad en vivo de un organismo animal puede usarse como método conveniente para el seguimiento y fraccionamiento en la búsqueda de nuevos productos naturales bioactivos. Este organismo es fácil de cultivar y manipular en laboratorio, es sensible a una gran variedad de tóxicos, y genera resultados confiables, en cuanto a alternativa poco costosa, sencilla y rápida. Puede ser usada de manera rutinaria en la investigación fitoquímica y permite crear una base para adelantar posteriores estudios, que brinden aplicaciones (Forero, 2002).

Este bioensayo es aplicable a compuestos con estructuras y modos de actividad diversos, lo que le otorga la característica de ser de amplio espectro, de ahí que sea usado como método de análisis para detectar residuos de pesticidas, micotoxinas, anestésicos y compuestos de tipo morfinico entre otros (Gualdrón y López, 1994).



Figura 7. *Artemia salina*

En este proyecto se han seleccionado para este propósito a *P. laevigata*, *S. marginatus* y *P. anisum* como posibles prospectos antimicrobianos. Todas estas plantas han sido poco estudiadas y con muy pocos reportes de actividad antimicrobiana, presentan amplia distribución en México y de fácil propagación. En este trabajo se obtendrán los diversos extractos etanólicos y evaluar su actividad anti-*Helicobacter pylori*, caracterizar los grupos fitoquímicos, evaluar la actividad tóxica y actividad citotóxica, teniendo como control la droga comercial ceftriaxona; así mismo, se realizará la obtención de la fracción activa con actividad antibacteriana y finalmente se realizará una caracterización parcial por espectroscopía acoplada a masas.

3.3 Nanotubos

La percepción científica y clínica de los nanotubos de óxido mixto (MON) y su potencial uso, por ejemplo, en ciencias biomédicas, aún se encuentra en desarrollo. Sin embargo, Sarraf *et al.* (2021) mencionan que, en química, un óxido mixto es un óxido con cationes de un solo elemento en diferentes estados de oxidación (Tipo I) o cationes de más de un elemento (Tipo II), y mezcla de diferentes óxidos en lugar de un óxido mixto M1-M2 (Tipo III). Este último tipo de MON se produce frecuentemente mediante anodización electroquímica, en la que es posible elaborar nanotubos con

morfologías ajustables electroquímicamente. El mismo autor menciona que la anodización electroquímica es una técnica que provoca una capa de óxido anódico de larga duración y resistente a la corrosión sobre una superficie metálica que protege el bulto de metal interno.

Estas estructuras han sido reportadas con propiedades importantes como superconductividad, magnetismo, ferroelectricidad, actividad catalítica y conductividad iónica.

4. JUSTIFICACIÓN

La infección con *H. pylori* representa un problema de salud pública mundial emergente, anualmente ocurren alrededor de siete millones de casos de enfermedades gástricas (López Vidal y Ponce de León, 2006), por lo consecuente deriva a cientos de miles de muertes derivadas de complicaciones con la infección. Actualmente el adenocarcinoma gástrico es la décimo cuarta causa de muerte a nivel mundial (American Cancer Society, 2019) y con el envejecimiento de la población podría esperarse que para futuras décadas produzca más muertes de las actuales.

Desde 1994 la Agencia internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) determinó a *Helicobacter pylori* como un carcinógeno tipo 1 en humanos, lo que le confiere el potencial de un carcinógeno definitivo (Cho, J et al, 2021)

En la actualidad, la colonización del estómago por *H. pylori* se considera un factor de riesgo para el desarrollo de úlcera péptica, gastritis crónica, adenocarcinoma gástrico, linfoma gástrico de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT), entre otras gastropatías. Este microorganismo afecta a gran parte de la población a nivel mundial en México se estima que podría estar presente hasta en el 55% de la población y a nivel mundial en un 44.3% (Zamani et al., 2018), diversos autores destacan la importancia de esta bacteria como un patógeno significativo, a pesar de que en ocasiones pueda considerarse un organismo comensal, su capacidad para causar enfermedades gástricas graves lo clasifica como un patógeno (Gu, H. 2017), debido a la alta prevalencia del microorganismo a nivel global, podría ser uno de los patógenos más exitosos de los que tenemos conocimiento.

Debido a la resistencia a la antibioticoterapia tradicional para *H. pylori*, esto se convierte en un verdadero problema prioritario de salud pública, por lo cual la OMS insta a la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos, que tengan potencial antibacteriano ante *H. pylori*. Una amplia búsqueda se ha extendido con el fin de identificar componentes específicos provenientes de fuentes naturales, tales como plantas y que puedan ser utilizadas como terapias alternativas debido a la presencia de metabolitos secundarios con potencial antimicrobiano. México es uno de los países que se

caracteriza a nivel mundial, por la gran diversidad de plantas endémicas, y se conoce que alrededor de 3000 plantas son utilizadas con fines medicinales. Un tercio de estas plantas se aprovechan específicamente en el tratamiento de padecimientos gastrointestinales. En los años recientes se han aumentado considerablemente los estudios acerca de la actividad medicinal de plantas sobre *H. pylori*. En este trabajo se seleccionaron las especies vegetales de *S. marginatus*, *P. anisum* y *P. laevigata* con el propósito de obtener extractos y evaluar su actividad anti-*Helicobacter pylori* y posteriormente elaborar nanotubos funcionalizados con el mejor extracto que haya presentado mayor inhibición sobre *H. pylori* y menor citotoxicidad.

5. HIPÓTESIS

Los metabolitos secundarios de *Propolis laevigata*, *Stenocereus marginatus* y *Pimpinella anisum* presentan actividad biológica sobre *Helicobacter pylori* (ATCC: 43504).

6. OBJETIVO

Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Propolis laevigata*, *Stenocereus marginatus* y *Pimpinella anisum* sobre *Helicobacter pylori*.

Caracterizar y funcionalizar los nanoestructurados de TiO_2 con los extractos de mayor actividad anti *Helicobacter pylori*.

6.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar cinética de crecimiento de *H. pylori*.
- Recolectar el material vegetal.
- Realizar las pruebas de identificación de grupos funcionales en los extractos etanólicos.

- Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de *Propolis laevigata*, *Stenocereus marginatus* y *Pimpinella anisum* sobre *H. pylori* (ATCC: 43504).
- Determinar la actividad tóxica de los extractos etanólicos *P. laevigata*, *S. marginatus* y *P. anisum*.
- Desarrollar y caracterizar de nanotubos de TiO₂.
- Evaluar liberación del extracto de la especie seleccionada con los nanotubos de TiO₂ funcionalizados.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de nanotubos funcionalizados con la especie seleccionada y evaluar la actividad anti *H. pylori* por la metodología de Kirby-bauer (ATCC: 43504).

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Material biológico

1. Muestra vegetal de *Stenocereus marginatus*
2. Muestra vegetal de *Propolis laevigata*
3. Muestra vegetal de *Pimpinella anisum*
4. Cepa de *Helicobacter pylori* (ATCC: 43504)
5. *Artemia salina*

7.1 Helicobacter pylori

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

7.2. *S. marginatus*, *P. laevigata* y *P. anisum*

7.2.1 Procesamiento del material vegetal

Las muestras vegetales se procesarán en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León

Para el procesamiento del material vegetal se procederá a un lavado el cual consistirá en enjuagar el material con agua corriente, hasta eliminar cualquier residuo ajeno a la materia vegetal. Posteriormente se extenderá el material y se dejará secar a temperatura ambiente, una vez seco se triturará empleando un mortero de mano.

La obtención de extractos etanólicos a partir de la materia vegetal se obtendrá agregando 350mL de alcohol etílico junto con la materia triturada, se mantendrá en matraces en agitación durante siete días a temperatura ambiente, después de siete días el filtrado se deja evaporar hasta secar a temperatura ambiente, se obtendrá el extracto mediante raspado de residuos y se almacenará en frascos de vidrio hasta su uso.

7.3 Activación y mantenimiento de bacterias

La cepa de *H. pylori* (ATCC: 43504) se mantiene en el cepario del laboratorio de Biología Celular en refrigeración hasta su uso, la cepa se retirará del refrigerador y se activa en medio Brucella Broth por 18 h a 37°C, este proceso se repetirá durante 3 días hasta obtener el crecimiento típico del microorganismo.

7.2.1 Caldo MPT

Se formulará el medio MPT (Barrón *et al* 2006) pesando los siguientes componentes: Extracto de levadura 2.5 g, NaCl 0.50 g, L-cisteína 0.5g, ácido ascórbico 0.05 g, K₂HPO₄ 0.25g, KH₂PO₄ 0.15g, citrato férrico de amonio 0.000142g y D-glucosa anhidra 5.00g; se mezclan todos los componentes, y se afora a 250 mL con agua purificada, se ajusta el pH a 7.00 con NaOH 12N, se coloca en alícuotas de 5 mL en tubos para cultivo de 13 x 100 mm con tapón de rosca, el medio se esteriliza en

autoclave por 15 min a 121°C, se deja temperar y enseguida se almacena a 4°C hasta su empleo. Se ajusta el pH a 7.00 con NaOH 12N. El medio se deja hervir por unos segundos, se coloca en alícuotas de 9 mL en tubos para cultivo de 13 x 100 mm con tapón de rosca y se esteriliza en autoclave por 15 min a 15 Lb de presión y 121°C. El medio se deja enfriar en los tubos a temperatura ambiente y enseguida se almacenan a 4°C hasta su empleo.

7.3 Cinética de crecimiento

A 9 tubos con caldo de cultivo con un volumen de 9 mL y un inóculo de 1 mL de bacterias, se incubarán a 37°C, se determina la absorbancia a 635 nm de cada uno de los tubos en un espectrofotómetro durante 12 h

7.3.1 Preparación de soluciones a base de extractos

Para realizar la solución madre de los extractos etanólicos de *S. marginatus*, *P. laevigata* y *P. anisum*; se disolverán en DMSO y se realizarán cálculos para la aplicación de las diferentes dosis.

7.3.2 Pruebas fitoquímicas

Al extracto etanólico de cada especie vegetal se les realizará un análisis fitoquímico, de acuerdo con Domínguez X, 1973., con la finalidad de identificar sus componentes químicos. Cada prueba se describe a continuación:

a) Insaturaciones

Prueba del KMnO₄: Se disolvió 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua, acetona o metanol y se añade, gota a gota, una solución de KMnO₄ al 2% en agua. La prueba es

positiva si se observa decoloración o formación de precipitado café en menos de 1 minuto, resultado de la formación de dióxido de manganeso.

b) Grupo carbonilo

Prueba de la 2,4-Dinitrofenilhidracina: De 1 a 10 mg, de la muestra se disuelven en etanol, se le añade una solución saturada de 2-4- dinitrofenilhidracina en HCl 6N; la formación de un precipitado amarillo o naranja, indica la presencia del grupo carbonilo.

c) Oxhidrilos fenólicos (taninos vegetales)

Prueba del FeCl₃: Se disuelven 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua o etanol y después se añaden unas gotas de cloruro de fierro al 12.5% en agua. La aparición de un precipitado rojo, azul-violeta o verde, es considerada positivo.

d) Esteroles y triterpenos

Prueba de Liebermann-Burchard: Se mezcla 1 ml de anhídrido acético y uno de cloroformo, se enfriarán a 0° y se les añade una gota de ácido sulfúrico. Se añade, gota a gota, este reactivo a la muestra, o su solución clorofórmica. Si hay formación de colores azul, verde, rojo, anaranjado, etc., los que cambian con el tiempo, la prueba será positiva. El orden y tiempo de aparición (0, 1, 5, 20, 60 minutos) tiene cierto valor diagnóstico; así, una coloración amarilla después de 15 minutos parece corresponder a C-14-metilo y una variación -7 insaturación. La prueba es positiva con esteroles que contienen 2 enlaces dobles conjugados, que los pueden formar por una o dos deshidrataciones con isomerización.

Prueba de Salkowski: Similar a la de Liebermann-Burchard, la muestra (1-2 mg) en contacto con 1.0 ml de ácido sulfúrico, se desarrollan colores amarillo o rojo para esteroles y metilesteroles.

e) Carbohidratos

Prueba de Molish: A 1-2 mg. de la muestra se le agrega, 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.

Prueba de las cumarinas: Se disuelve 1-2 mg de muestra en NaOH al 10%; si aparece una coloración amarilla que desaparece al acidular es positiva.

Prueba Lactonas: Se disuelven de 1-2 mg de muestra en solución alcohólica de NaOH al 10%. Un color amarillo o anaranjado que se pierde o desaparece al agregar unas gotas de HCl indica la presencia de un anillo lactónico.

f) Sesquiterpenlactonas

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

g) Flavonoides

Prueba del H₂SO₄: Una pequeña cantidad de muestra se disuelve en H₂SO₄ y se observa coloración amarilla para flavonoles; naranja-guinda, para flavonas; rojo-azuloso, para chalconas y rojo-púrpura, para quinonas.

h) Alcaloides

Prueba de Dragendorff: Modificación de Munier y Machelobuf. Se harán 2 soluciones. Para preparar la solución A, se disuelven en 0.85 g de nitrato de bismuto, en una mezcla de 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua. Para la solución B, se disuelven 8 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua.

El reactivo se prepara mezclando 5 mL de la solución A, 4 mL de la solución B y 100 mL de agua. El reactivo es estable por un año y la prueba es positiva para alcaloides al dar la placa coloración rojo o naranjas persistentes por 24 horas.

i) Saponinas

Prueba del bicarbonato de sodio: La sal se prepara al 10% en agua. Se disuelven de 1-2 mg de la muestra disuelta en agua o etanol y se le agregan de 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se agita ligeramente, luego se agregan 2-3 gotas de la solución de bicarbonato de sodio. La aparición de burbujas y su permanencia por más de 1 minuto indican la presencia de saponinas.

Prueba de Salkowski para saponinas: Se disuelven de 1-2 mg de la muestra en 1 mL, de cloroformo y se añade 1mL. de ácido sulfúrico. La prueba es positiva si hay aparición de color rojo.

j) Aromaticidad

Prueba del ácido sulfúrico-formaldehído: Se prepara una mezcla de 1 mL. de ácido sulfúrico concentrado con una gota de formaldehído. Se agregan de 1 a 5 mg de la muestra disuelta en disolvente no aromático, se añaden unas gotas de la mezcla anterior y si aparece un color rojo-violeta, la prueba es positiva (Treviño-Tamez, 2001).

7.3.3 Ensayo de citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad en eritrocitos se realizaron por lo propuesto por Burboa et al (2014), se extrajeron 5mL de sangre en tubos con anticoagulante EDTA. Posteriormente la sangre se centrifuga a 3000 g durante 5 min a 4 °C. El plasma contenido en el sobrenadante fue desechado y el paquete de eritrocitos se lavó con 1mL de solución Alsever (glucosa al 2.5 %, citrato de sodio al 0.8 %, disuelto en agua destilada estéril). Una vez lavados los eritrocitos se almacenaron en solución Alsever por periodos no mayores de 7 días a 4 °C.

Los eritrocitos mantenidos en la solución de Alsever fueron centrifugados a 3000 g durante 5 min a 4 °C. El plasma del sobrenadante se desecha y el paquete de eritrocitos se lavaron con 1mL de solución Alsever; el procedimiento se repete dos veces.

Se tomaron 100 μ L del pellet de eritrocitos y se diluyen en 10mL de solución Alsever, 150 μ L de esta suspensión se diluyeron con diferentes concentraciones de solución Alsever y extractos etanólicos de *S. marginatus*, *P. laevigata* y *P. anisum* para evaluar la actividad hemolítica.

Todas las muestras fueron incubadas en baño de agua regulado con agitación constante a 37 \pm 0.5 °C durante 30 minutos y centrifugadas a 3000 g durante 5 min/4 °C. La concentración de hemoglobina en el sobrenadante se cuantificó por la lectura de la absorbancia a 415 nm.

Los datos obtenidos en los ensayos se procesan con la siguiente fórmula:

$$\%H = \frac{Abs.Muestra - Abs.C -}{Abs.C + -Abs.C -}$$

Donde:

$\%H$ = Porcentaje de hemolisis o actividad antioxidante.

Abs.Muestra = Absorbancia de la muestra a 415 nm.

Abs.C+ = Absorbancia del control positivo a 415 nm.

Abs.C- = Absorbancia del control negativo a 415 nm.

Los resultados se analizarán con el programa estadístico OpenStat bajo un diseño de experimentos completamente al azar con tres repeticiones, se realizará un análisis de

varianza y una prueba de comparación múltiple de medias con el método de Tukey, se analizará cada extracto por separado, y con un nivel de significancia del 95 %.

7.3.4 Ensayo de toxicidad de los extractos etanólicos sobre *Artemia salina*

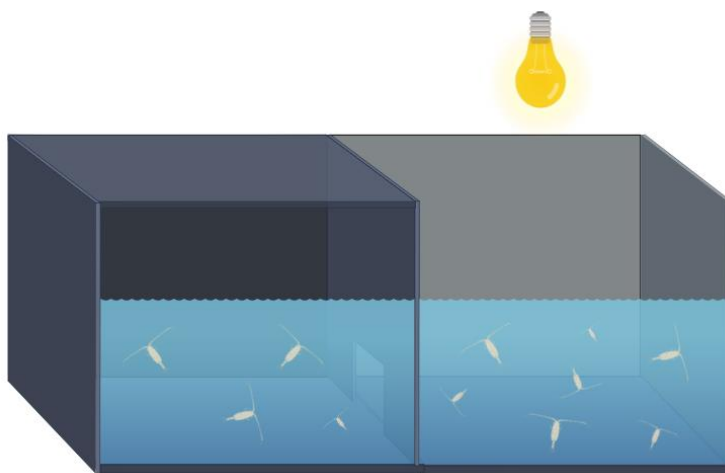


Imagen 8. Metodología para eclosión de *Artemia salina*

Se incubaron los huevecillos de *Artemia salina* en agua de mar artificial, preparada de la siguiente manera:

- 40 g de sal de mar
- 0.006 g de levadura de cerveza

se aforó a un litro de agua bidestilada y se ajustó el pH a 7.8.

Preparada la solución se incubaron 0.1 g de huevecillos de *A. salina* en el agua de mar artificial, colocados en un recipiente de plástico dividido por una pared intermedia con un espacio en la parte baja de 2 mm; se mantuvieron en condiciones de oscuridad y oxigenación. Uno de los compartimentos se mantuvo bajo luz con una lámpara de 20 Watts, ya que al eclosionar los nauplios son atraídos por la luz (Imagen 1)

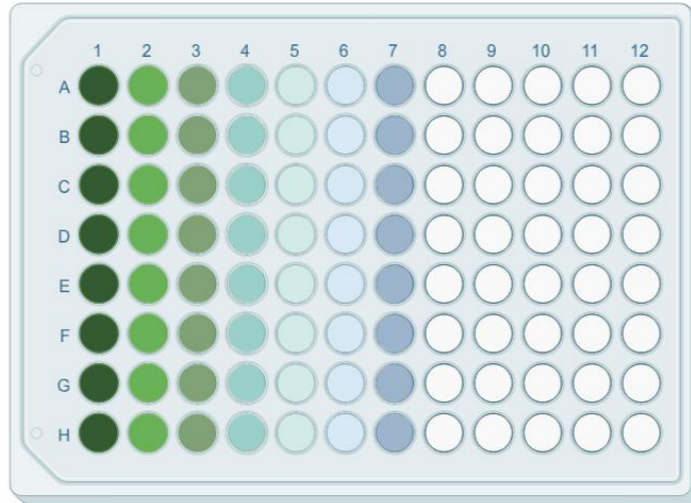


Imagen 9. Ensayo de toxicidad en placa de 96 pocillos

A las 24 horas, los nauplios fueron transferidos a otro recipiente y se mantuvieron en condiciones de oxigenación y temperatura de 22 a 29° C durante 24 horas. Posteriormente, en una microplaca de 96 pozos, fueron adicionados 100 µl de la suspensión de nauplios por pozo (aproximadamente 10 nauplios) más 100 µl de las diluciones de los extractos vegetales a probar. Las concentraciones a evaluar estuvieron en un rango de 10 a 1000 µg/ml (Imagen 2)

Como control positivo se utilizará Dicromato de Potasio a una concentración de 400 ppm, además de DMSO a las mismas dosis en que se manejarán en el bioensayo. Como control negativo se usará agua de mar.

A las 24 horas después de haber aplicado los extractos vegetales, se realizará el conteo de nauplios vivos por dosis, esto con ayuda de un microscopio estereoscópico.

7.4 Bioensayos

7.4.1 Evaluación de la actividad biológica de los extractos etanólicos de *S. marginatus*, *P. laevigata* y *P. anisum* sobre el crecimiento de *H. pylori*

a) Método turbimétrico: Para realizar el bioensayo de los diferentes extractos etanólicos de *S. marginatus*, *P. laevigata* y *P. anisum* (en tubos de 13X100), se les adicionará las distintas concentraciones de los extractos de la planta a evaluar, cada tubo se inoculará con 1mL de *H. pylori*, y se leerá cada tubo en 24 h en un espectrofotómetro a 635nm.

b) Bioensayo de diluciones y Técnica de RBP: a los tubos de 13x100 que se les realizará el método turbimétrico se les realizará diferentes diluciones a cada uno de los diferentes extractos etanólicos *S. marginatus*, *P. laevigata* y *P. anisum* a las diferentes concentraciones de las dosis (0.1, 1, 7 y 10 mg/mL); para realizar las diluciones se utilizará tubos de 13x100 con 9mL de solución salina al 0.85% y se les agregará 1mL de la de la mezcla de bacterias y los diferentes extractos de *S. marginatus*, *P. laevigata* y *P. anisum* con las diferentes dosis; ya realizadas las diluciones se realizará la técnica de vertido en placa, en cajas de Petri se les agrega 1mL de las diluciones de los diferentes extractos etanólicos, posteriormente a las cajas Petri se les vierte 15mL de agar MPT en condiciones estériles, se homogeniza en forma de 8 por ocho repeticiones y se deja solidificar el agar a temperatura ambiente, ya solidificado el agar se colocan en la incubadora a 37°C por 24 h, posteriormente se realiza el conteo de las colonias y se realiza un promedio de cada muestreo.

7.5 Determinación de la Concentración letal media (CL₅₀)

De los extractos etanólicos que se obtengan a partir de *S. marginatus*, *P. anisum* y *P. laevigata*, se evaluarán mediante la técnica de recuento bacteriano en placa (RBP) cinco concentraciones (0.01, 0.1, 1, 7 y 10 mg/mL) sobre el cultivo de *H. pylori* (ATCC:43504). Los valores obtenidos serán sometidos a una base de datos para realizar el análisis de datos por el método PROBIT (mediante el programa SPSS versión 17) para cada réplica mediante el análisis estadístico de regresión lineal empleando el programa Microsoft Excel 2017 y obtener directamente el valor calculado de la concentración letal media (CL₅₀) correspondiente a la concentración requerida para reducir a un 50% el crecimiento de *H. pylori* (ATCC:43504).

7.6 Análisis Estadístico

Los datos para determinar las concentraciones letales (CL_{50}) en los ensayos de toxicidad, y los bioensayos de determinación de actividad biológica sobre el crecimiento de *H. pylori* se analizarán mediante el análisis PROBIT. Se utilizará un diseño experimental estadístico completamente al azar en donde los datos de cuantificación se someterán a un Análisis de Varianza mediante el paquete de software estadístico SPSS versión 17.0, para determinar la diferencia significativa entre los métodos utilizados ($P < 0.05$), posteriormente obtener la diferencia significativa entre métodos los datos se someterán a una prueba de comparación múltiple de medias de Dunnet.

7.6.1 Diseño experimental

Para evaluar la actividad biológica de los extractos etanólicos de las especies vegetales a estudiar sobre el crecimiento de *H. pylori* se utilizará un diseño factorial de $3 \times 3 \times 4 \times 1 \times 1$ con tres repeticiones independientes por triplicado, así: se evaluará la actividad biológica del extracto etanólico de tres especies vegetales, evaluando cuatro dosis de cada extracto etanólico a partir de cada espécimen vegetal, será evaluada la actividad biológica sobre los cultivos bacterianos. Los datos se analizarán mediante análisis de varianza (ANOVA) para tres factores. Las diferencias entre los pares de medias de las variables que mostraron diferencias significativas se analizarán mediante la prueba de diferencia significativa de Tukey. El diseño se analizará con un nivel de confianza del 95%.

De acuerdo con el extracto que presente mayor actividad inhibitoria sobre *H. pylori* y menor citotoxicidad y toxicidad, se empleará para el desarrollo de nanotubos funcionalizados con dicho extracto etanólico, para lo cual se desarrollará la siguiente metodología (Sarraf *et al*, 2020).

7.8. Nanotubos

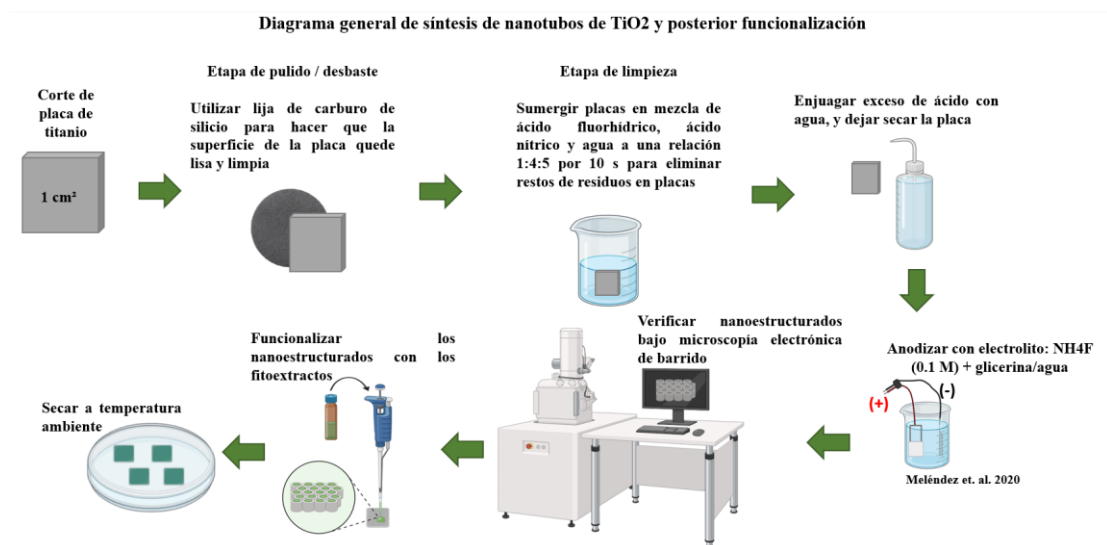


Figura 10. Esquema de síntesis de nanoestructurados.

a) Desarrollo de nanotubos

Se emplea titanio en forma de pequeñas placas

-Tratamiento térmico: Primeramente, las aleaciones se deben limpiar para evitar contaminantes, se realiza un proceso de decapado utilizando una mezcla de agua (H₂O), ácido nítrico (HNO₃) y ácido fluorhídrico (HF) en relación 5:4:1 durante 10 segundos. Posteriormente, debe enjuagarse cualquier resto de ácido que haya quedado en agua.

-Etapa de pulido o desabasto: Se emplean lijas de carburo de silicio según el grano que se necesite. La superficie de la placa debe quedar lisa y limpia totalmente, sin rastros de ningún material.

-Anodizado: Para realizar la técnica de anodizado se emplea una celda electroquímica de dos electrodos, en la que el ánodo es la aleación donde se pretende crecer la capa de óxido y el cátodo es una placa de platino, un material químicamente inerte en el baño de anodizado. Ambos electrodos se conectan a un circuito 28 eléctrico externo para establecer una diferencia de voltaje entre ellos mediante un alambre de cobre de 100 mm con una distancia de separación de 10mm.

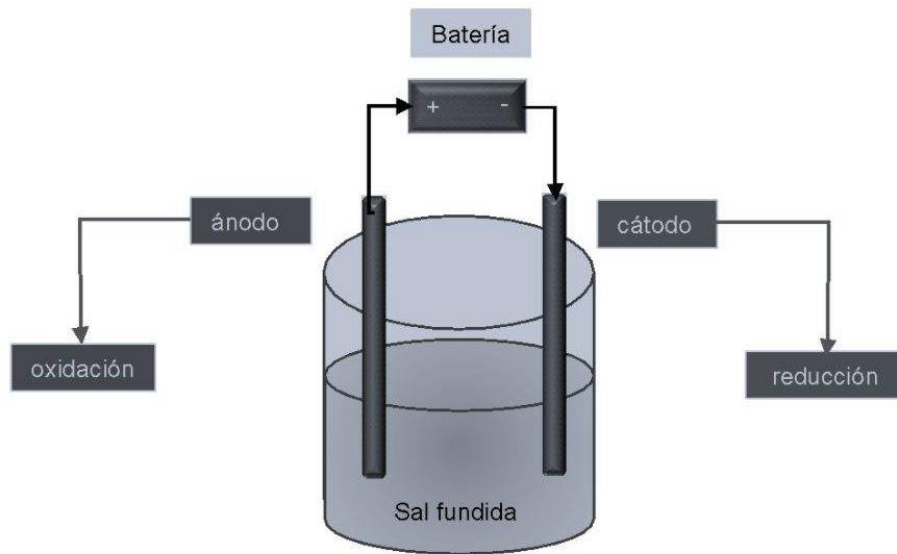


Figura11. Esquema de una celda electroquímica de dos electrodos empleada para la técnica de anodización

La estructura, composición y espesor del proceso de anodización varían en función de los diferentes parámetros del proceso mismo, para este proyecto se empleó una serie de parámetros estandarizados con solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a una concentración de 1M y NH_4F a una concentración de 0.25 M con un voltaje de 30V durante 30 minutos a temperatura ambiente.

El análisis morfológico de las aleaciones anodizadas se realizó con un microscopio electrónico de barrido marca FEI modelo Nova NanoSEMTM 200, el cual se encuentra en el laboratorio de nanomateriales de la facultad de ingeniería mecánico-eléctrica, FIME, de la UANL.

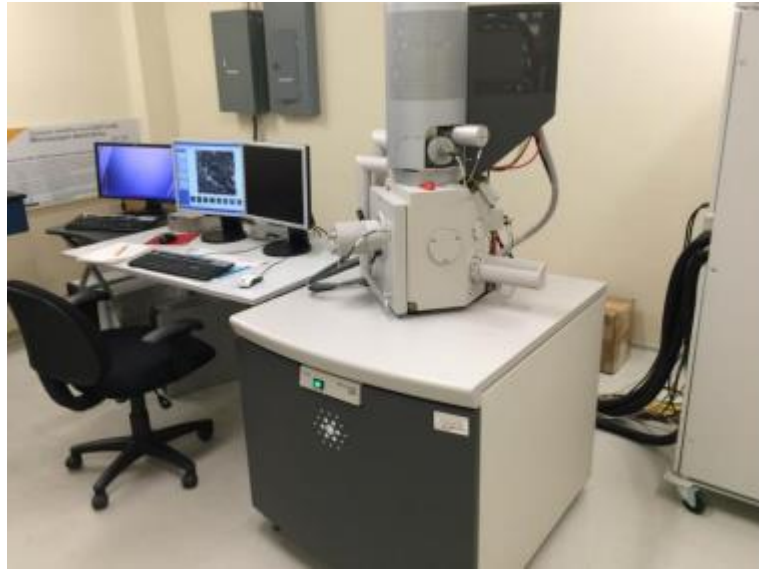


Figura 12. Microscopio electrónico de barrido marca FEI modelo Nova NanoSEM™ 200.

b) Prueba de liberación de extracto

Para la carga y medición se emplea extracto de *P. laevigata* a determinada concentración. Primeramente, las aleaciones se limpian con agua desionizada y se dejan secar a temperatura ambiente. A continuación, se pipetea 500 μ L del extracto sobre la superficie de los anodizados y se deja secar al aire a temperatura ambiente, eliminando el exceso de extracto con un paño. Este proceso debe repetirse 20 veces con el objetivo de cargar una cantidad sustancial de extracto sobre la matriz nanoestructurada de las aleaciones. Posteriormente, las aleaciones cargadas con el extracto son sumergidas en 1.5mL de PBS. Tras ello, se toman 5 μ L de esta solución y se procede a medir la liberación de extracto, empleando un espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop de la marca Thermo Scientific modelo 2000 a 296nm. El proceso de liberación debe medirse desde los primeros 5 minutos hasta 24 horas, empleando PBS como blanco.

8. RESULTADOS

8.1. Materia vegetal

8.1.1 Determinación de grupos funcionales en los extractos etanólicos de *S. marginatus*, *P. laevigata* y *P. anisum*.

Se realizaron las extracciones etanólicas de *S. marginatus*, *P. laevigata* y *P. anisum* respectiva y posteriormente se realizaron pruebas fitoquímicas para identificar grupos funcionales presentes en cada muestra (Tabla 1).

Análisis del perfil fitoquímico.				
Grupos funcionales	Prueba empleada	<i>P. laevigata</i>	<i>S. marginatus</i>	<i>P. anisum</i>
Insaturaciones	KMnO ₄	+	+	+
Carbonilo	2,4-Dinitrofenilhidracina	+	+	-
Oxidrilos fenólicos	FeCl ₃	+	+	+
Esteroles y triterpenos	Liebermann-Buchard	+	+	+
	Salkowski	-	+	-
Carbohidratos	Molish	+	+	+
	Cumarinas	+	-	+
	Lactonas	-	+	-
Sesquiterpenlactonas	Baljet	+	+	+
Flavonoides	H ₂ SO ₄	-	+	+
	Shinoda	+	+	+
	Leucoantocianinas	+	-	-
Alcaloides	Dragendorff	+	+	+
	Agitación	-	-	-
Saponinas	NaHCO ₃	+	+	+
	Salkowski	-	+	+
Aromaticidad	Ácido sulfúrico-formaldehido	-	-	+
Grupos funcionales detectados		11	13	12

Tabla 1: Análisis de perfil fitoquímico. Encontrando insaturaciones, carbonilos, oxidrilos fenólicos, carbohidratos, flavonoides y saponinas, el extracto con mayor grupo funcionales fue *S. marginatus*, seguido de *P. anisum* con 12 grupos funcionales y *P. laevigata* con 11.

8.2 *Helicobacter pylori*

8.2.1 Morfología macroscópica

La cepa ATCC43504 de *H. pylori* se procedió a realizar la activación y la resiembra en caldo Brucella para su mantenimiento y agar Brucella para los bioensayos posteriores. En caldo Brucella a 37° C durante 12 h produjo biofilm en la parte superior del tubo que contenía el medio (Figura 8A), al sembrarse en medio sólido produjo colonias grandes, mucosas y con forma de gota (Figura 8B).

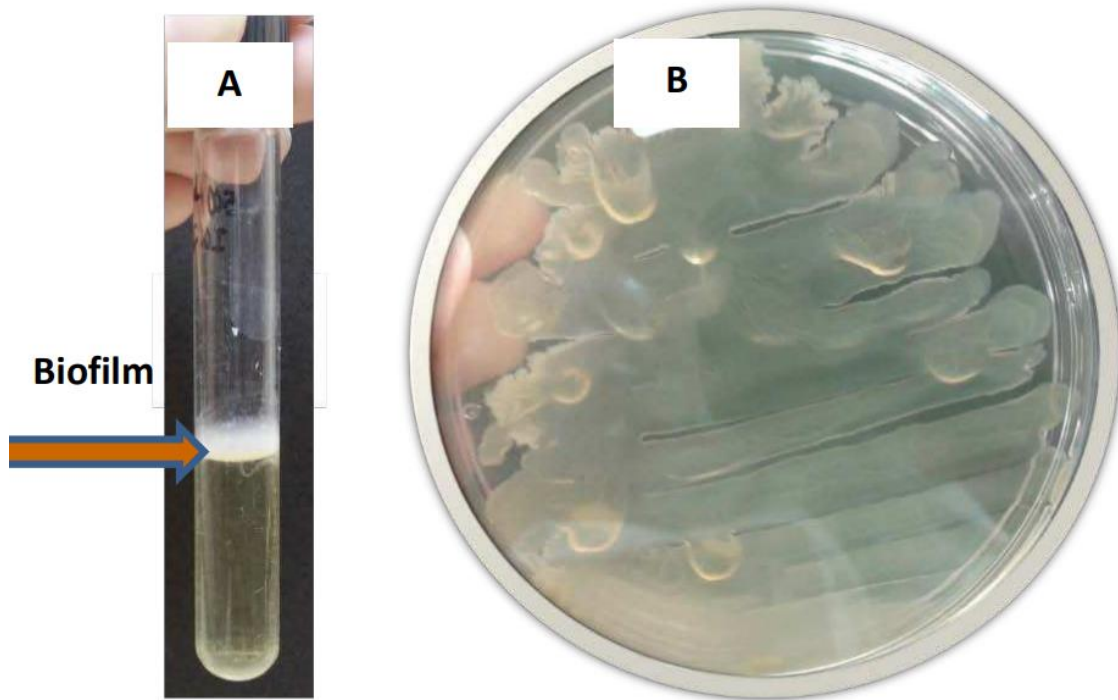


Figura 13. Aspecto macroscópico de *H. pylori*. **A)** Se observa producción de biofilm producido por la bacteria en caldo Brucella después de 12h de incubación. **B)** Se observa colonias típicas para *H. pylori* en agar Brucella. Presentan un punto central y crecimiento de gota colgante

8.2.2 Cinética de crecimiento

En la figura 14 se muestra la cinética de crecimiento de *H. pylori*; durante la primera hora de incubación se observa un cambio nulo, correspondiente a una fase de adaptación, y posteriormente se aprecia una fase exponencial, la cual continúa hasta las 8 horas de incubación. El crecimiento de la bacteria se monitoreó durante 14 horas. Cada punto graficado corresponde al promedio de 6 eventos independientes por triplicado. Obteniendo en su hora 6 de la fase logarítmica como la más recomendable para utilizarla en el proceso.

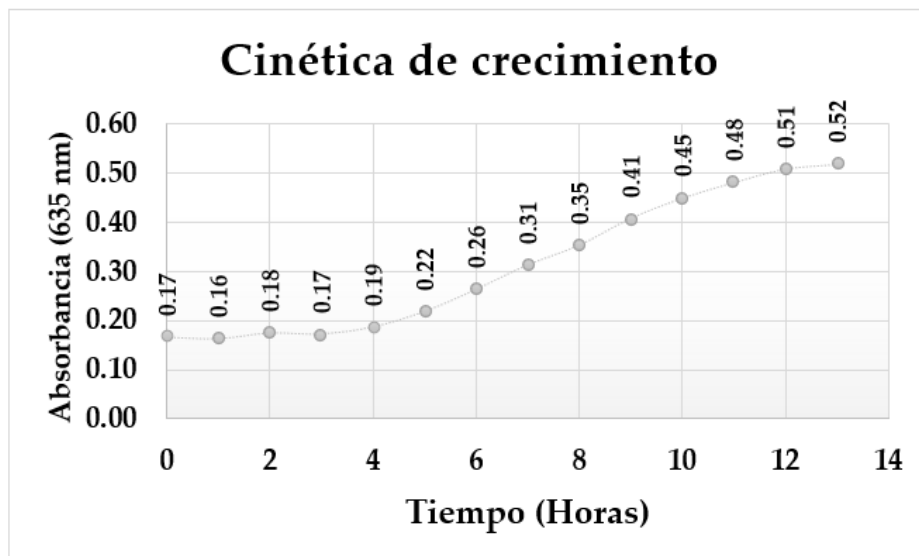


Figura 14. Cinética de crecimiento de *H. pylori*. Se muestra primeramente una fase de adaptación celular(0-2h), seguida de una fase exponencial(2-10h), la cual da inicio en la hora 2 y empieza a decrecer aproximadamente a la hora 10. A continuación se aprecia una fase estacionaria hasta terminar dicha cinética.

8.3 Actividad biológica de los extractos etanólicos de *S. marginatus*, *P. laevigata* y *P. anisum* sobre *H. pylori*.

Se evaluaron 3 extractos etanólicos a concentraciones de 200 mg/mL, mediante la técnica de turbidimetría y recuento bacteriano en placa, de acuerdo con los resultados de la tabla 2 el extracto etanólico de *Prosopis laevigata* y *S. marginatus* tuvieron mayor porcentaje de inhibición.

Tratamientos	Absorbancia	<i>H. pylori</i>	
	(635 nm)	Viabilidad (%)	Inhibición (%)
Control	0.393	100	0
PI EE	0.274	49.12	50.88
Sm EE	0.261	43.44	56.56
Pa EE	0.361	86.41	13.59
Ceftriaxona	0.160	0	100

Tabla 2. Determinación de actividad anti *H. pylori*. Se muestran los diferentes tratamientos: Control, extracto etanólico de *P. laevigata* (PI EE), extracto etanólico de *P. marginatus* (Pm EE), extracto etanólico de *P. anisum* (Pa EE) y Ceftriaxona.

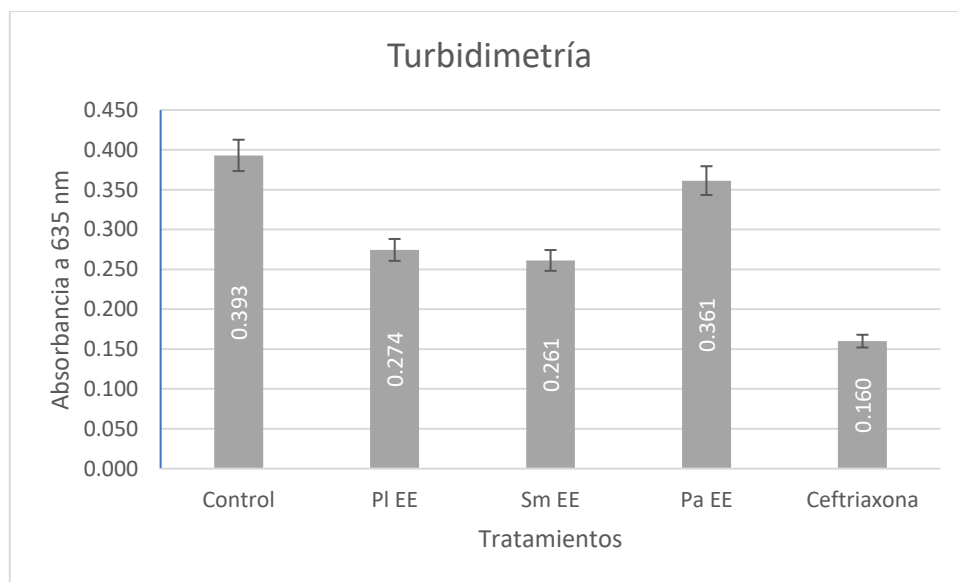


Figura 15. Absorbancia de *H. pylori* en presencia de diferentes tratamientos. Se observa la absorbancia que presentó la cepa en los tratamientos de extractos etanólicos.

En la figura 15 se observa que los tratamientos de extractos etanólicos de *Prosopis laevigata* y *Stenocereus marginatus* presentan una alta actividad contra *H. pylori*, por lo que se procedió a realizar el recuento en placa de los tratamientos.

Al realizar el conteo en placa se pudieron hacer los cálculos para obtener los diferentes parámetros de inhibición de cada tratamiento (Grafica 4), teniendo mejores resultados el extracto etanólico de *P. laevigata* (97.3%), *S. marginatus* (91.2%) y *P. anisum*

(88.1%) respectivamente, a su vez el fármaco ceftriaxona fungió como control negativo, inhibiendo en su totalidad a la cepa de *H. pylori*.

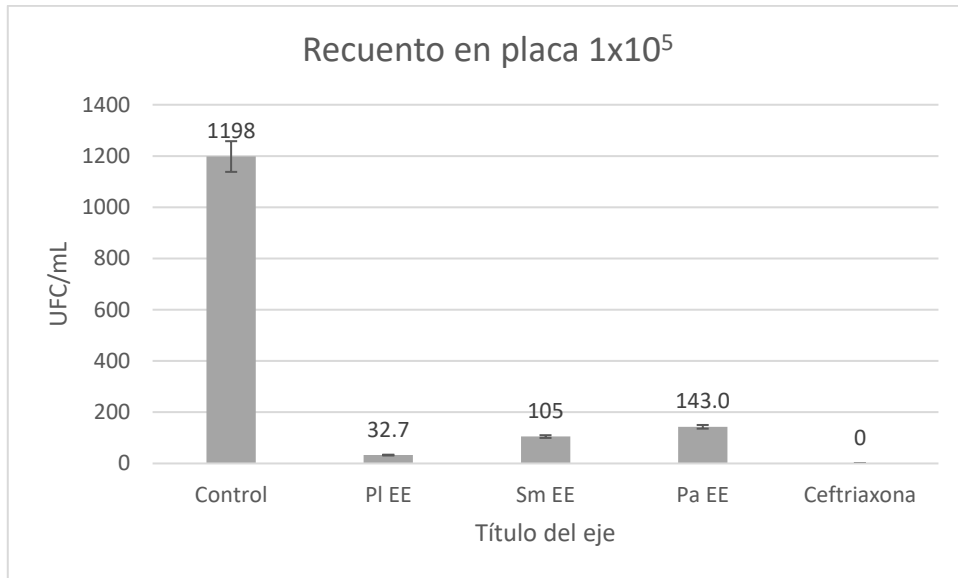


Figura 16. Resultados de recuento en placa de dilución 1×10^{-5} . Se observan los parámetros de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) de cada tratamiento en una dilución de 1×10^{-5} , donde el control dio una cuenta de 1,198 UFC/mL, se muestra el control negativo (Ceftriaxona) con inhibición total de la cepa y posteriormente los diferentes tratamientos con diferentes actividades sobre *H. pylori*.

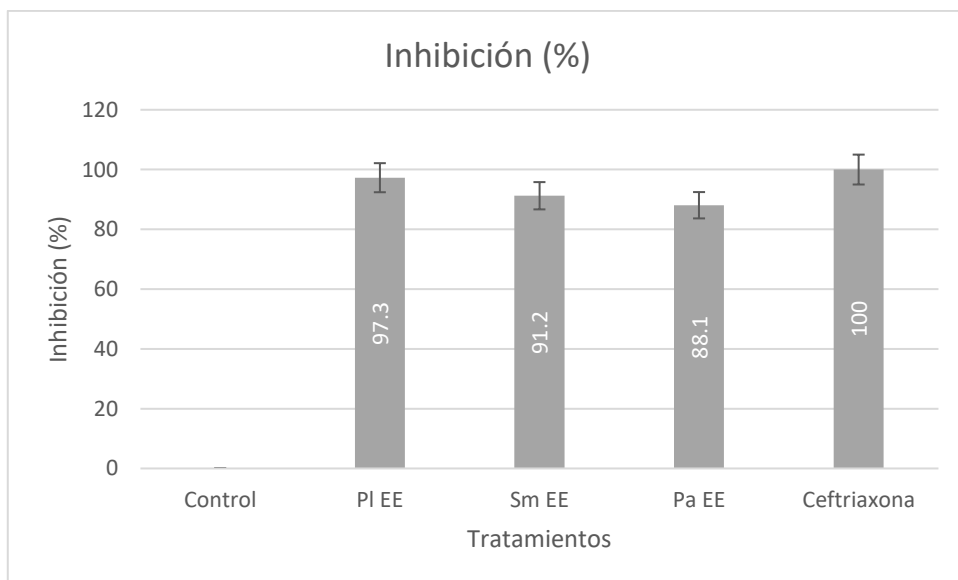


Figura 17. Resultados de inhibición de la dilución 1×10^{-5} .

8.4 Caracterización morfológica de nanotubos de TiO₂

Una vez obtenidos los ensayos con fitoextractos, se realiza la síntesis de nanotubos de óxido de titanio (TiO₂) para su posterior funcionalización se llevó a cabo con una aleación de titanio conocida como Ti-407. Para lo anterior, se sometieron placas de 1cm² de Ti407 a distintas fases: fase de decapado, desbaste, y fase de anodizado.

Posteriormente las placas fueron caracterizadas en microscopio electrónico de barrido NOVA NanoSEM 200 FEI. Los parámetros utilizados en las mediciones fueron los siguientes: HV (5kV, 10kV), Magnificaciones 30 000x, 60 000x y 120 000x (Figura 17).

Se realizó la caracterización morfológica de las nanoestructuras, la figura 2 representa micrografías de SEM, vista superior (A, B) y en C y D se muestra la sección transversal de los nanoestructurados formados por el proceso de anodización electroquímica a 30 V, con un diámetro promedio 85 nm y longitud promedio 10.6 micras.

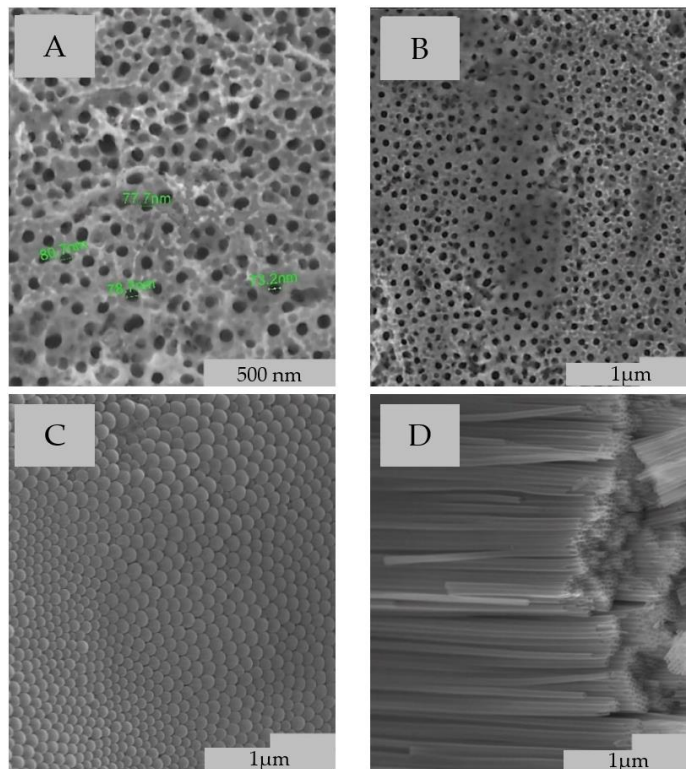


Figura 17. Micrografía de placas de TiO₂. A) y B) Vistas superiores. Imágenes SEM de Ti-407 anodizado a 30V. C) Se observa la vista posterior de los nanotubos de TiO₂ anodizados D) se observa la vista transversal de los nanotubos de TiO₂ anodizados a 30 V

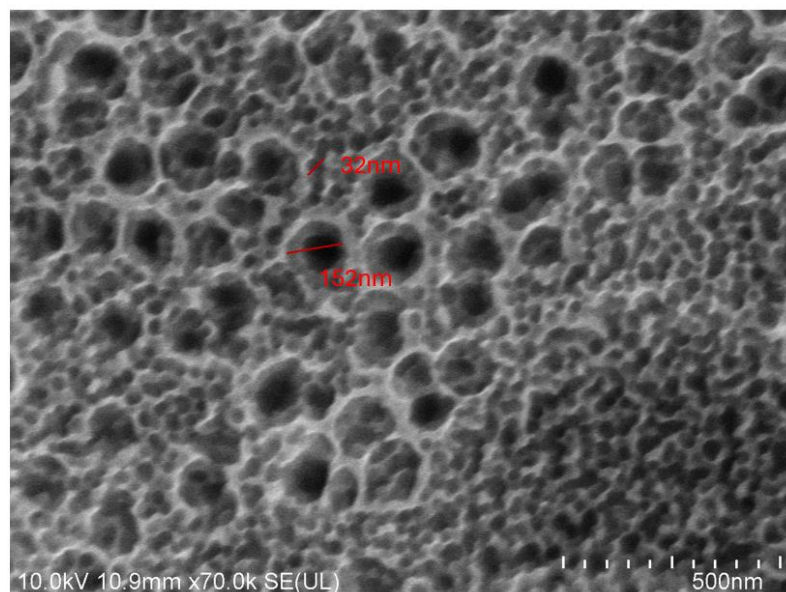


Figura 18. Observación al microscopio electrónico de barrido de placa de titanio anodizada. Se observan dos poblaciones de nanotubos de TiO_2 de diferentes diámetros, 150 nm aproximadamente y 30-50 nm en promedio. Imagen a 500 nm

El titanio es considerado biocompatible en muchas aplicaciones médicas. Esto se debe a varias características y propiedades del titanio (Khan, S. 2015). Resistencia a la corrosión, baja reactividad química, compatibilidad estructural ya que la estructura cristalina del titanio es similar a la de muchos tejidos biológicos, lo que facilita su integración con los huesos y los tejidos circundantes en aplicaciones como implantes ortopédicos y dentales, ligereza y resistencia (Tsuji, M., 2016). Debido a estas propiedades, el titanio se utiliza ampliamente en implantes ortopédicos, como prótesis de cadera, placas y tornillos, así como en implantes dentales, debido a su capacidad para fusionarse con el hueso en un proceso llamado osteointegración

Para comprobar el funcionamiento de los nanotubos funcionalizados se contrastaron con la metodología tradicional de Kirby-bauer, se inoculó por extensión *H. pylori* previamente cultivado en caldo y se procedió a colocar tanto los discos con fitoextractos como las placas de nanotubos de TiO_2 funcionalizados, después de 36h se obtuvieron los resultados de la figura 19.

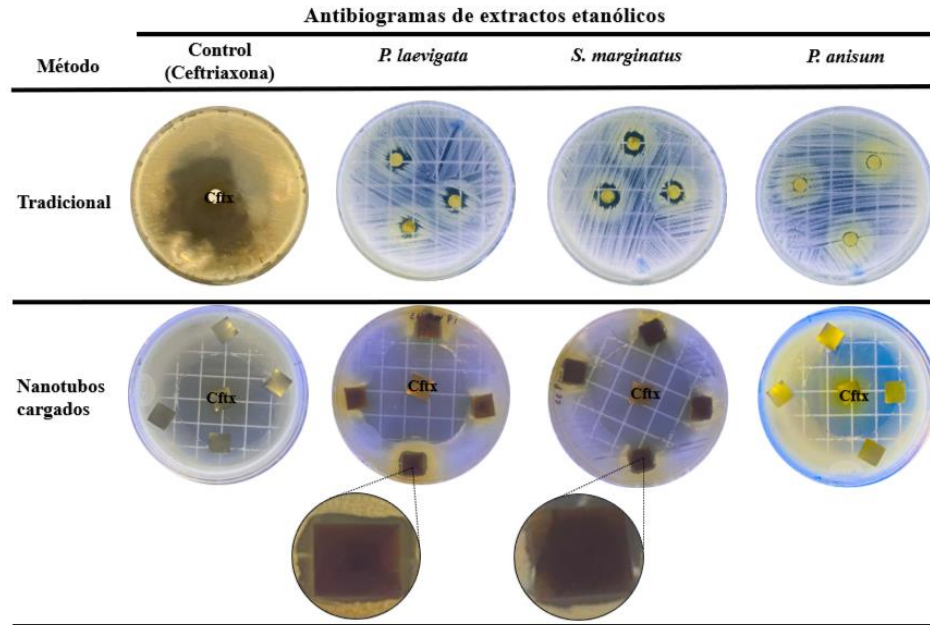


Figura 19. Comparación de métodos de Kirby-bauer. Se observan las mediciones de inhibición de los diferentes extractos etanólicos, así como ambos métodos de antibiogramas desarrollados.

Los resultados muestran que el método homologado propuesto funciona de manera similar al método estandarizado de antibiograma (Kirby-bauer), las placas con nanotubos cargados en presencia de *H. pylori* muestran un área de inhibición en el radio de anodizados analizados, lo que infiere que las placas de TiO₂ cargadas con los diferentes tratamientos de fitoextractos se liberan y se difunden a través del medio de cultivo, generando un gradiente de concentración difuminado en el radio de las placas anodizadas.

Para todas las muestras de fitoextractos y antibiótico que funcionó como control, el rendimiento fue similar, teniendo un diámetro de 5 mm para *P. laevigata*, 5 mm para *S. marginatus* y 2mm para *P. anisum*.

9.CONCLUSIONES

Los extractos etanólicos de *Prosopis laevigata* y *Stenocereus marginatus* mostraron una actividad antimicrobiana significativa contra *Helicobacter pylori*. Estos hallazgos resaltan el potencial de estos extractos como tratamientos alternativos en la lucha contra las infecciones por *H. pylori*, especialmente en contextos donde la resistencia a los antibióticos es un desafío.

No obstante, se requieren estudios adicionales, incluyendo ensayos *in vivo*, para confirmar su eficacia y seguridad.

Se logró sintetizar nanoestructuras tubulares con aleación de Ti-407, con el desarrollo de una metodología de anodizado mediante una solución de electrolitos de NH₄F (0.1 M) a voltaje constante 30V por 30 minutos.

Los antibiogramas mostraron que los extractos de *P. laevigata* y *S. marginatus* inhibieron significativamente el crecimiento de *H. pylori*. Además, los nanotubos de TiO₂, como acarreadores de fitoextractos, demostraron ser más efectivos que los extractos libres, sugiriendo una alternativa prometedora a las terapias convencionales (Heinrich, M., & Jäger, A. K., 2015).

Continuar con estas investigaciones podría contribuir significativamente a la salud pública al proporcionar nuevas alternativas para tratar cepas resistentes a los antibióticos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Ghani A.S., S.G. El-Lati, A. I. Sacaan and M.S. Suleiman (1987). *In vitro* antibacterial activity of *Pimpinella anisum* fruit extracts against some pathogenic bacteria. International J. Crude Drug Res, **25**:39-43.
- Afifi NA, A. Ramadan, E. A. El-Kashoury and H.A (1994). El-Banna. Some pharmacological activities of essential oils of certain umbelliferous fruits. Vet. Med. J. Giza, 42:85-92.
- Albán Briones, M. C. (2018). *Helicobacter pylori asociada a infección gástrica y factores predisponentes—parroquia Membrillal, Jipijapa* (Bachelor's thesis, JIPIJAPA-UNESUM).
- Albuquerque A., A.L. Sorenson and J.H. Leal Cardoso (1995). J. Ethnopharmacology, 49:41-49.
- Alvarado-Esquivel, C. (2013). Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in pregnant women in rural Durango, México. International journal of biomedical science: IJBS, 9(4), 224.
- Alviano DS, Alviano CS. (2009) Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases. Current Pharmaceutical Biotechnology. 2009 January;10 (1):106–121.
- Barrón-González, M. P., Serrano-Vázquez, G. C., Villarreal-Treviño, L., Mata-Cárdenas, B. D., Verduzco-Martínez, J. A., & Morales-Vallarta, M. R. (2006). Acción inhibitoria de probióticos sobre el crecimiento axénico in vitro de *Entamoeba histolytica*. Revista Salud Pública y Nutrición, 7(2).
- Boyanova, I. Mitov, B. Vladimirov (2011). *Helicobacter pylori*. Caister Academic Press Norfolk.
- Burboa, E. A., Ascacio-Valdés, J. A., Zugasti-Cruz, A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2014). Capacidad antioxidante y antibacteriana de extractos de residuos de candelilla. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 45(1), 51-56.

- Cervantes-García, E. (2016). *Helicobacter pylori*: mecanismos de patogenicidad. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 63(2), 100-109.
- Chicouri M. and I. Chicouri (2000). Novel pharmaceutical compositions containing senna with laxative effect. *Fr. Demande FR 2791892 A1*, Oct 13, 6.
- Cho, J., Prashar, A., Jones, N. L., & Moss, S. F. (2021). *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology Clinics*, 50(2), 261-282.
- Covacci, A., Telford, J. L., Del Giudice, G., Parsonnet, J., Rappuoli, R. (1999). *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 284. 1328-1333.
- Crowe, S. E. (2019). *Helicobacter pylori* infection. *New England Journal of Medicine*, 380(12), 1158-1165.
- Cruz MC, Santos PO, Barbosa Jr AM, de Mélo DL, Alviano CS, Antonioli AR, Alviano DS, Trindade RC. (2007) Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. *J Ethnopharmacol*. 2007 May 4;111 (2):409–412.
- Domínguez X. A (1973). *Métodos de investigación fitoquímica*. 1ª edición. LIMUSA. México, D.F. 176.
- Dorman HJ, Deans SG. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*. 2000 Feb;88(2):308–316.
- Dzido TH, Tuzimski T. (2008). Chambers, Sample Application and Chromatogram Development. In: *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. Waksmundzka-Hajnos M. Sherma J. and Kowalska T. (eds.). CRC Press: Boca Ratón, Florida, pp. 119-168
- Eggleston K, Zhang R, Zeckhauser RJ. (2010) The global challenge of antimicrobial resistance: insights from economic analysis. *Int J Environ Res Public Health*. 2010 Aug;7 (8):3141–3149. doi: 10.3390/ijerph7083141.

- Forero, G.A. (2002). Estudio Fitoquímico del extracto etanólico de la madera de "*Virola carinata*" (Myristicaceae). Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia.
- Giffoni-Leite JJ, Salles Brito EH, Aguiar-Cordeiro R, Nogueira-Brilhante RS, Costa-Sidrim JJ, Medeiros-Bertini L, Maia de Moraes S, Gadelha-Rocha MF. (2009). Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extract. *Revista de la Sociedad Brasileña de Medicina Tropical*. 42(2): 110-113.
- Goodman y Gilman. (2006). Las bases farmacológicas de la Terapéutica. Brunton L., Parker K. ISBN 9701057392.
- Gu, H. (2017). Role of Flagella in the Pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *Current microbiology*, 74, 863-869.
- Gualdrón, V. R y López, P. S. (1994). Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre larvas de *Artemia Salina* de algunas plantas superiores colombianas. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia.
- Guillot Ortiz D. (2009). Flora ornamental española: aspectos históricos y principales especies. Monografías de la Revista *Bouteloua*. No. 8. Pp. 192.
- Heinrich, M., & Jäger, A. K. (Eds.). (2015). *Ethnopharmacology*. John Wiley & Sons. 14-15
- Hu, S. H., Wang, J.C., Kung, H. F., Wang, J. T., Lee, W. L., & Yang, Y. H. (2004). Antimicrobial effect of extracts of cruciferous vegetables. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 20:591-9.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (Ed.). (1994). Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*. Infections with *Helicobacter pylori*. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France.

International Agency for Research on Cancer. Globocan (2012). Fecha de consulta: 12 de febrero de 2023. Disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.

Jones, D. M., Curry, A., & Fox, A. J. (1985). An ultrastructural study of the gastric campylobacter-like organism 'Campylobacter pyloridis'. *Microbiology*, 131(09), 2335-2341.

Khan, S., Ul-Islam, M., Khattak, W. A., Ullah, M. W., & Park, J. K. (2015). Bacterial cellulose-titanium dioxide nanocomposites: nanostructural characteristics, antibacterial mechanism, and biocompatibility. *Cellulose*, 22, 565-579.

<https://doi.org/10.1007/s10570-014-0528-4>

Kim SY, H.-J. Doh, M.-H. Jang, Y.-J. Ha, S.-I Chung, H.-J. Park. Oral (1999) immunization with Helicobacter pylori-loaded poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Helicobacter* 4. 1999. 33-39.

Ladrón-de-Guevara, L., Bornstein-Quevedo, L., González-Huezo, S., Castañeda-Romero, B., Costa, F. G., & di Silvio-López, M. (2019). Erradicación de Helicobacter pylori en México con un esquema basado en levofloxacina versus la triple terapia estándar: resultados de un estudio clínico de fase iiib, abierto, aleatorizado, de no inferioridad. *Revista de Gastroenterología de México*, 84(3), 274-283.

Macomber RS. (1998). *A Complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy*. Wiley & Sons Inc.: USA, pp.1-46

Marshall BJ, Royce H, Annear DI, Goodwin CS, Pearman JW, Warren JR, and Amstrong JA. (1984) Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. *Microbios Lett* 1984; 25: 83–8.

Marshall BJ, Warren JR. (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-5.

- Mayshall GC. (1996) Nosocomial burn wound infections, In: GC Mayshall (ed), Hospital Epidemiology and infections control. Baltimore, Md: The Williams & Williams Co.; 1996.p. 225-236
- Mehmet Ciftci, Talat Güler, Bestami Dalkiliç and O. Nihat Ertas(2005). International Journal of Poultry Science, ; 4 (11): 851-855.
- Palomino Camargo C; Elisabetta Tomé Boschian (2012) Helicobacter pylori: Rol del agua y los alimentos en su transmisión. Anales Venezolanos de Nutrición Volumen 25, No. 2, Año 2012.
- Paterson DL. Impact of antibiotic resistance in gram-negative bacilli on empirical and definitive antibiotic therapy. Clin Infect Dis. 2008 Sep. 15;47 (Suppl 1):S14–S20. doi: 10.1086/590062.
- Ruberto G, Baratta MT, Deans SG, Dorman HJ. (2000) Antioxidant and antimicrobial activity of Foeniculum vulgare and Crithmum maritimum essential oils. Planta Med. 2000 Dec.;66 (8):687–693.
- Sarraf, M., Nasiri-Tabrizi, B., Yeong, C. H., Madaah Hosseini, H. R., Saber-Samandari, S., Basirun, W. J., & Tsuzuki, T. (2021). Mixed oxide nanotubes in nanomedicine: A dead-end or a bridge to the future?. Ceramics international, 47(3), 2917–2948. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.09.177>
- Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. (2005). Spectrometric Identification of Organic Compounds, Seventh edition. Wiley & Sons Inc: USA, pp.127-340
- Singh G.I.P. Kappoor, S.K. Pandey, U.K. Singh and R.K. Singh (2002). Studies on essential oils: Part 10; antibacterial activity of volatile oils of some species phytother Res.16: 680-682.
- Soliman K.M. and R.I. Badea (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. Food chem. Toxicol., 40:1669-1675.

Tabanca N.E. Bedir, N. Kirmer, K.H. Baser, S.I. Khan, M.R. Jacob and I.A. Khan (2003). Antimicrobial compounds from *Pimpinella* species growing in Turkey. *Planta Med.*, 69:933-938.

Talib WH, Mahasneh AM. (2010) Antimicrobial, cytotoxicity and phytochemical screening of Jordanian plants used in traditional medicine. *Molecules*. 2010 Mar 12;15(3):1811–1824. doi: 10.3390/molecules15031811.

Treviño-Tamez R. (2001). Estudio fitoquímico de *Piper amalago*. Tesis (Licenciatura). Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México.

Tsuji, M., Ueda, T., Sawaki, K., Kawaguchi, M., & Sakurai, K. (2016). Biocompatibility of a titanium dioxide-coating method for denture base acrylic resin. *Gerodontology*, 33(4), 539-544.

<https://doi.org/10.1111/ger.12204>

Umamaheshwari RB, N. K. Jain (2004). Receptor-mediated targeting of lipobeads bearing acetohydroxamic acid for eradication of *Helicobacter pylori*. *J. Control. Release* 99. 2004. 27-40.

Velededa, X., & Buela-Salazar, L. M. (2020). *Helicobacter pylori*: factores de virulencia e infección. *Revista Estudiantil CEUS (Ciencia Estudiantil Unidad De Salud)*, 2(2), 21-26.

Warren JR, Marshall B. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 1: 1273–5.

Zamani, M., Ebrahimitabar, F., Zamani, V., Miller, W. H., Alizadeh-Navaei, R., Shokri-Shirvani, J., & Derakhshan, M. H. (2018). Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 47(7), 868–876. <https://doi.org/10.1111/apt.14561>

Zhang R, Eggleston K, Rotimi V, Zeckhauser RJ. (2006) Antibiotic resistance as a global threat: evidence from China, Kuwait and the United States. *Global Health*. 2006 Apr 7;2:6.

