

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Actividad Antimicrobiana contra *Helicobacter pylori* y Letalidad sobre *Artemia salina* L., de 34 Extractos Hidroalcohólicos de Plantas



TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de:

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

PRESENTA:

Yuri Edith Aguirre Guzmán

Hermosillo, Sonora.

Julio de 2014

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

VOTOS APROBATORIOS

Los miembros del jurado calificador del examen profesional de Yuri Edith Aguirre Guzmán hemos revisado detenidamente su trabajo escrito titulado “Actividad Antimicrobiana contra *Helicobacter pylori* y Letalidad sobre *Artemia salina* L., de 34 Extractos Hidroalcohólicos de Plantas”, y encontramos que cumple con los requisitos para la presentación de su examen profesional. Por tal motivo recomendamos se acepte dicho trabajo como requisito parcial para la obtención de título de Químico Biólogo Clínico.

Atentamente:

Dra. Irasema Vargas Arispuro
Presidente

Dr. Eduardo Ruiz Bustos
Secretario

MC. Moisés Navarro Navarro
Vocal

MC. Griselda Macrina Moreno Ibarra
Suplente

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, por permitirme realizar mis estudios y haberme ofrecido las herramientas necesarias para desarrollarme en mi especialidad.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., por abrirme las puertas de su institución para realizar mi trabajo de tesis.

A la Doctora Irasema Vargas Arispuro, por recibirme en su laboratorio, brindarme su apoyo técnico, asesorías y ayudarme en la formulación de este trabajo. Pero sobre todo por su paciencia, consejos y cariño.

A la QB Socorro Vallejo Cohen y a la M.C. Cony Corrales Maldonado, por su gran ayuda técnica para realizar este trabajo, por enseñarme lo que es la investigación, así como el amor a la ciencia, literal. Gracias por permitirme formar parte de una segunda familia en el Laboratorio de Ecología Química.

Al Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez, por permitirme el uso de sus instalaciones así como brindarme su apoyo técnico. Por su paciencia y sus palabras de aliento, así como por su confianza.

Al M.C. Emmanuel Aispuro Hernández, por su apoyo técnico y asesoría. Por siempre presionarme y nunca dejarme en paz, gracias por haberme ayudado a finalizar este trabajo.

Al QB. Francisco Soto Córdova y a la M.C. Marisol Ochoa, por su apoyo técnico, su ejemplo y amistad.

A mi asesor, Dr. Eduardo Ruiz Bustos, por su asesoría y su disposición para realizar este trabajo, siempre transmitiendo alegría y optimismo.

A la M.C. Griselda Macrina Moreno Ibarra, por su ayuda en la revisión de este trabajo, por su tiempo y sus palabras.

Al M.C. Moisés Navarro Navarro, por mostrarme el mundo de la microbiología como solo él sabe, por transmitir ese amor al conocimiento y ser todo un ejemplo a seguir. Por su ayuda en las correcciones de este trabajo y todo el tiempo invertido.

A la Dra. María Islas, por su atención, por haberme ayudado en la búsqueda del laboratorio ideal para el desarrollo de mi tesis y dirigirme con las personas adecuadas.

A Vanessa, Azucena y Juan, por sus ánimos, y hacer divertido el tiempo durante ensayos interminables.

A mis amigos Dabith, Vale y Dahlia, por su guía y su cariño.

A mis amigos; señor QBC. Demetrio Morales Flores, a la gran M.C. Gabriela Andrade Bustamante y claro a la Q.A. Cynthia Laura Aguilar Gil; muchas gracias por ayudarme a estudiar, por darme mi espacio cuando lo necesitaba y aguantarme en mis momentos de estrés y pánico.

A mis amigos Gloria y Antonio, por apoyarme siempre y ayudarme a estudiar durante lo largo de mi carrera así como en el desarrollo de esta tesis, siempre con aquella incertidumbre...

A todos, muchas gracias.

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a mi mamá, por su amor incondicional. Por apoyarme en mis estudios; en mis desvelos y en mis crisis. Por siempre estar a mi lado ayudándome hasta en lo imposible.

A mi papá y a mis hermanos, por todo su amor. Por siempre apoyarme en mis decisiones.

A Dios.

Los amo.

Yuri Edith Aguirre Guzmán

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
OBJETIVOS	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
<i>Helicobacter pylori</i>	3
Morfología	3
Características bioquímicas	4
Factores de virulencia	4
Infección por <i>Helicobacter pylori</i>	5
Enfermedades asociadas a <i>Helicobacter pylori</i>	5
Terapias de erradicación	6
Resistencia y necesidad de nuevas alternativas	7
Plantas medicinales	9
Uso de plantas medicinales como tratamiento alternativo contra infecciones microbianas.	9
Sustancias producidas por las plantas y su mecanismo terapéutico.	10
Fenoles y Polifenoles	10
Quinonas	10
Flavonas, Flavonoides y Flavonoles	10
Taninos	11
Cumarinas	11
Terpenoides y aceites esenciales	11
Alcaloides	11
Lectinas y péptidos	11
Plantas medicinales de uso tradicional en el Estado de Sonora.	12
Plantas medicinales anti- <i>Helicobacter pylori</i>	13

CONTENIDO

	Página
Evaluación de letalidad de extractos de plantas	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Material Vegetal	18
Recolección e identificación de plantas.	18
Extracción de hidroalcohólica de especies vegetales	18
Obtención de extractos liofilizados	18
Cepa de <i>H. pylori</i> y métodos de cultivo.	19
Pruebas confirmatorias y de viabilidad.	20
Evaluación de actividad antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos contra <i>H. pylori</i> .	20
Determinación de concentración Mínima Inhibitoria.	21
Ensayo de letalidad con <i>Artemia salina</i> L.	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
Evaluación de Actividad Antimicrobiana sobre <i>H. pylori</i>	24
Evaluación Antimicrobiana de <i>Allium sativum</i> .	29
Evaluación Antimicrobiana de <i>Eucalyptus radiata</i> .	29
Evaluación Antimicrobiana de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	30
Evaluación Antimicrobiana de <i>Valeriana officinalis</i> .	30
Extractos hidroalcohólicos con efecto <i>anti-H. pylori</i> , como alternativa de apoyo terapéutico.	31
Ensayos de Letalidad con <i>Artemia salina</i> L.	32
Evaluación de Letalidad de <i>Allium sativum</i> sobre <i>Artemia salina</i> L.	34
Evaluación de Letalidad de <i>Eucalyptus radiata</i> sobre <i>Artemia salina</i> L.	36
Evaluación de Letalidad de <i>Rosmarinus officinalis</i> sobre <i>Artemia salina</i> L.	37
Evaluación de Letalidad de <i>Valeriana officinalis</i> (tallo) sobre <i>Artemia salina</i> L.	38
Evaluación de Letalidad de <i>Valeriana officinalis</i> (tallo) sobre <i>Artemia salina</i> L.	39
CONCLUSIÓN	40
RECOMENDACIONES	41
BIBLIOGRAFÍA	42

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Uso medicinal de plantas en Sonora 1.	12
2.	Uso medicinal de plantas en Sonora 2.	13
3.	Extractos hidroalcohólicos evaluados.	19
4.	Composición de agua de mar para nauplios de <i>Artemia salina</i> L.	22
5.	Pruebas de viabilidad de cepa <i>Helicobacter pylori</i> .	23
6.	Actividad antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos evaluados.	26
7.	Determinación de concentración mínima inhibitoria de extractos hidroalcohólicos con efecto anti- <i>H. pylori</i> .	28
8.	Letalidad de extractos hidroalcohólicos de plantas con actividad anti- <i>H. pylori</i> , sobre nauplios de <i>Artemia salina</i> .	33
9.	Letalidad en nauplios de <i>Artemia salina</i> a distintas concentraciones de extracto hidroalcohólico de <i>Allium sativum</i> .	34
10.	Letalidad en nauplios de <i>Artemia salina</i> a distintas concentraciones de extracto hidroalcohólico de <i>Eucalyptus radiata</i> .	36
11.	Letalidad en nauplios de <i>Artemia salina</i> a distintas concentraciones de extracto hidroalcohólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	37
12.	Letalidad en nauplios de <i>Artemia salina</i> a distintas concentraciones de extracto hidroalcohólico de tallo <i>Valeriana officinalis</i> .	38
13.	Letalidad en nauplios de <i>Artemia salina</i> a distintas concentraciones de extracto hidroalcohólico de flor de <i>Valeriana officinalis</i> .	39

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	<i>Helicobacter pylori</i>	3
2.	En la tinción Gram, <i>H. pylori</i> se observa como un bacilo Gram negativo.	4
3.	Prevalencia de <i>Helicobacter pylori</i> frente a antibióticos en diferentes continentes.	9
4.	Pruebas bioquímicas.	24
5.	Halos de inhibición por actividad anti - <i>H. pylori</i> del extracto de <i>Allium sativum</i> .	25
6.	Gráfica de correlación entre la concentración de extracto hidroalcohólico de <i>Allium sativum</i> y porcentaje de letalidad de nauplios de <i>A. salina</i> .	35
7.	Gráfica de correlación entre la concentración de extracto hidroalcohólico de <i>Eucalyptus radiata</i> y porcentaje de letalidad de nauplios de <i>A. salina</i> .	36
8.	Gráfica de correlación entre la concentración de extracto hidroalcohólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> y porcentaje de letalidad de nauplios de <i>A. salina</i> .	37
9.	Gráfica de correlación entre la concentración de extracto hidroalcohólico de tallo de <i>Valeriana officinalis</i> y porcentaje de letalidad de nauplios de <i>A. salina</i> .	38

OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar la actividad antimicrobiana y letalidad de extractos hidroalcohólicos obtenidos de plantas contra *Helicobacter pylori*.

Objetivos Particulares

- Obtener extractos hidroalcohólicos de plantas medicinales.
- Determinar el potencial antibacteriano de extractos contra *H. pylori*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de los extractos activos.
- Determinar la letalidad de extractos activos sobre *Artemia salina L.*

RESÚMEN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es un microorganismo de gran importancia a nivel mundial. Aunque su prevalencia puede variar ampliamente dentro de los grupos de población, se estima infecta hasta a un 50% de la población mundial (Parsonnet, 1998). *H. pylori* es conocida como la principal causa de gastritis crónica en humanos. De manera que su erradicación está directamente relacionada con la resolución de la gastritis (Adeniyi y col., 2009). Alrededor del 10% al 15% pueden desarrollar úlcera péptica gástrica o una gastritis atrófica que podría ser el primer paso para la evolución a cáncer gástrico, el cual se presenta entre 1% a 3% de la población infectada, estimándose que un 7% de la población a nivel mundial podría desarrollar eventualmente cáncer gastrointestinal asociado a *H. pylori* (Torres y col., 2005).

A pesar de que las terapias aplicadas actualmente para la erradicación de *Helicobacter pylori* son efectivas en la mayoría de los casos, cada vez se presenta con mayor frecuencia la aparición de cepas resistentes a los antibióticos utilizados. Es por eso que, dadas las problemáticas ocasionadas por la infección por *H. pylori*, se mantiene el interés en la búsqueda de nuevos agentes bactericidas que inhiban el crecimiento de esta bacteria, ya que existen pocos antibióticos efectivos, de los cuales se requieren altas dosis para lograr el control de la infección, lo que provoca un aumento en la presencia de efectos secundarios en los consumidores, motivo por el que se incrementa el abandono del tratamiento, aunado al riesgo de generar resistencia por parte de la bacteria.

En las diversas comunidades indígenas del estado de Sonora se utilizan las infusiones de plantas para el control de enfermedades gastrointestinales. Por lo que se evaluó la actividad antibacteriana de 34 extractos hidroalcohólicos contra *H. pylori*, utilizando el método de disco de papel en placa utilizado por Heisey (1992). Habiéndose obtenido actividad bactericida o bacteriostática de los extractos de *Allium sativum*, *Eucalyptus radiata*, *Rosmarinus officinalis* y *Valeriana officinalis*. La evaluación de letalidad de los extractos activos anti-*H. pylori* demostró que los extractos de *Allium sativum* y *Eucalyptus radiata*, no presentan toxicidad para los nauplios a las MIC determinadas en este estudio. Sin embargo, los extractos de valeriana tanto de hoja como tallo, presentaron porcentajes altos de mortalidad a las concentraciones mínimas inhibitorias, por lo que estos extractos no son recomendados para utilizarse con la composición que evaluada (Fernández-Calienes y col., 2009). Para tales extractos tóxicos es conveniente llevar a cabo el aislamiento de sus compuestos ya que en estado de pureza podrían producir un efecto tóxico menor en comparación con el extracto crudo.

INTRODUCCIÓN

Actualmente *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es un microorganismo de gran importancia a nivel mundial. Aunque su prevalencia puede variar ampliamente dentro de los grupos de población, se estima infecta hasta a un 50% de la población mundial. En algunos países en vías de desarrollo, la mayoría de los niños suelen infectarse alrededor de los 10 años de edad, de manera que se presenta una infección universal al llegar a la edad adulta. Por otro lado las estadísticas proyectan que en países industrializados, la prevalencia es considerablemente menor. Sin embargo esto no implica que la infección por *H. pylori* sea rara en estos países. En Estados Unidos, algunos países de Europa y Oceanía, hasta una tercera parte de la población se encuentra infectada con esta bacteria (Parsonnet, 1998). Lo anterior confirma que la infección por *H. pylori* es una de las más comunes en el hombre en todo el mundo, demostrando que hay una relación entre la situación socioeconómica de los países con la prevalencia de esta infección, siendo el desarrollo un indicador proporcional a la disminución en la prevalencia de infección por *H. pylori* (Chey y Wong, 2007; Triana, 2001).

La infección por *H. pylori* es conocida como la principal causa de gastritis crónica en humanos. Existen varias evidencias que indican que la presencia de *H. pylori* desempeña un importante papel etiológico en el desarrollo de inflamación gástrica. De manera que su erradicación está directamente relacionada con la resolución de la gastritis (Adeniyi y col., 2009), mientras que la reinfección o recaída se asocia con el recrudecimiento de la inflamación.

H. pylori también ha sido asociado con patologías como Linfoma de células B, Linfoma gástrico tipo MALT (*mucosa associated lymphoid tissue*) (Wenming y col., 2012) y adenocarcinoma gástrico (Blaser y col., 1995).

La estrecha asociación entre la infección por *H. pylori* y el cáncer gastroduodenal colocó a esta bacteria como un agente cancerígeno de clase I, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) (Nutpho y Ukarapol, 2006).

Una amplia variedad de antimicrobianos han demostrado actividad *in vitro* frente a *H. pylori*, pero cuando se han aplicado en pautas de tratamiento han demostrado escasa actividad (Alarcón y Domingo, 2004). Las terapias actuales de erradicación han comenzado a disminuir su tasa de erradicación a causa de nuevas resistencias adquiridas por la bacteria, influenciada por distintos factores que varían tanto dependiendo de la cepa como del hospedero. Lo anterior conlleva a nuevas investigaciones de alternativas para el tratamiento de la infección por *H. pylori*.

Está documentado que alrededor del 60% de la población, utiliza plantas y sus derivados en la medicación, lo cual tiene sentido ya que hasta un 80% de los nuevos antimicrobianos y anticancerígenos provienen de productos naturales o sus derivados (Araujo y Salas, 2008). Por lo tanto al encontrar, que varias especies de plantas han mostrado tener potencial para proveer drogas efectivas contra diversas enfermedades, muchos grupos de investigación han decidido evaluar extractos vegetales como estrategia para hallar nuevas alternativas terapéuticas.

Sin embargo, muchas plantas pueden ocasionar reacciones tóxicas (Uyub y col., 2009), es por ello que además de su acción farmacológica debe ser evaluada su toxicidad. Usualmente la evaluación toxicológica preclínica es realizada en ratones, pero el elevado costo de estos ensayos, aunado al sufrimiento de los animales, ha motivado el remplazo de estos experimentos, o la reducción en el número de animales usados en cada prueba y perfeccionar las metodologías existentes con el propósito de reducir el dolor y el estrés a los animales. Un método utilizado para la evaluación de toxicidad es el ensayo de letalidad usando *Artemia salina*, que se basa en la posibilidad de causar la muerte de larvas de este crustáceo cultivadas en el laboratorio. Siendo ésta una herramienta útil y sencilla para la medición de toxicidad, en la cual se determina el valor de la concentración letal media (CL₅₀) de compuestos y extractos en medio salino. Esta técnica ha resultado útil para la detección de toxinas de hongos y cianobacterias, toxicidad de extractos de plantas, metales pesados y para predecir citotoxicidad de compuestos puros.

Conociendo la importancia de la infección por *H. pylori* y de encontrar alternativas de control, en este trabajo investigamos el efecto antibacteriano de extractos de plantas como alternativa de apoyo para el tratamiento de la infección por *H. pylori* así como la toxicidad de los extractos que presentaron dicha actividad.

ANTECEDENTES

Helicobacter pylori

Helicobacter pylori fue aislado por primera vez por Marshall y Warren (1983), después de una incubación prolongada de cultivo puro a partir de una biopsia de la mucosa gástrica humana (Hernández-Hernández y col., 2009), demostrando su rol etiopatogénico en la úlcera péptica gastroduodenal, generando una revolución ante la comprensión y el tratamiento de múltiples e importantes patologías gástricas (Ortega y col., 2010).

Morfología

Helicobacter pylori es un bacilo flagelado, Gram negativo, curvado y microaerófilo (Wenming y col., 2012) que se encuentra en la mucosa gástrica del estómago humano asociado a diferentes enfermedades digestivas (Vallejos y col., 2003). Tiene una morfología espiral en forma de sacacorchos cuando se encuentra en la mucosa gástrica y menos espiral cuando crece en medios artificiales. Presenta unas dimensiones de 0,5 a 1,0 μm de ancho y de 3 μm de largo y las características estructurales típicas de los bacilos gramnegativos, con una membrana externa. Tiene de 4 a 8 flagelos polares, fundamentales para su movilidad, y que están recubiertos por una vaina de estructura lipídica, igual que la membrana externa, que parece tener la misión de proteger a los flagelos de su degradación por el medio ácido (Alarcón y Domingo, 2004). Su morfología puede observarse en las figuras 1 y 2.

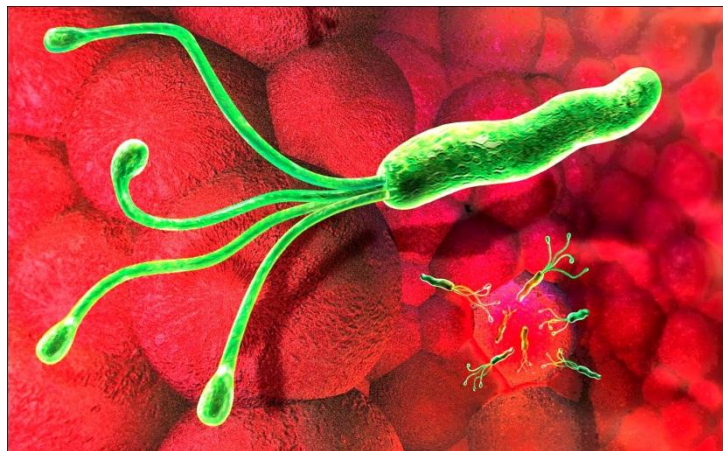


Figura 1. *Helicobacter pylori*. Tomada de Forya, 2013.

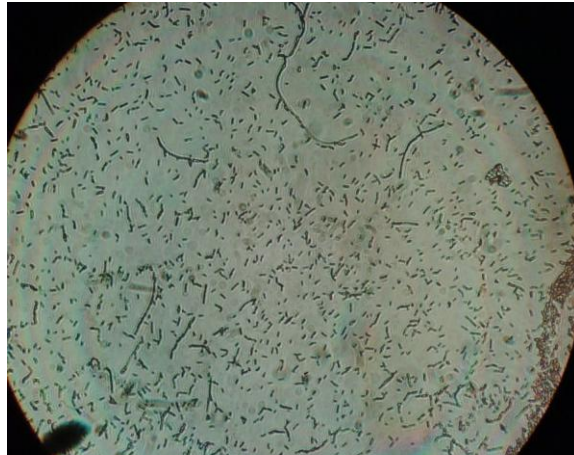


Figura 2. En la tinción Gram, *H. pylori* se observa como un bacilo Gram negativo.

Características Bioquímicas

Su característica bioquímica más importante es la producción de ureasa, considerablemente más potente que la de otras bacterias, puesto que es un neutrófilo ácido tolerante, que expresa un pH neutro óptimo mediante su vasta producción de ureasa, con lo cual logra mantener la fuerza motriz de protones (PMF) (Weeks y col., 2000). Esta enzima cataliza la hidrólisis de urea para proporcionar amonio y carbamato, el cual al descomponerse, produce otra molécula de amonio y una de ácido carbónico, con lo cual se crea un microambiente neutro en las glándulas gástricas colonizadas (Rivas-Traverso y Hernández., 2000). La gran capacidad de síntesis de esta enzima es a su vez un indicador utilizado en la detección de la infección por *H. pylori*. También posee dos enzimas muy útiles para su identificación cuando crece en medios de cultivo que son la oxidasa y la catalasa (Alarcón y Domingo, 2004).

Factores de Virulencia

Uno de los factores de virulencia de esta bacteria es la misma sobreproducción de ureasa, puesto que el hidróxido de amonio que es producido mediante la hidrólisis de la urea provoca un daño histológico, y aunque el amonio en sí no es tóxico, una vez generado un equilibrio entre el amonio y el agua, se producen iones hidróxido, los cuales debilitan el moco gástrico, efecto que permite a la bacteria desplazarse con mayor facilidad, ocupando más espacios intercelulares (Rivas-Traverso y Hernández, 2000).

Esta bacteria es productora de ciertas proteínas, que atraen neutrófilos y macrófagos, los cuales son responsables de la inflamación de la zona afectada. Estas células también segregan citotoxinas responsables del daño a la mucosa, provocando la secreciones por parte del hospedero, tales como interleucina (IL)-1-12, interferón gamma (IFN- γ), especies reactivas de oxígeno (ROS), factor de activación plaquetaria (PAF) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), asimismo la bacteria produce lipopolisacáridos y fosfolipasas (Triana, 2001).

Infección por *Helicobacter pylori*

La infección por *H. pylori* se ha convertido en un serio problema de salud pública (Lagunes-Yanelli y col., 2010). Su prevalencia es de aproximadamente 30 a 50% en poblaciones de países desarrollados mientras que, en países subdesarrollados puede sobrepasar el 80%. Esto es atribuido a las condiciones insalubres encontradas en poblaciones de bajos recursos (Vallejos y col., 2003).

Se ha comprobado que la prevalencia de infección por *H. pylori* es dos veces mayor en hijos de mujeres con antecedentes de úlceras pépticas y duodenales que en hijos de mujeres sanas (Triana, 2001), siendo usual la expresión de una misma cepa entre los distintos miembros de una familia (Raymond y col., 2004).

La literatura más reciente refiere su adquisición por vía oro-oral y gastro-oral, dado que se ha confirmado la presencia del DNA de *H. pylori* en saliva, placa dental, vómito y jugos gástricos; así como por vía fecal-oral, habiéndose encontrado *H. pylori* en heces, de manera que puede hallarse en aguas contaminadas, sobretodo en poblaciones de bajo nivel socioeconómico (Hernández-Hernández y col., 2009; Rivas-Traverso y Hernández, 2000). La adquisición natural de *H. pylori* ocurre con frecuencia durante la infancia (Lagunes-Yanelli, 2010; Chey y Wong, 2007) y una vez que se establece, la infección puede persistir durante toda la vida, aunque también se ha descrito su eliminación natural (Alarcón y Domingo, 2004).

Enfermedades Asociadas a *H. pylori*

La mayoría de las personas se presentan como asintomáticas, mientras que el 15% de los infectados con esta bacteria desarrollan una gastritis superficial, donde se presenta un cuadro clínico que se caracteriza por náuseas, vómito mucoso, dolor abdominal y malestar general (Triana, 2001), que puede permanecer así durante toda la vida o al cabo de años o décadas, alrededor del 10% al 15% pueden desarrollar úlcera péptica gástrica o una gastritis atrófica que

podría ser el primer paso para la evolución a cáncer gástrico, el cual se presenta entre 1% a 3% de la población infectada, de manera que se estima que un 7% de la población a nivel mundial podría desarrollar eventualmente cáncer gastrointestinal asociado a *H. pylori* (Torres y col., 2005), siendo postulado el cáncer gástrico como la segunda causa de mortalidad dentro de las patologías digestiva maligna.

H. pylori ha sido asociado con otras patologías como, dispepsia (Chey y Wong, 2007), gastritis antral tipo B, Linfoma de células B, Linfoma gástrico tipo MALT (*mucosa associated lymphoid tissue*) (Wenming y col., 2012; Parsonnet y col., 1991) y adenocarcinoma gástrico (Blaser y col., 1995). Además se ha correlacionado con otras patologías extra gastrointestinales (Nutpho y Ukarapol, 2006) como enfermedades vasculares (Rivas-Traverso, 2000) y trombocitopenia purpúrica autoinmune (Inaba y col., 2005; Jackson y col., 2005).

También ha sido correlacionada con patologías desencadenadas por la falta de vitamina B12, como la anemia perniciosa y manifestaciones patológicas del sistema nervioso central y periférico, donde la sola erradicación de la bacteria basta para corregir los niveles de vitamina B12 y por ende las patologías mismas (Ruiz-Álvarez y col., 2005; Triana, 2001).

Terapias de Erradicación

La primera terapia eficaz utilizada fue la "triple clásica" que asocia un imidazol (metronidazol o tinidazol) con tetraciclina y amoxicilina durante dos semanas. Ésta fue sustituida por una pauta de tratamiento en la que se combinan dos o tres antimicrobianos junto con un compuesto anti-ulceroso, es decir un inhibidor de la bomba de protones que permite modificar el pH para que actúe el antibiótico (Chey y Wong, 2007).

La duración de la terapia habitual ha sido de siete días, aunque algunos autores han probado pautas cortas, de tres a cinco días que incluyen tres antibióticos. Antes de iniciar una pauta de tratamiento se debe considerar el porcentaje de resistencia a los antimicrobianos en esa población o área geográfica. También se ha demostrado que la terapia triple presenta una alta tasa de erradicación cuando se practican pruebas de susceptibilidad antes de realizar la prescripción del tratamiento (Mégraud, 1997). Esto, dado que se ha registrado la frecuencia de resistencia a los antibióticos utilizados en el tratamiento/erradicación donde se observa una amplia variación entre regiones geográficas.

Entre los antimicrobianos que han mostrado buena utilidad clínica se encuentran: amoxicilina, tetraciclina, metronidazol y claritromicina. La furazolidona, rifabutina o las fluoroquinolonas son otras opciones terapéuticas, mientras que entre los compuestos anti-

ulcerosos se han utilizado con preferencia inhibidores de la bomba de protones (IBP) (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol, esomeprazol), seguido de compuestos de bismuto (citrato de bismuto, salicilato de bismuto, RBC: ranitidina citrato de bismuto) y en mucha menor frecuencia los antagonistas de los receptores H₂ (ranitidina, cimetidina, famotidina, etc).

Como primera opción se recomienda la pauta de terapia triple con un IBP y dos antimicrobianos. Si este tratamiento falla, se debe evitar repetir dos veces la misma pauta y recomienda realizar estudios microbiológicos antes de iniciar una nueva pauta (Alarcón y Domingo, 2004). La asociación de un IBP (generalmente omeprazol) con claritromicina y amoxicilina (conocida como la OCA) es la pauta más utilizada, logrando tasas de erradicación superiores al 90%, aunque también se puede utilizar una terapia triple con un IBP, amoxicilina y metronidazol. Es preferible reservar la pauta que incluye IBP con metronidazol y claritromicina como de segunda línea para evitar que se pueda desarrollar resistencia a los dos antimicrobianos. La combinación de un IBP y dos antibióticos con las sales de bismuto se conoce como "terapia cuádruple", alcanza altas tasas de erradicación pero debe reservarse también para cuando fallen otras terapias (Chey y Wong, 2007). Recientemente se han propuesto pautas que asocian un IBP con fármacos como rifabutina o levofloxacino, sin embargo aún se tiene poca experiencia con ellos (Stasi y col., 2009).

Otras nuevas estrategias son enfocadas en el uso de antígenos de *H. pylori* combinados con adyuvantes atenuados de cepas de *Salmonella*, los cuales pudieran generar los niveles necesarios de anticuerpos para controlar la infección (Triana, 2001).

A pesar de las recomendaciones de terapias adecuadas para el tratamiento de la infección tomando en cuenta todos los factores necesarios, nos encontramos con situaciones limitantes a parte de la resistencia bacteriana, tales como la disponibilidad del antibiótico en la región y el costo del mismo. Factores que indudablemente tendrán una influencia sobre el tratamiento a seleccionar (Chao y col., 2012).

Resistencia y Necesidad de Nuevas Alternativas

Existe una creciente preocupación a causa del uso indiscriminado de los antibióticos y de la nueva emergencia de microorganismos patógenos resistentes a los antibióticos de presente disponibilidad (Vallejos y col., 2003).

La resistencia de *H. pylori* ante los antibióticos es un problema a nivel mundial que requiere de atención urgente por parte de salud pública. Estos casos de resistencia varían entre distintas zonas geográficas como se puede observar en la figura 3.

Es importante tomar en cuenta que la resistencia a determinado antibiótico puede presentarse como resultado del uso previo del antibiótico como tratamiento de alguna otra infección gastrointestinal, así como mal uso de estos agentes ya sea por automedicación o mala regularización farmacéutica.

La terapia triple no siempre tiene éxito en la erradicación ya que *H. pylori* durante los últimos años ha demostrado un aumento continuo en el desarrollo de resistencia a los antibióticos (Castillo-Juárez y col., 2009), incluyendo imidazol y claritromicina, lo cual representa un problema reflejado en la reducción de la eficacia del tratamiento. Aunque la tasa de erradicación de esta bacteria presentaba un 80% de eficacia (Chao y col., 2012), en los últimos años ha podido observar un decremento de su efectividad hasta 60%, dado el inadecuado uso de antibióticos en países desarrollados, un ejemplo de ello es el uso frecuente de metronidazol (Mégraud, 1997). Por otro lado se ha encontrado que en el fracaso del tratamiento pueden intervenir no solo los factores relacionados con el mismo tratamiento y las cepas, las cuales dependen de la región geográfica (Ruíz-Alvarez y col., 2006) sino también factores del paciente, como la alta acidez gástrica y el incumplimiento de tratamiento, lo cual resulta en una resistencia de la cepa en cuestión, carga bacteriana (Chao y col., 2012) y polimorfismo del CYP2C19 (Furuta y col., 2000).

La resistencia microbiana puede involucrar diferentes mecanismos. Por ejemplo la falta de penetración de la droga: esto suele suceder con la mayoría de los antibióticos. Algunas bacterias tienen la capacidad de producir ciertas enzimas extracelulares capaces de hidrolizar el anillo β -Lactámico de los antibióticos beta-lactámicos antes de que la molécula penetre la bacteria. La inactivación del antibiótico ocurre mayormente sobre β -Lactámicos y aminoglucósidos (Mégraud, 1997).

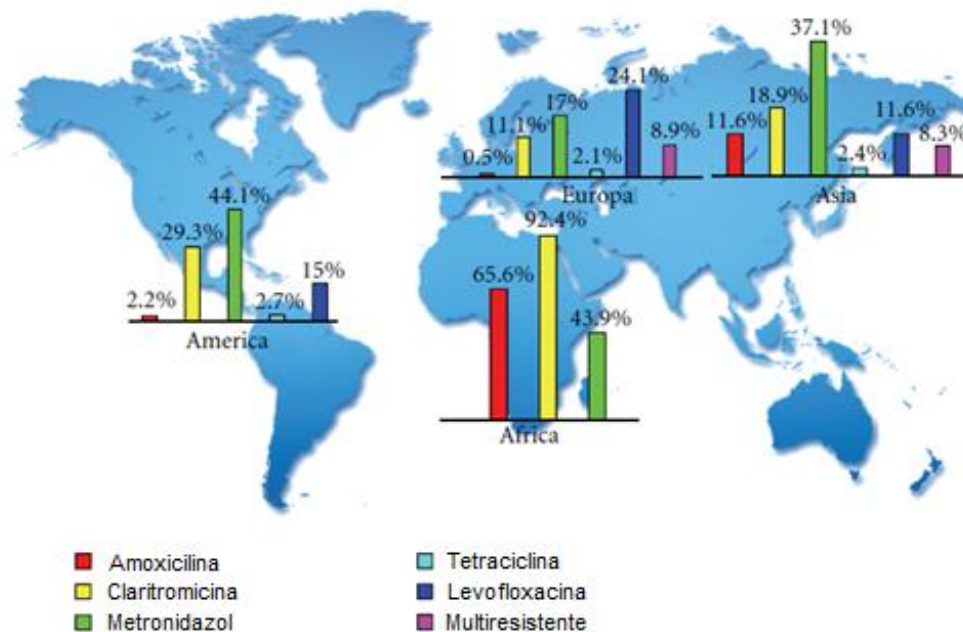


Figura 3. Prevalencia de la resistencia de *Helicobacter pylori* frente a antibióticos en diferentes continentes (Wenming y col., 2012).

Plantas Medicinales

Uso de Plantas Medicinales como Tratamiento Alternativo contra Infecciones Microbianas

A lo largo de la historia las plantas han tenido un papel decisivo como fuente de alimentos y medicamentos. La actividad terapéutica de las plantas se puede conseguir no solo mediante procesos de extracción y purificación de los activos, sino directamente de la misma planta o de extractos simples de obtener tales como sus infusiones acuosas.

En los últimos años se ha observado un incremento en el uso de plantas medicinales y de sus derivados. Esto debido a los recientes conocimientos de la composición química así como varios ensayos farmacológicos tanto *in vivo* como *in vitro* de los mismos. De manera que actualmente el uso empírico de plantas medicinales está científicamente sustentado (Araujo y Salas, 2008). Existen plantas de uso medicinal a las cuales se les atribuyen propiedades terapéuticas para tratamiento de alteraciones gastrointestinales y casos de dispepsia, tales como: *Asadirachda indica*, *Rosmarinus officinalis*, *Melissa officinalis*, *Mentha piperita*,

Mamordica charanta, *Angelica arcgangelica*, *Carum carvi*, *Chelidonium majus*, *Iberis amara*, *Matricaria recutita*, *Anthemis nobilis*, *Brassica oleareacea*, *Maythemus aquifolium*, entre otras (Repetto y Llesuy, 2002; Krapp y Longe, 2003).

Sustancias Producidas por las Plantas y su Mecanismo Terapéutico

Los compuestos fitoquímicos con probable actividad antibacteriana pueden ser agrupados en las siguientes categorías.

Fenoles y polifenoles. Se presume que su actividad se debe a la inhibición enzimática, posiblemente por acción sobre los grupos sulfhidrílos de sus aminoácidos de cisteína o mediante reacciones más inespecíficas con proteínas bacterianas.

Quinonas. Su rango de la actividad antimicrobiana es amplio actuando posiblemente sobre las adhesinas expuestas en la superficie de las bacterias, sobre los polipéptidos de la pared celular y sobre las enzimas unidas a membranas.

Flavonas, flavonoides, flavonoles. Estos compuestos son sintetizados por la planta como respuesta de defensa frente a una infección microbiana. Su actividad antibacteriana se debe probablemente a su capacidad de generar complejos con proteínas extracelulares y proteínas solubles.

Particularmente los flavonoides poseen amplios efectos biológicos, entre los cuales se incluye la actividad antiulcerogénica. Son varios mecanismos propuestos para explicar el efecto gastroprotector de los flavonoides, tales como un aumento del contenido mucosal de prostaglandinas, disminución de la secreción de histamina, eliminación de radicales libres, incremento de la perfusión vascular y reducción de la adherencia leucocitaria (Bucciarelli y Skliar., 2007).

Algunas sustancias actúan como inhibidores de la peristalsis gastrointestinal, la cual está íntimamente relacionada con la capacidad de que los extractos permanezcan mayor o menor tiempo en contacto con las paredes del estómago, prolongando el efecto citoprotector. De esta manera es que previenen lesiones en la mucosa gástrica producidas por diferentes métodos y la protegen contra distintos agentes necróticos. Esto sugiere que los flavonoides, presentes en extractos alcohólicos de plantas, podrían ser principios activos responsables, al menos en parte,

de la actividad antiulcerosa exhibida por las plantas estudiadas, aunque no puede descartarse la acción de otros compuestos presentes ellas (Bucciarelli y Skliar., 2007).

Taninos. Provocan una estimulación de la actividad fagocitaria, actividad antitumoral mediada por el hospedero y un amplio rango de actividad antiinfecciosa. Se cree que la actividad antimicrobiana de estos compuestos se debe a su interacción sobre las adhesinas, proteínas de la pared celular, y a su capacidad de unirse a polisacárido (Araujo y Salas, 2008).

Cumarinas. Se ha observado que presentan actividad antiviral, asimismo han presentado actividad antimicrobiana contra *Candida albicans* en ensayos *in vivo* en conejos.

Terpenoides y aceites esenciales. Los terpenos o terpenoides presentan actividad contra bacterias, virus, hongos y protozoarios. Se cree que esta actividad antimicrobiana se debe a una perturbación de la estructura de la membrana celular por su naturaleza lipofílica. Se ha reportado que los terpenoides actúan contra *Listeria monocytogenes*. El ácido betulínico (triterpenoide) muestra actividad inhibitoria del virus VIH. El petalostemumol presenta una actividad excelente contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, aunque muestra una actividad inferior sobre bacterias Gram negativas y *Candida albicans*.

Alcaloides. Se han probado glicoalcaloides de especies *Solanum* que podrían útiles contra infecciones por VIH así como contra infecciones intestinales relacionadas con el SIDA. Al igual, existen alcaloides que tienen actividad antiparasitaria contra *Giardia* y *Entamoeba*. Se cree que su acción antidiarreica se puede deber a sus efectos sobre el tiempo de tránsito en el bolo alimenticio del intestino delgado.

Lectinas y polipéptidos. Su actividad se infiere gracias a la formación de canales iónicos en la membrana del microorganismo o la inhibición competitiva de la adhesión de proteínas a los receptores polisacáridos del hospedero. Las tiorinas son péptidos tóxicos para levaduras y bacterias Gram positivas y Gram negativas, como por ejemplo las Fabatinas que inhiben el crecimiento de *Pseudomonas*, *E. coli*, *Enterococcus*, etc. Los péptidos cíclicos son pequeños en tamaño y número de aminoácidos (por lo general menos de 15 aminoácidos) y son sintetizados por bacterias y plantas (Araujo y Salas, 2008).

Plantas Medicinales de Uso Tradicional en el Estado de Sonora

En la Tablas 1 y 2, se muestra una relación de plantas empleadas por la etnofarmacopea sonorenses, así como las aplicaciones que tradicionalmente se les han asignado por diversos grupos étnicos del estado.

Tabla. 1 Uso medicinal de plantas en Sonora 1.

Nombre científico/ Nombre común	Uso tradicional
<i>Allium sativum</i> / Ajo	Fue empleado contra el cólera, tifus y disentería. Actualmente es utilizada en enfermedades coronarias, agregación plaquetaria, diabetes, trastornos infecciosos, erradicación de gusanos intestinales y múltiples alteraciones de la salud.
<i>Ambrosia ambrosioides</i> / Chicura	Auxiliar en el parto y recuperación post parto.
<i>Anemopsis californica</i> / Hierba del manso	Desinfectar y curar llagas, reumatismo. Se utiliza solo la hoja o la planta completa.
<i>Argemone mexicana blanca</i> / Cardo	Dolor de riñones, hemorragia después del parto, problemas urinarios, carnosidad e infección en ojos, jiole. Se utiliza la savia, hoja y planta completa dependiendo del padecimiento.
<i>Asadirachda indica</i> / Neem	Tratamiento de la fiebre, enfermedad gastrointestinal, trastornos dermatológicos, disfunción inmunitaria, enfermedad respiratoria, trastornos inflamatorios, infecciones por parásitos, bacterias, hongos y virus. Como antisépticos, astringentes y antiinflamatorios.
<i>Aviccenia germinas</i> / Mangle blanco	Dolor de riñones, muelas, corazón y llagas.
<i>Baccharis glutinosa</i> / Batamote	Dolor de estómago, dolor de cabeza, dolor muscular, fiebre.
<i>Bursera microphylla</i> / Torote	Herida por mantarraya, dolor de cabeza, secar base de cordón umbilical, erradicar piojos, llagas de cabeza, cortadas o rasguños de la cara, infecciones de cabeza.
<i>Chenopodium ambrosioides</i> / Epazote rojo	Para expulsar lombrices o amibas. Posee propiedades antihelmínticas.
<i>Eucalyptus</i> / Eucalipto	Utilizado en el tratamiento de tos, gripe, asma, sinusitis, faringitis, dolor de oído, inhibición de infecciones, caspa, acné, periodonitis y gingivitis. Al ser aplicado en heridas se previene la infección por bacterias y virus.
<i>Euphorbia prostrata</i> / Golondrina	Llagas, heridas y sarampión.

(Adaptación de Krapp y Longe, 2003)

Tabla. 2 Uso medicinal de plantas en Sonora 2.

Nombre científico/ Nombre común	Uso tradicional
<i>Larrea tridentata</i> / Gobernadora	Se utilizan hojas, ramas con hojas o raíz, para curar el mal de orín, reumas, calentura con frío, dolor muscular, dolor de cabeza y pies, mareo, herida por mantarraya, escoraciones, cálculos biliares y renales, y erradicación de parásitos intestinales.
<i>Mascagnia macroptera</i> / Gallinita	Casos de refriados, diarrea y debilidad.
<i>Jatropha cinérea</i> / Sangregrado	Dolor de muela, cataratas, diabetes, disentería y llagas en la boca de niños. Dentro del género <i>Jatropha</i> existen especies cuyo látex es colectado del pecíolo de las hojas el cual es utilizado sobre heridas infectadas.
<i>Proboscidea parviflora</i> / Uña de gato	Alivia acné, alergias, artritis, asma, candidiasis, inflamación crónica, diabetes mellitus, depresión, infección por virus Epstein-Barr, fibromialgia, hemorroides, herpes, hipoglucemia, lupus eritematoso sistémico, parásitos, infecciones respiratorias, infecciones virales y heridas.
<i>Ricinus communis</i> / Higuerilla	Llagas en la cabeza. Como poderoso laxante.
<i>Rizophora sp</i> / Mangle rojo	Se utiliza el fruto con raíz seca en casos de disentería.
<i>Rosmarinus officinalis</i> / Romero	Estimulante circulatorio, curación de heridas, dolor de cabeza, cólico, diarrea y trastornos dispépticos. Como estimulante digestivo, tónico hepático y astringente.
<i>Turnera difusa</i> / Damiana	Se utilizan en conjunto las ramas y hojas para la gripa y dolor de cuerpo.
<i>Valeriana officinalis</i> / Valeriana	Actúa como calmante de dolor, antiespasmódico, sedante y carminativo, reduce la ansiedad, el insomnio y el dolor de cabeza, reduce espasmos del estómago, intestino irritable y malestar gástrico causado por nerviosismo.

(Adaptación de Krapp y Longe, 2003)

Plantas Medicinales Anti - *Helicobacter pylori*

Recientemente los estudios relacionados con plantas medicinales con actividad anti-*H. pylori* han ido en aumento. Los fitoquímicos podrían efectivamente ser una fuente alternativa para la erradicación de esta bacteria, ya que constituyen una fuente rica en compuestos químicos. Aunque se sabe que la actividad de un compuesto activo puede ser directa sobre el epitelio de la mucosa gástrica, también existe una segunda opción, en la cual el principio activo puede ser absorbido desde la base hasta la parte apical del epitelio gástrico. Por lo cual, es necesario que

éste siga siendo activo incluso después del pasaje trans-intestinal. En cualquiera de los procesos, la velocidad de absorción, la biodisponibilidad y la vida media del compuesto activo son factores de suma importancia (Tan y col., 2010).

Enantia chlorantha, es un árbol que en la selva sur de la zona de Camerún, se utiliza para el tratamiento tradicional de problemas de estómago. Le ha sido identificado un tipo de alcaloide el cual posee un efecto citoprotector gástrico. Es por esta razón que Tan y col. (2010) estudiaron la actividad antibacteriana *in vitro* e *in vivo* del extracto acuoso del tallo de *Enantia chlorantha* contra *Helicobacter* y *Campylobacter jejuni*, determinando que en su actividad *in vitro* se encuentra con una MIC de 0.39 mg/mL tanto para *H. pylori* como para *C. jejuni* y *Campylobacter coli*. Los autores concluyen que la efectividad del extracto puede no resultar únicamente de la acción tópica, sino también tener lugar mediante un componente sistémico.

Nostro y col. (2005), probaron la actividad anti-*H. pylori* de 17 plantas medicinales, evaluando sus extractos acuosos e hidroalcohólicos. Los extractos se aplicaron contra una cepa de referencia ATCC 43629 y 11 cepas provenientes de aislados clínicos. Como resultado se obtuvieron 8 extractos acuosos y 13 extractos hidroalcohólicos con actividad anti-*H. pylori*. Las cepas de aislados clínicos etiquetadas como *H. pylori 4* y *H. pylori 5*, presentaron resistencia a rifabutina, tinidazol y claritromicina, así como *H. pylori 21* ante los últimos dos fármacos mencionados. Sin embargo, *H. pylori 4*, *H. pylori 5* y *H. pylori 21* se vieron inhibidos ante la presencia de los extractos hidroalcohólicos de *Cuminum cyminum* y *Propóleos*. A través de estudios fitoquímicos fueron aislados e identificados varios constituyentes de tales plantas, como flavonoides, terpenos, aldehídos aromáticos y alcoholes (Nostro y col., 2005).

Atapour y col. (2009) realizaron un ensayo antimicrobiano, evaluando extractos metanólicos de 12 plantas Iraníes, utilizadas en la medicina tradicional. Los extractos se aplicaron sobre dos cepas, una resistente y una sensible a metronidazol. Se encontró que diez de los doce extractos preparados presentaron actividad anti-*H. pylori*. Los extractos no mostraron una diferencia significativa entre la inhibición sobre la cepa resistente y la cepa sensible a metronidazol, lo que significa que el mecanismo por el que inhibe el crecimiento de la bacteria, es diferente al utilizado por metronidazol. De los extractos de las 12 plantas evaluadas, el extracto de hojas de *Salvia mirzayanii* demostró poseer un mayor potencial antibacteriano contra esta bacteria sobre el resto de los extractos evaluados.

En base a la información etnobotánica obtenida a través de profesionales de la medicina tradicional de Malasia, Uyub y col. (2010) seleccionaron treinta y dos plantas utilizadas para el tratamiento de malestares estomacales y la cura de las heridas o lesiones del tejido externo. Elaboraron cuatro tipos de extractos de cada planta; acuosos, metanólicos, a partir de éter de

petróleo y cloroformo; utilizando distintas fracciones de las plantas: hoja, raíz, tallo, rizomas o toda la planta. Los extractos fueron evaluados contra cepas de *H. pylori* resistentes a metronidazol, encontrando que todas las plantas evaluadas presentaban actividad *in vitro* anti-*H. pylori*. Los extractos presentaron distintos niveles de actividad antibacteriana, dependiendo de la fase de extracción utilizada. El 98% de los extractos de solventes orgánicos presentó actividad frente a *H. pylori*, mientras que el 10% de los extractos acuosos tuvo dicha actividad. Por su alto nivel de actividad antibacteriana, se seleccionaron los extractos de solventes orgánicos de *Derris trifoliata* para una evaluación de toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina*, presentando niveles de toxicidad sumamente altos en las concentraciones alrededor de la MIC previamente determinada. Sin embargo, la toxicidad de una muestra ha demostrado ser dependiente de la concentración de ciertos compuestos específico, de manera que el nivel de toxicidad observado en dicho estudio puede haber resultado de la presencia de múltiples compuestos en los extractos crudos, actuando en sinergia o de forma independiente. Por lo tanto, un aislamiento y prueba del componente puro anti-*H. pylori* podría resultar en la disminución de la toxicidad.

En la búsqueda de evidencias *in vitro* de la actividad anti-*H. pylori* de extractos diclorometánicos, hidroalcohólicos y acuosos, Claros y col. (2007) utilizaron plantas medicinales nativas de Bolivia evaluándolos contra cuatro cepas de *H. pylori*. Todos los extractos de las plantas evaluadas presentaron actividad contra *H. pylori*, presentando mejor actividad los extractos de diclorometano e hidroalcohólicos de *Cinopadium bolivianum* (Khoa), *Calendula officinalis* (Calendula) y *Piper angustifolium* (Matico), así como el extracto hidroalcohólico de *Plantago major* (Llantén).

En otro estudio, Adeniyi y col. (2009) estudiaron la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos crudos de *Eucalyptus camadulensis* y *Eucalyptus torelliana* contra *H. pylori*. Utilizando extractos obtenidos con n-hexano, metanol y cloroformo, se obtuvieron resultados de actividad anti-*H. pylori* en todos los extractos crudos a 100, 200 y 400 µg/mL. La excepción fueron los extractos metanólicos de tallo y hoja de *E. camadulensis* y hoja de *E. torelliana*. Un posterior estudio fitoquímico de estos extractos, indicó la presencia de taninos y saponinas los cuales han demostrado poseer potencial antimicrobiano y actividad protectora contra úlceras gástricas, concluyendo que estos extractos pueden representar una nueva alternativa de tratamiento contra las enfermedades gastrointestinales asociadas a *H. pylori*, tales como úlceras gástricas y duodenales.

Adeyini y col. (2009) evaluaron el extracto metanólico de *Eucalyptus grandis* sobre la producción de ureasa y la hidrofobicidad superficial de una cepa ATCC de *H. pylori* (43504) y

diez aislados clínicos. Este extracto presentó actividad anti-*H. pylori* contra la cepa ATCC y 8 de los aislados clínicos, observándose una inhibición directamente proporcional a la concentración. Un estudio fitoquímico posterior indicó el contenido de taninos, aceites esenciales y saponinas, al igual que la ausencia de alcaloides. Se observó una disminución en los niveles de producción de ureasa así como una disminución en la hidrofobicidad de la superficie celular de siete cepas.

Se ha sugerido que la actividad antioxidante directa sobre *H. pylori* puede disminuir el riesgo de desarrollar un cuadro de gastritis y úlceras duodenales, encontrándose la actividad bactericida en extractos elaborados a partir de mezclas de metanol:agua, donde fueron separados y evaluados los compuestos de alta polaridad, los cuales se presume podrían ser polifenoles y flavonoides polares (Ghannadi y col., 2004).

En el estudio de varios aceites esenciales de distintas plantas se ha demostrado que éstos pueden tener tanto actividad bactericida como bacteriostática. Mientras que a su vez se observa como aceites esenciales de plantas que contienen fenoles (orégano, clavo, tomillo y hoja de canela) y aldehídos (hierba de limón y canela) tienen una actividad inhibitoria considerable sobre bacterias Gram negativas y Gram positivas (Mayaud y col., 2008).

Al igual que la búsqueda de nuevas alternativas de antimicrobianos procedentes de plantas, es de suma importancia identificar los compuestos activos responsables de tales efectos, así como realizar las pruebas correspondientes para determinar las formas de acción mediante las cuales, estas sustancias proveen de protección antimicrobiana. En un estudio realizado por Funatogawa y col. (2004), se describe la actividad de taninos derivados de plantas medicinales con actividad antibacteriana contra *H. pylori*. Estos autores pudieron determinar las MIC de múltiples compuestos derivados de plantas, al igual que el daño morfológico provocado por efecto de dichos compuestos.

Una alternativa en los mecanismos de erradicación de la infección por *H. pylori*, consiste en el logro del desprendimiento de la bacteria en la mucosa gástrica, lo cual es debido a un efecto anti-adhesivo. O'Mahony y col. (2005) demuestran la capacidad de inhibir adhesión de *H. pylori* en el estómago por parte de extractos acuosos de cúrcuma, borraja, y perejil fresco a una concentración de 50 mg/mL.

Muchos agentes anti-*H. pylori* que presentan un importante efecto inhibitorio, se han identificado a partir de materiales vegetales. De hecho, es bien conocido que una gran variedad de materiales de plantas tienen una aplicación contra trastornos dispépticos gastrointestinales (Bucciarelli y Skliar., 2007).

De tal manera que vale la pena explorar una posible aplicación de estos hallazgos en la industria farmacéutica para la producción de compuestos de apoyo a los antibióticos para el tratamiento de la infección por *H. pylori*.

Está demostrado que dependiendo de la hierba utilizada, la actividad de agregación de células puede ser mejorada o inhibida (Alarcón y Domingo, 2004). Los extractos de plantas medicinales participan en la modulación de la primera fase de contacto con la mucosa. Lo anterior demuestra que es posible afectar las propiedades del tejido adhesivo de algunos patógenos bacterianos con dosis subletales de antibióticos. Sin embargo, la terapia con antibióticos puede causar problemas en el desarrollo de cepas de *H. pylori* resistentes a los antibióticos, por lo que la terapia combinada con extractos de plantas medicinales pueden ayudar a contrarrestar tales efectos, lo cual ha sido probado con extractos de plantas de guayaba, arándano rojo, manzanilla silvestre y hierba mala de piña.

Evaluación de Toxicidad de Extractos de Plantas

Múltiples sustancias naturales y plantas han presentado actividad anti-*H. pylori*, sin embargo sus altas MIC y niveles de toxicidad han representado una gran limitante frente a la explotación de estos hallazgos (Uyub y col., 2010).

El ensayo de letalidad evaluado en larvas de *Artemia salina* ha sido utilizado con eficiencia para detectar componentes con acción tóxica y ha demostrado buena correlación al evaluar extractos de plantas con la toxicidad aguda oral en ratones. Estos hallazgos refuerzan la importancia de la utilización de este ensayo como prueba alternativa de toxicidad. Con vistas a correlacionar la acción tóxica mostrada por extractos de plantas con otras actividades biológicas o con la presencia de determinados componentes químicos, varios autores reportan una clasificación de la toxicidad según el valor de la concentración letal 50 (CL₅₀) del extracto. Aunque estas clasificaciones poseen variaciones entre sí, todas coinciden en agrupar los extractos con CL₅₀ inferiores a 100 µg/mL en las categorías de mayor toxicidad, mientras, los que muestran valores superiores a 1000 µg/mL se clasifican como no tóxicos (Borroto y col., 2011).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Los extractos hidroalcohólicos fueron proporcionados por el Laboratorio de Ecología Química del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., con excepción de los extractos de Eucalipto, Romero, Batamote y Valeriana los cuales fueron preparados durante el presente estudio.

Recolección e Identificación de Plantas

Las plantas fueron recolectadas en diversas localidades, todas dentro del Estado de Sonora. Una muestra de cada especie vegetal fue autenticada y clasificada por el Herbario de la Universidad de Sonora, campus Hermosillo.

Extracción Hidroalcohólica de Especies Vegetales

Las plantas se dejaron sobre papel secante a temperatura ambiente (25°C) hasta que estuvieron secas. La extracción se hizo mediante un proceso de maceración. Se obtuvieron los extractos de 500 g de las plantas secas que se colocaron en frascos color ámbar, se adicionó 1 L de una solución de etanol-agua destilada al 70%, para la extracción hidroalcohólica. El macerado se dejó en reposo por un tiempo de 7 días en oscuridad a temperatura ambiente (25°C) (Claros y col., 2007).

Posteriormente, el macerado se filtró con una gasa para eliminar las partículas grandes, después se realizó una segunda filtración usando papel Whatman #43. Una vez filtrado el extracto, se evaporó a presión reducida a una temperatura no mayor de 40°C en baño María, utilizando para ello un evaporador rotatorio (Labconco) hasta la eliminación total del etanol, quedando la fracción acuosa.

Obtención de Extractos Liofilizados

Las fracciones acuosas provenientes de la eliminación del etanol, se sometieron a congelación (-20°C) durante la noche. Los extractos congelados se sometieron a liofilización durante un periodo aproximado de 4 días. Los extractos liofilizados fueron almacenados en viales

herméticos color ámbar a 4°C hasta su utilización. Los extractos evaluados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Extractos hidroalcohólicos evaluados.

Nombre científico	Nombre común	Nombre científico	Nombre común
<i>Allium sativum</i>	Ajo	<i>Encelia farinosa (flor)</i>	Rama blanca
<i>Ambrosia ambrosoides</i>	Chichura	<i>Eucalyptus radiata</i>	Eucalipto
<i>Anemopsis californica</i>	Hierba del manso	<i>Euphorbia (aerea)</i>	Golondrina
<i>Argemone mexicana blanca</i>	Cardo	<i>Euphorbia postrata</i>	Golondrina
<i>Artemisia ludovisiana</i>	Estafiate	<i>Hibiscus cannabinus</i>	Kenaf
<i>Asadirachda indica</i>	Neem	<i>Jatropha cinerea</i>	Sangrengado
<i>Atiplex elegans</i>	Saladito	<i>Larrea tridentata</i>	Gobernadora
<i>Aviccenia germinas</i>	Mangle blanco	<i>Mascagnia macroptera</i>	Gallinita
<i>Baccharis glutinosa</i>	Batamote	<i>Mellia azedarach</i>	Lila, piocha
<i>Bursera mycophilla I</i>	Torote rojo	<i>Proboscidea parviflora</i>	Uña de gato
<i>Bursera mycophilla II</i>	Torote rojo	<i>Ricinus communis</i>	Higuerilla
<i>Carya illinoensis</i>	Nogal WE 4cm	<i>Rizophora sp</i>	Mangle rojo
<i>Carya illinoensis</i>	Nogal Wichita	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero
<i>Cataranthus roseus</i>	Teresita	<i>Turnera difusa</i>	Damiana
<i>Chenopodium ambrosiodes</i>	Epasote rojo	<i>Valeriana officinalis</i>	Valeriana (hoja)
<i>Datura stramonium</i>	Toloache	<i>Valeriana officinalis</i>	Valeriana (flor)
<i>Encelia farinosa (hoja)</i>	Rama blanca	<i>Valeriana officinalis</i>	Valeriana (tallo)

Cepa de *H. pylori* y Métodos de Cultivo

La cepa utilizada para la realización de este experimental fue *Helicobacter pylori* ATCC 43504. Su mantenimiento fue a -20°C en caldo Brucella con 20% de glicerol, hasta su utilización.

La activación de la cepa se llevó a cabo en caldo Brucella adicionado con 10% suero de caballo (Jiang y Doyle, 2000; Majalca-Martínez y col., 2001) por un período de incubación de 48 horas y temperatura de 37°C, bajo condiciones microaerofílicas producidas por un sistema comercial (Anaerogen Oxoid). Una vez realizado el pre-enriquecimiento se sembró en agar Brucella, con 10% suero de caballo, 5% sangre humana y se incubó por 48 horas a 37°C en condiciones microaerofílicas. Una vez reactivadas y proliferadas las cepas, se conservaron cultivos en congelación a -20°C en caldo Brucella enriquecido con 10% de suero de caballo.

Pruebas Confirmatorias y de Viabilidad

Para las pruebas confirmatorias y de viabilidad se tomó una colonia aislada de *H. pylori* a la cual se le realizó prueba de catalasa, oxidasa, ureasa y tinción Gram (Tan y col, 2010).

Catalasa. Se tomó una colonia aislada con el asa y se coloca en un portaobjetos. Se coloca una gota de peróxido de hidrógeno. Al ser positiva se observa la formación de burbujas generadas por la liberación del oxígeno (Aquihuatl y col. 2012).

Oxidasa. Se tomó una colonia aislada con el asa y se coloca en un portaobjetos, donde se le agregó una gota de reactivo de Kovacs, observándose una reacción positiva donde se presenta una tonalidad azul, de 10 a 15 segundos después.

Ureasa. Se inoculó un medio líquido de urea, poniéndose a incubar durante 24 horas. Transcurrido el tiempo la producción de la enzima ureasa, se evidencía a través de un cambio de color en el medio, que va de color amarillo - naranja a rosa intenso.

Tinción Gram. Se tomó una colonia, exponiéndola a las distintas fases de la tinción Gram, observándose posteriormente los cambios bajo microscopio (Aquihuatl y col. 2012).

Evaluación de Actividad Antimicrobiana de Extractos Hidroalcohólicos contra *H. pylori*

La actividad antibacteriana de los 34 extractos hidroalcohólicos que se prepararon de las plantas contra *H. pylori*, se evaluaron con el método del disco de papel en placa utilizado por Heisey (1992). Este método consiste en medir el halo de inhibición inducido por el extracto después de 24 horas de incubación.

Método de Heisey (1992). Se prepararon discos estériles de papel con capacidad de absorción de 70 μ L y un diámetro de 3.9 mm. Primeramente se utilizó el mismo método de difusión en disco para probar la sensibilidad de la cepa frente a distintos antibióticos como Levofloxacin, Claritromicina, Metronidazol y Tetraciclina (Alarcón y Domingo, 2004). Se seleccionó Levofloxacin como control positivo de inhibición para *H. pylori* en el presente experimental. Como control negativo se seleccionó agua destilada ya que fue el solvente utilizado para disolver los extractos a evaluar. Una vez determinados los controles positivo y negativo, se procedió con la evaluación de extractos hidroalcohólicos. Cada uno de los extractos fue disuelto en agua destilada, obteniendo una concentración de 100 mg/mL. Para estas pruebas se prepararon placas con agar *Brucella* enriquecido con 10% suero de caballo y 5% sangre humana (Uyub y col., 2010). Las placas fueron inoculadas de forma masiva con un hisopo previamente sumergido en una solución con inóculo de *H. pylori* a 0.5 MacFarland. Una

vez absorbido el inóculo se colocaron los discos estériles con 70 µL de extracto a 100 mg/mL. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas en cámara de microaerobiosis.

Transcurrido el tiempo de incubación, se midieron los diámetros (mm) de los halos de inhibición que presentaban las placas por efecto de los extractos hidroalcohólicos. El ensayo se realizó por triplicado.

Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (MIC) se determinó en aquellos extractos que presentaron un halo de inhibición mayor a 1.1 mm.

Se utilizó una variación del método de difusión en disco que consistió en impregnar los discos con 70 µL de extracto a distintas concentraciones. Se determinó como MIC a la mínima concentración que mostraba inhibición de crecimiento sobre la bacteria (Atapour y col., 2009).

Ensayo de Letalidad con *Artemia salina* L.

Se prepararon 500 mL de solución de agua de mar (Tabla 4) a la cual se le agregaron 10 mg de quistes de *Artemia salina*, los cuales se mantuvieron en incubación en oscuridad y con fuente de aire durante 24 horas a 25°C. Una vez eclosionados los huevecillos, se seleccionaron diez nauplios y se colocaron en vasos con agua de mar artificial limpia, donde se agregó el extracto obteniendo un volumen final de 10 mL y una concentración correspondiente a la MIC de cada uno de los extractos. A su vez se evaluaron una concentración menor y una mayor a la MIC. Cada evaluación se realizó por triplicado. Una vez que los diez nauplios sanos estuvieron en contacto con el extracto se mantuvieron a 25°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, se determinó el porcentaje de nauplios vivos a las 24 horas de contacto con el extracto, se contó el número de organismos muertos y se calculó el porcentaje de mortalidad. Las larvas se consideraron muertas si no exhibían movimiento durante varios segundos de observación al microscopio estereoscópico. El experimento se consideró válido si el porcentaje de mortalidad en los controles negativos (vasos preparados e incubados en las mismas condiciones pero en ausencia de extracto) no excedió de 10%. Como control positivo se utilizó dicromato de potasio a 10mg/mL. Cada concentración se evaluó por triplicado y cada extracto se ensayó 2 veces.

Se realizó una regresión lineal Probit, dando a conocer la relación que existe entre la concentración del tóxico (en este caso cada uno de los extractos hidroalcohólicos con actividad anti-*H. pylori*) y la mortalidad. Para ello la respuesta acumulada de los organismos (mortalidad

acumulada) se transforma a unidades probit (eje Y) y la concentración de tóxico se transforma logarítmicamente (eje X). El resultado es una recta en la cual podemos interpolar el 50% de la respuesta y conocer que concentración de tóxico causa esa respuesta (CL50). En este caso la CL50 (para 24 horas) es la concentración letal 50, es decir la concentración de tóxico necesaria para causar la muerte del 50% de la población de estudio en un tiempo determinado.

Tabla 4. Composición de agua de mar para nauplios de *Artemia salina* L.

Sal	g/ Lt
NaCl	24
CaCl ₂	1.5
KBr	0.1
KCl	0.7
Na ₂ SO ₄	4.4
NaHCO ₃	0.2
MgCl ₂ 6H ₂ O	11

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La activación de la cepa de *H. pylori* ATCC 43504 se realizó en caldo Brucella con 10% de suero de caballo, como es sugerido por Majalca-Martínez y col. (2001). Dando un tiempo de incubación de 24 horas en microaerobiosis a 37°C y se procedió a sembrar por estría en placa Agar Brucella adicionando 5% de sangre O+ (unidades donadas por el banco de sangre). A su vez se tomó un inóculo directo del vial preservado a -20°C. Las tinciones Gram revelaron diferencias morfológicas en ambos cultivos, donde las colonias de placas con inóculo directo del vial presentaba formas cocoides Gram negativo, las cuales suelen presentarse en situaciones de estrés o en cultivos viejos donde la bacteria se predispone a apoptosis; mientras que las colonias que recibieron pre-enriquecimiento en caldo, presentaron formas de bacilos Gram negativos típicos de las colonias de *Helicobacter pylori*. Con esto se comprueba que *H. pylori* realiza cambios morfológicos como medio de adaptación y supervivencia bajo situaciones de estrés. Por lo tanto es importante realizar un pre-enriquecimiento antes de poner en contacto la bacteria de interés con el agente en evaluación (en este caso los extractos), ya que podrían obtenerse resultados erróneos a causa de la desventaja que presenta la bacteria al no haber salido de su fase de estrés celular. En las pruebas realizadas para asegurar la presencia de la bacteria de interés se mostraron las características morfológicas y bioquímicas que caracterizan a *H. pylori* tal como se presenta en la Tabla 5 y en las Figura 4.

Tabla 5. Pruebas de viabilidad de cepa *Helicobacter pylori*.

Prueba	Resultado
Ureasa	Positivo (+)
Oxidasa	Positivo (+)
Catalasa	Positivo (+)
Tinción Gram	Bacilo Gram negativo

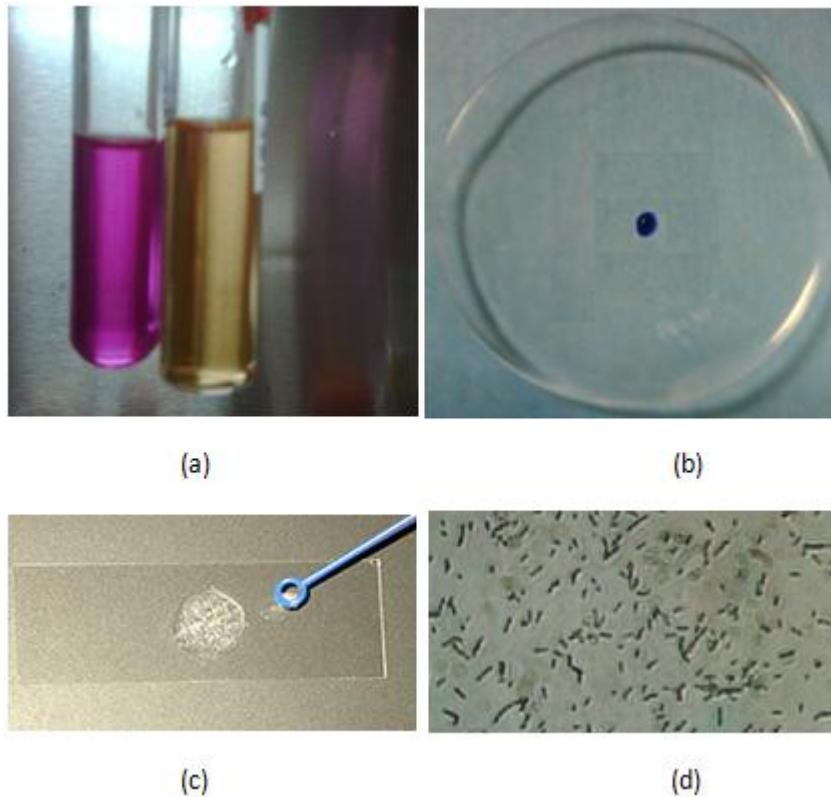


Figura 4. Pruebas bioquímicas. (a) Prueba de ureasa positiva, (b) Prueba de oxidasa positiva, (c) Prueba de catalasa positiva, Tinción con bacilos Gram negativo.

Evaluación de la Actividad Antibacteriana sobre *H. pylori*

Se ha comprobado que la erradicación de *H. pylori* es difícil, dado que no siempre hay drogas efectivas disponibles y se ha elevado la tasa de resistencia de éste microorganismo ante las mismas. El tratamiento para la infección de *H. pylori* generalmente implica la combinación de dos o más antibióticos y un inhibidor de la bomba de protones. Sin embargo, el organismo ha encontrado la manera de crear resistencia a tales antibióticos lo que conlleva a recaídas y desarrollo de complicaciones a causa de la infección.

Actualmente la medicina tradicional y popular ha retomado importancia en las investigaciones científicas, dada la falta de fármacos y la urgente necesidad de medicamentos efectivos que no ocasionen efectos secundarios en los pacientes. Rescatando el conocimiento de nuestras etnias y culturas, las mismas que sugieren terapias alternativas en base al uso de plantas medicinales.

Para este estudio se utilizaron 34 extractos de plantas, de las cuales 26 se encontraban en el laboratorio y 8 se colectaron y prepararon sus extractos en este trabajo: *A. sativum* (Ajo),

E. radiata (eucalipto), *R. officinalis* (Romero), *V. officinalis*, *D. stramonium* (Toloache), *C. illinoensis* (Nogal WE), *C. illinoensis* (Nogal Wichita) y *B. glutinosa* (Batamote), para su extracción hidroalcohólica.

Los 34 extractos fueron evaluados por el método en disco de papel en placa donde los discos se elaboraron de manera que tuvieran una capacidad de absorción de 70 μ L con la finalidad de poder manejar las concentraciones por disco deseadas.

Teniendo como objetivo un apoyo en el tratamiento para la erradicación de la infección, se consideró como actividad inhibitoria cualquier extracto que presentara un halo de inhibición igual o mayor a 2 mm como se muestra en la Figura 5.

En el presente estudio se lograron identificar cinco extractos con actividad anti-*H. pylori* mediante los ensayos *in vitro*, los cuales se muestran en la Tabla 6.



Figura 5. Halos de inhibición por actividad anti-*H. pylori* del extracto de *Allium sativum*.

La evaluación de los extractos hidroalcohólicos muestra la actividad anti-*H. pylori* de *A. sativum*, *E. radiata*, *R. officinalis* y *V. officinalis* tal como se reporta en la Tabla 7 de resultados.

Tabla 6. Actividad antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos evaluados.

No.	Planta	Nombre común	Actividad
1	<i>Allium sativum</i>	Ajo	Activo
2	<i>Ambrosia ambrosoides</i>	Chicura	Inactivo
3	<i>Anemopsis caifanica</i>	Hierba del manso	Inactivo
4	<i>Argemone mexicana blanca</i>	Cardo	Inactivo
5	<i>Artemisia ludovisiana</i>	Estafiate	Inactivo
6	<i>Asadirachda indica</i>	Neem	Inactivo
7	<i>Atiplex elegans</i>	Saladito	Inactivo
8	<i>Aviccenia germinas</i>	Mangle blanco	Inactivo
9	<i>Baccharis glutinosa</i>	Batamote	Inactivo
10	<i>Bursera mycophilla I</i>	Torote rojo	Inactivo
11	<i>Bursera mycophilla II</i>	Torote rojo	Inactivo
12	<i>Carya illinoensis</i>	Nogal WE 4cm	Inactivo
13	<i>Carya illinoensis</i>	Nogal Wichita	Inactivo
14	<i>Cataranthus roseus</i>	Teresita	Inactivo
15	<i>Chenopodium ambrosiodes</i>	Epasote rojo	Inactivo
16	<i>Datura stramonium</i>	Toloache	Inactivo
17	<i>Encelia farinosa (hoja)</i>	Rama blanca	Inactivo
18	<i>Encelia farinosa (flor)</i>	Rama blanca	Inactivo
19	<i>Eucalyptus radiata</i>	Eucalipto	Activo
20	<i>Euphorbia (aerea)</i>	Golondrina	Inactivo
21	<i>Euphorbia postrata</i>	Golondrina	Inactivo
22	<i>Hibiscus cannabinus</i>	Kenaf	Inactivo
23	<i>Jatropha cinérea</i>	Sangrengado	Inactivo
24	<i>Larrea tridentata</i>	Gobernadora	Inactivo
25	<i>Mascagnia macroptera</i>	Gallinita	Inactivo
26	<i>Mellia azedarach</i>	Lila, piocha	Inactivo
27	<i>Proboscidea parviflora</i>	Uña de gato	Inactivo
28	<i>Ricinus communis</i>	Higuerilla	Inactivo
29	<i>Rizophora sp</i>	Mangle rojo	Inactivo
30	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero	Activo
31	<i>Turnera difusa</i>	Damiana	Inactivo
32	<i>Valeriana officinalis</i>	Valeriana (hoja)	Inactivo
33	<i>Valeriana officinalis</i>	Valeriana (flor)	Activo
34	<i>Valeriana officinalis</i>	Valeriana (tallo)	Activo

El potencial de acción antibacteriana se determinó mediante la medición de los halos de inhibición que presentaron cada uno de los extractos efectivos. Donde de acuerdo a la Tabla 7 se muestra como el extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* muestra una actividad sobresaliente con respecto al resto presenta un halo de inhibición de 1.8 cm a una concentración de (7 mg/disco), mientras que *Eucalyptus radiata* presenta un halo de 1.6 cm, aunque ambas presentan una MIC de 2 mg/disco.

Entre los extractos de las distintas fracciones de *V. officinalis* se evidencia un mayor potencial inhibitorio en la flor donde encontramos halos de 1.4 cm, mientras que para el extracto de tallo es de 1.2 cm. Esto comprueba las distintas concentraciones de los bioactivos en las distintas fracciones de una misma planta. *Rosmarinus officinalis* presenta una actividad inhibitoria de 1.4 cm al igual que el extracto de flor de *Valeriana officinalis*.

Una vez seleccionados los extractos con actividad inhibitoria se determinó la MIC de cada uno de ellos, obteniendo los resultados presentados en la Tabla 7. Esto para proceder con los ensayos de toxicidad con nauplios de *Artemia salina*.

Tabla 7. Determinación de concentración mínima inhibitoria de extractos hidroalcohólicos con efecto anti-*H. pylori*. Medidas de inhibición en cm.

EXTRACTO	7mg/disco	6 mg/disco	5 mg/disco	4 mg/disco	3 mg/disco	2 mg/disco	1 mg/disco
<i>Allium sativum</i>	1.8	1.6	1.6	1.4	1.2	1.2*	0
<i>Eucalyptus radiata</i>	1.6	1.4	1.3	1.3	1.2	1.2*	0
<i>Rosmarinus officinalis</i>	1.4	1.3	1.3	1.2*	0	0	0
<i>Valeriana officinalis</i> (flor)	1.4	1.3	1.3	1.2*	0	0	0
<i>Valeriana officinalis</i> (tallo)	1.2*	0	0	0	0	0	0

Control positivo: solución de levofloxacin de 8.25 mg/disco (125 mg/mL). Halo de inhibición de 4cm.

*Halo de mínima concentración inhibitoria.

Evaluación antimicrobiana de *Allium sativum*

El ajo ha mostrado en diversas preparaciones, un amplio espectro de actividad antibacterial contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, incluyendo especies de *Escherichia*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Bacillus* y *Clostridium*. Incluso se ha probado efectivo contra bacterias ácido-resistentes como *Mycobacterium tuberculosis* y *Helicobacter pylori*. Tales efectos antimicrobianos son atribuidos a la alicina, la cual ha sido estudiada de forma independiente, comprobándose su eficacia sobre varios aislados clínicos. (Ankri y Mirelman, 1999).

Otro factor relevante es que pesar de que la alicina tiene un efecto bactericida o bacteriostático, ha sido demostrado que este compuesto ejerce una inhibición diferencial entre la microflora intestinal benéfica y enterobacterias potencialmente dañinas. Pese a que no está claro a qué se debe este efecto diferencial, se considera que puede estar relacionado con la diferencia de composición de membrana bacteriana y su permeabilidad de alicina (Harris y col., 2001).

Sin embargo, aunque las propiedades antibacterianas del ajo han sido demostradas en distintas ocasiones, es importante señalar la relevancia del tipo de extracción, ya que en comparación con el estudio de O'Mahony y col. (2005) se observa que no logaron obtener actividad antimicrobiana por parte del extracto acuoso de ajo, mientras que en el presente estudio el extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* se presenta como el extracto con mayor actividad de los 34 estudiados. Esto puede atribuirse a que el extracto no fue hervido, lo que muy probablemente puede haber eliminado los compuestos antibacterianos del extracto acuoso de *Allium sativum* utilizado por O'Mahony y col.

Evaluación antimicrobiana de *Eucalyptus radiata*

En Sonora muchas plantas medicinales son usadas como antimicrobianos en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, sin embargo el eucalipto no se encuentra dentro de esta categoría, siendo este utilizado más frecuentemente en casos de tos, gripe, asma, sinusitis, faringitis, dolor de oído, inhibición de infecciones, entre otras afecciones (Jhonson, 1996).

Al observar los resultados de Adeniyi y col. (2009) quienes evaluaron *Eucalyptus camadulensis* y *E. torrelliana* mediante la extracción con n-hexano, cloroformo y metanol, notamos claramente cómo es que las concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos con n-hexano y cloroformo son notablemente inferiores a las encontradas en este estudio,

mostrándose MIC's entre 12.5 µg/mL y 400 µg/mL, mientras que la MIC del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus radiata* es de 4 mg/disco, es decir 57 mg/mL.

Las propiedades anti-*H. pylori* de *E. radiata* puede atribuirse a la presencia de sustancias tales como triterpenoides, taninos y saponinas, las cuales son conocidas por poseer potencial antimicrobiano y ofrecer protección contra úlceras pépticas.

Evaluación antimicrobiana de *Rosmarinus officinalis*

El romero (*Rosmarinus officinalis* L.), planta rica en principios activos y con acción sobre casi todos los órganos de cuerpo humano. Al tener un alto contenido en aceites esenciales, cuyos ingredientes activos son flavonoides, ácidos fenólicos y principios amargos, genera una acción tónica y estimulante sobre el sistema nervioso, circulatorio y corazón, además de ser colerético, colagogo, antiespasmódico, diurético, emenagogo y antigodanotrópico (Ávila-Sosa y col., 2011).

Nostro y col. (2005) obteniendo extractos tanto acuosos como etanólicos encontraron que los extractos etanólicos eran más activos que los extractos acuosos, probablemente dado que el alcohol solubiliza concentraciones significativamente mayores de compuestos bioactivos en comparación con la extracción acuosa. Dentro de dicho estudio a su vez se evaluó el extracto etanólico de *R. officinalis* contra la cepa *H. pylori* ATCC 43629, donde el disco impregnado con 8 mg/disco evidenció un halo de inhibición de 2 cm, lo cual reafirma los resultados del presente trabajo donde el extracto hidroalcohólico mostró un halo de 1.4 cm a una concentración de 7 mg/disco.

Evaluación antimicrobiana de *Valeriana officinalis*

En la evaluación antibacteriana *in vitro* de las distintas fracciones de Valeriana se demuestra que cada una de ellas posee actividad contra el bacilo Gram negativo *H. pylori*, no haciendo referencia a los compuestos responsables de dicha actividad ya que existe limitada información sobre los fitoconstituyentes de esta especie, por lo queda la incógnita de saber cuáles son los componentes que le dan la actividad anti-*H. pylori*. A su vez la identificación y aislamiento de estos compuestos puede representar una opción en la aplicación única del compuesto activo con la probabilidad de que se presente una disminución significativa en los niveles de toxicidad.

Extractos hidroalcohólicos con efecto *anti-H. pylori*, como alternativa de apoyo terapéutico.

Uyub y col. (2010) evaluando 32 plantas mediante extracciones con distintos solventes como éter de petróleo, cloroformo, metanol y agua, encontraron una gran diferencia entre la actividad inhibitoria de los extractos acuosos donde solo el 10% de los mismos presentó tal actividad, contra un 95% de los extractos obtenidos mediante solventes orgánicos, quedando en claro que la extracción hidroalcohólica nos permite obtener más compuestos activos en comparación con la extracción acuosa, siendo la técnica de elección popular al preparar infusiones de múltiples plantas medicinales.

En cuanto al mecanismo de acción de tales extractos, O'Mahony y col., (2005) quienes trabajaron con extractos acuosos de varias plantas, proponen que es mediante la posible presencia de compuestos como taninos, quinonas, flavonas, fenoles, terpenoides y alcaloides, de los cuales se ha comprobado actividad bactericida. También se demostró como varias plantas contienen proteínas solubles en agua, como lectinas y carbohidratos que podrían unirse específicamente a residuos de azúcares, glicoproteínas, polisacáridos, o glicolípidos tales como las adhesinas de superficie celular de *H. pylori*. De manera que dada la situación este tipo de interacciones podrían ocurrir, resultando un bloqueo de disponibilidad de las adhesinas al receptor, previniendo la adhesión de la bacteria en las secciones estomacales.

La actividad demostrada por los extractos crudos de *Eucalyptus radiata*, *Allium sativum*, *Rosmarinus officinalis* y *Valeriana officinalis*, justifica su uso en la medicina folclórica en el tratamiento de infecciones. Esto indica que las plantas podrían ser utilizadas como tratamiento en casos de infecciones en forma sintomática o asintomática.

Con los resultados del presente estudio en conjunto con los anteriores mencionados, se demuestra cómo es que las plantas regionales representan una fuente accesible de alternativas preventivas o de apoyo en tratamientos para la erradicación de infecciones bacterianas tales como *H. pylori*.

Estos descubrimientos aumentan la esperanza de un posible desarrollo de agentes antibacteriano ya que los datos encontrados son alentadores para nuevos esquemas de terapias incluyendo la fitoterapia como alternativa para la cura de infecciones por *H. pylori*, esto a través de regímenes alimenticios basados en dietas que incluyen plantas con un alto contenido de quimioprotectores.

Evaluación de Letalidad sobre *Artemia salina* L.

En los últimos años se ha dado relevancia al efecto en la salud de los compuestos bioactivos presentes en las plantas y es posible asegurar que existe más información sobre sus propiedades funcionales, medicinales y/o toxicológicas (Ávila-Sosa y col., 2011).

En este estudio evaluamos la toxicidad de los extractos sobre nauplios de *Artemia salina* L. (Galindo y col., 1997). La Tabla 8, muestra los resultados de toxicidad de los extractos activos contra *H. pylori*.

Se puede observar que los extractos de *Allium sativum* y *Eucalyptus radiata*, no presentaron toxicidad para los nauplios a las MIC determinadas en este estudio. Sin embargo, los extractos de valeriana tanto de hoja como tallo, presentaron porcentajes altos de mortalidad a las concentraciones mínimas inhibitorias, por lo que estos extractos no son recomendables de utilizarse con la composición que se evaluó (Fernandez-Calienes y col., 2009).

Inicialmente se propuso obtener una curva de letalidad tomando cinco valores de concentración partiendo de la mínima concentración inhibitoria que presentaron en el ensayo *in vitro* contra *H. pylori*. Sin embargo en algunos casos, como con el extracto de ajo y romero, no se logró obtener una curva donde se alcanzara el 50% de mortalidad.

De manera que se tomaron concentraciones más adecuadas a ensayar, hasta obtener como mínimo un punto de concentración que presentara el 50% de mortalidad. Esto basándonos en los resultados anteriores donde se mostraban las concentraciones en que iniciaban los porcentajes de mortalidad.

El grado de toxicidad del extracto se definió en función del rango en que se encontraron los valores de CL_{50} de acuerdo a las MIC correspondientes a cada extracto.

Tabla 8. Letalidad de extractos hidroalcohólicos de plantas con actividad anti-*H. pylori*, sobre nauplios de *Artemia salina* L.

Porcentajes de mortalidad a distintas concentraciones de cada extracto.

EXTRACTO	0.5mg/mL	1mg/mL	2mg/mL	3mg/mL	4mg/mL	5mg/mL	6mg/mL	7mg/mL	8mg/mL
<i>Allium sativum</i>	--	0	0*	20	20	23.3	46.6	50	--
<i>Eucaliptus radiata</i>	--	0	0*	20	40	53.3	86.6	100	--
<i>Rosmarinus officinalis</i>	--	0	0	20	20*	23.3	30	46.6	80
<i>Valeriana officinalis</i> (flor)	100	100	100	100	100*	100	100	100	--
<i>Valeriana officinalis</i> (tallo)	--	0	0	0	0	40	70	90*	100

(*) Porcentajes de letalidad correspondientes a la mínima concentración inhibitoria encontrada en el ensayo bactericida.

(--) Concentración no evaluada.

Control positivo con 100% de letalidad: Dicromato de potasio 10mg/mL

Control negativo con 0% de letalidad: Solución salina de mar pura.

Evaluación de Letalidad de *Allium sativum* sobre *Artemia salina* L.

En el caso del ajo (*Allium sativum*) se realizó una curva a partir de su MIC (2 mg/disco), donde se presenta un 0% de mortalidad, como se presenta en la Tabla 9.

Una vez obtenidas las conversiones de los valores de porcentaje de mortalidad y concentraciones para obtener la gráfica probit (figura 6), se puede observar cómo es que no existe una correlación perfecta aunque si positiva, entre la concentración del extracto y la mortalidad de los nauplios de *A. salina*, habiendo obtenido una correlación con una $R=0.77$.

El punto de concentración de 2 mg/mL (MIC contra *H. pylori*) no pudo ser representado en la gráfica ya que no existe un valor probit asignado para un 0% de mortalidad. Sin embargo con los puntos graficables puede observarse como existe un salto significativo en la letalidad al incrementar la dosis de 5 mg/mL a 6 mg/mL, encontrándose una LC_{50} de 7 mg/mL, donde se representa la dosis de letalidad media, indicativo de la dosis requerida para matar el 50% de la población. Concordando con lo reportado por Fernández-Calienes y col. (2009) donde reportan su $LC_{50} > 1$ mg/mL, clasificándolo como no tóxico para sus fines.

Tabla 9. Letalidad en nauplios de *Artemia salina* a distintas concentraciones de extracto hidroalcohólico de *Allium sativum*.

Concentración (mg/mL)	Mortalidad (%)	Log concentración	Probit
2	0	0.3	--
3	20	0.47	4.15854
4	20	0.6	4.15854
5	23.3	0.69	4.27126
6	46.6	0.77	4.91488
7	50	0.84	5

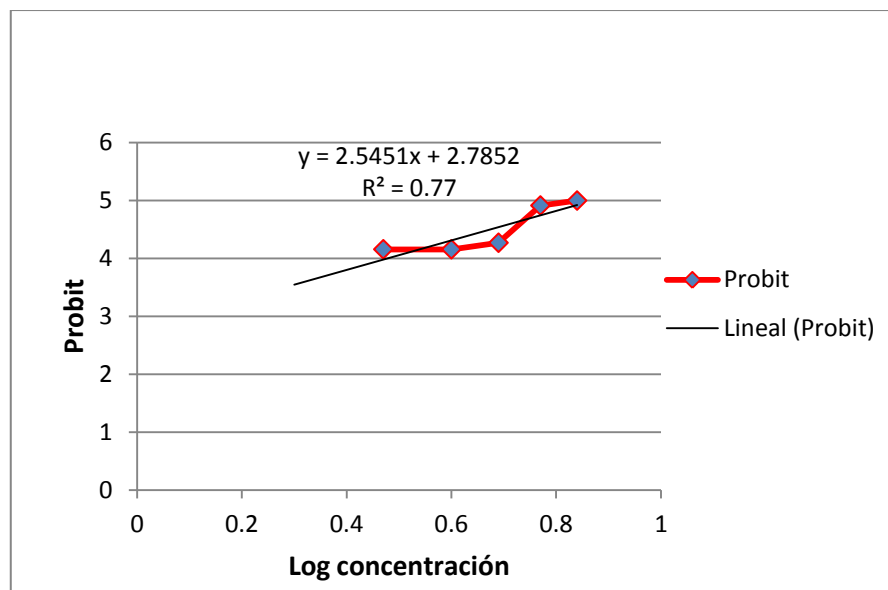


Figura 6. Gráfica de correlación entre concentración de extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* y porcentaje de letalidad de nauplios de *A. salina* representado en valores probit.

Se concluye que *Allium sativum* es un agente con alta actividad antibacteriana *in vitro* contra *H. pylori*, obteniendo una MIC considerablemente baja, en comparación con el resto de los extractos activos, además de presentar una LC_{50} aceptable. Sin embargo sigue siendo necesaria la determinación del contenido de alicina en cada dosis de 2 mg, ya que aunque la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda una ingesta diaria de 0.4 a 1.2 gramos de polvo seco de extracto de ajo, u otras formulaciones, es importante que dichas dosis contengan un máximo de 5 miligramos de alicina (Juárez, 2007).

Dentro de los efectos adversos y contraindicaciones para el uso de esta especie se ha reportado que el consumo de ajo crudo puede causar quemaduras en la boca, mal aliento, dolor abdominal o sensación de llenura, inapetencia, gases, eructos, náusea, vómito, irritación del revestimiento estomacal, acidez, diarrea o estreñimiento. Se recomienda no utilizarlo durante periodos prolongados, pues puede generar salpullido (Juárez, 2007).

Evaluación de Letalidad de *Eucalyptus radiata* sobre *Artemia salina* L.

Para el extracto hidroalcohólico de eucalipto se utilizaron concentraciones de 2 mg/mL a 7 mg/mL como se observa en la Tabla 10, la cual nos arroja únicamente cuatro valores graficables en unidades probit, los cuales se ven graficados en la Figura 7, presentando una correlación positiva entre concentración y mortalidad, con una $R = 0.9165$.

Eucalyptus radiata podría ser considerado como una alternativa de apoyo en el tratamiento contra *H. pylori*, ya que la dosis de la mínima concentración inhibitoria (*in vitro*), presenta una mortalidad de 0%, con una LC_{50} de 4.25 mg/mL. De manera que se ha considerado como un extracto de baja toxicidad

Tabla 10. Letalidad en nauplios de *Artemia salina* a distintas concentraciones de extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus radiata*.

Concentración (mg/mL)	Mortalidad (%)	Log concentración	Probit
2	0	0.3	--
3	20	0.47	4.15854
4	40	0.6	4.74707
5	53.3	0.69	5.08261
6	86.6	0.77	6.10773
7	100	0.84	--

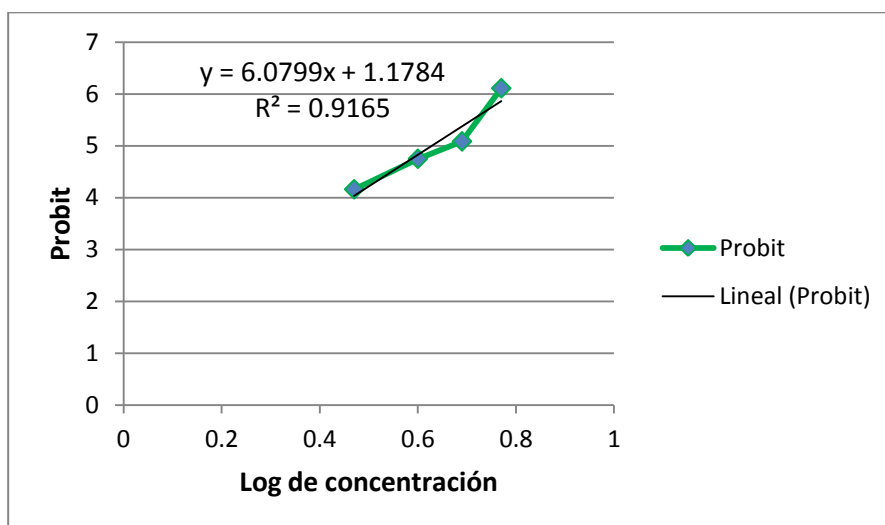


Figura 7. Gráfica de correlación entre concentración de extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus radiata* y porcentaje de letalidad

Evaluación de Letalidad de *Rosmarinus officinalis* sobre *Artemia salina* L.

Para el extracto hidroalcohólico de romero, se utilizaron concentraciones de 2 mg/mL a 8 mg/mL como se muestra en la Tabla 11. En la figura 8 se puede observar que a partir de los 4 mg/mL comienza a presentarse una manifestación de efecto tóxico en relación al aumento de concentración, habiendo obtenido una $R = 0.6806$. Los resultados reflejan un 20% de mortalidad para la MIC (4 mg/mL) *in vitro* con *H. pylori* y una LC_{50} de 6.48 mg/mL. Por lo tanto este extracto podría representar una posibilidad como alternativa, al presentar una toxicidad moderada para la dosis de concentración mínima inhibitoria.

Tabla 11. Letalidad en nauplios de *Artemia salina* a distintas concentraciones de extracto hidroalcohólico de tallo de *Rosmarinus officinalis*

Concentración (mg/mL)	Mortalidad (%)	Log concentración	Probit
2	0	0.3	--
3	20	0.47	4.15854
4	20	0.6	4.15854
5	23.3	0.69	4.27126
6	30	0.77	4.476
7	46.6	0.84	4.91488
8	80	0.9	5.84146

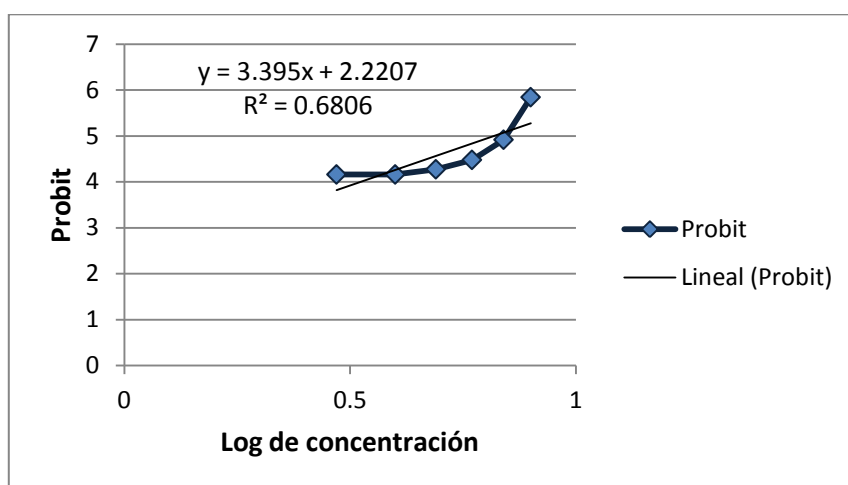


Figura 8. Gráfica probit de correlación entre concentración de extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* y porcentaje de letalidad.

Evaluación de Letalidad de *Valeriana officinalis* (tallo) sobre *Artemia salina* L.

Para el extracto hidroalcohólico de tallo de valeriana se utilizaron concentraciones de 4 a 8 mg/mL (Tabla 12). Siendo 7 mg/mL la MIC *in vitro* contra *H. pylori* de este extracto, la cual presentó un porcentaje de mortalidad de 90%, resultando con un nivel de toxicidad alto, de manera que es poco viable como alternativa de tratamiento. En este caso existe una correlación directa entre el aumento de la concentración y la mortalidad, lo cual se puede observar en la gráfica de la Figura 9 donde se obtuvo una $R = 0.999$.

Tabla 12. Letalidad en nauplios de *Artemia salina* a distintas concentraciones de extracto hidroalcohólico de tallo de *Valeriana officinalis*.

Concentración (mg/mL)	Mortalidad (%)	Log concentración	Probit
4	10	0.6	3.71827
5	40	0.69	4.74707
6	70	0.77	5.524
7	90	0.84	6.28173
8	100	0.9	--

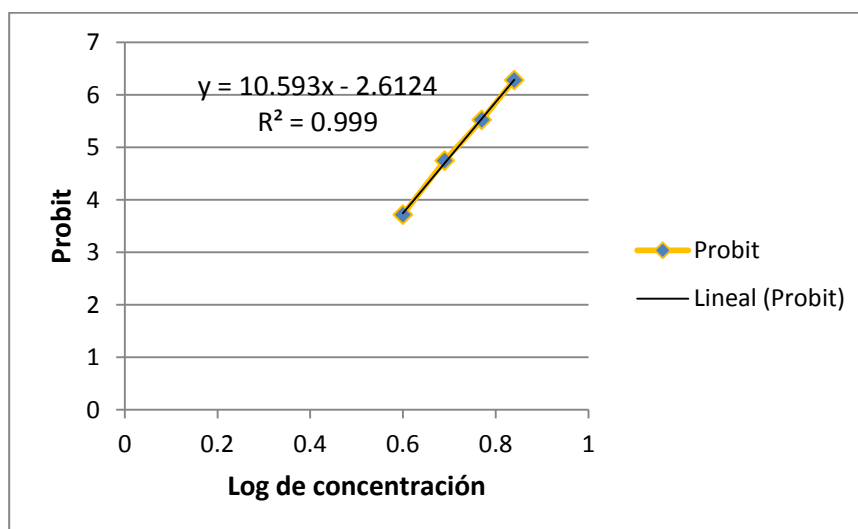


Figura 9. Gráfica de correlación entre concentración de extracto hidroalcohólico de tallo de *Valeriana officinalis* y porcentaje de letalidad de *A. salina* representado en valores probit.

Evaluación de Letalidad de *Valeriana officinalis* (flor) *Artemia salina* L.

No se pudo realizar una regresión lineal para el extracto de flor de valeriana dado que la $LC_{50} < 0.5$ mg/mL, habiendo obtenido un 100% de mortalidad a concentraciones ≥ 0.5 mg/mL, por lo que se considera como extracto de alta toxicidad, dado que la mínima concentración inhibitoria (4 mg/mL) presenta nulo porcentaje de supervivencia tal como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13. Letalidad de nauplios de *Artemia salina* a distintas concentraciones de extracto hidroalcohólico de flor de *Valeriana officinalis*.

Concentración (mg/mL)	Mortalidad (%)	Log concentración	Probit
0.5	100	-0.3	--
1	100	0	--
2	100	0.3	--
3	100	0.47	--
4	100	0.6	--

CONCLUSION

En el Estado de Sonora existen plantas con actividad antibacteriana contra *Helicobacter pylori*.

De los 34 extractos ensayados encontramos 5 presentan actividad anti- *H. pylori*. Siendo *Allium sativum*, *Eucalyptus radiata* y *Rosmarinus officinalis*, una alternativa de apoyo en el tratamiento contra la infección por *Helicobacter pylori*, dado que la toxicidad que presentan es aceptable para futuras evaluaciones *in vivo*.

RECOMENDACIONES.

De estos extractos con posibilidad de incluirse en un tratamiento para el control de *H. pylori*, vale la pena realizar un estudio de aislamiento e identificación de sus compuestos antibacterianos para una mejor clasificación de posibles componentes tóxicos, así como la aplicación de los tratamientos sobre otras especies para una determinación más acertada sobre las dosis efectivas requeridas en tratamientos *in vivo*.

Dado que una limitación de este estudio es que se realizó únicamente aplicando los extractos crudos sin aislar los compuestos bioactivos, no hay manera de saber si la actividad biológica (toxica o inhibitoria) es debida a uno o varios compuestos.

Aunque el aislamiento de compuestos puros no necesariamente conlleva al incremento o disminución de la inhibición de *H. pylori* (Uyub y col., 2010), es conveniente llevar a cabo el aislamiento de tales compuestos ya que altos niveles de toxicidad observados podrían ser resultado de la presencia de varios compuestos en el extracto crudo, ya sea que actúen de forma sinérgica o independiente. Estos aislamientos y pruebas de compuestos puros podrían producir un efecto tóxico menor en comparación con el extracto crudo.

Por otro lado correspondería indagar si estas especies vegetales pueden responder contra otras bacterias Gram negativo, ya sean cocos o bacilos. Esto para determinar su espectro antibacteriano. A su vez, se recomienda realizar un estudio de estabilidad de los extractos a un pH ácido como simulacro de su desempeño de protección gastrointestinal antes de realizar cualquier estado pre-clínico *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

- Adeniyi AC, Lawal TO, Mahady GB. 2009. *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to extracts of *Eucalyptus camadulensis* and *Eucalyptus torelliana*. *Pharmaceutical Biology* 47(1):99-102.
- Adeyini BA, Onwubuche BC, Anyiam FM, Ekundayo O, Mahady GB. 2009. Anti-*Helicobacter pylori* activities of *Eucalyptus grandis*: Effects on susceptibility, urease activity and cell surface hydrophobicity. *Pharmaceutical Biology* 47(1):13-17.
- Alarcón T, Domingo D. 2004. Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori*. *Diagnóstico de microbiología Clínica* 1:2-10.
- Aquihuatl RM, Volke ST, Prado BL, Shirai MK, Ramirez VF, Salazar GM. 2012. Manual de Prácticas de Laboratorio, Microbiología General. 1ra Ed., Iztapalapa. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Araujo DJ, Salas AR. 2008. Actividad antimicrobiana de las plantas. Fondo Editorial de la Universidad Científica del Sur 5(6):6-17.
- Atapour M, Zahedi MJ, Mehrabani M, Safavi M, Keyvanfard V, Foroughi A, Siavoshi F, Foroumadi A. 2009. *In vitro* susceptibility of the Gram negative bacterium *Helicobacter pylori* to extracts of Iranian medicinal plants. *Pharmaceutical Biology* 47(1):77-80.
- Ávila-Sosa R, Navarro-Cruz AR, Vera-López O, Dávila-Márquez RM, Melgoza-Palma N, Meza-Pluma R. 2011. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. *Ciencia y Mar* 15(43):23-36.
- Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. 1995. Infection with *Helicobacter pylori* Strains Processing cagA is associated with an Increased Risk of Developing Adenocarcinoma of the Stomach. *Cancer Research* 55:2111-2115.
- Borroto J, Trujillo R, De la Torre YC, Waksman N, Hernández M, Salazar R. 2011. Actividad antimicrobiana y toxicidad frente a *Artemia salina* del extracto diclorometano de raíces de *Morinda royoc* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 16:34-42.
- Bucciarelli A, Skliar M. 2007. Medicinal plants from Argentina with gastroprotective activity. *Ars Pharmaceutica* 48:361-269.
- Chao HK, Fu CK, Huang MH, Chung JL. 2012. The Optimal First-Line Therapy of *Helicobacter pylori* Infection in Year 2012. *Gastroenterology Research and Practice* 2012:8.

Chey WD, Wong BCY. 2007. American Collage of Gastroenterology Guideline of the Management of *Helicobacter pylori* Infection, American Journal of Gastroenterology 102:1080-1825.

Claros PM, Bilbao RP, Damiani ME, Gonzales DE, Estensoro CM, Alvarez AM. 2007. Actividad anti- *Helicobacter pylori* de *Plantago major*, *Clinopodium bolivianum*, *Calendula officinalis* y *Piper angustifolium* por el método de difusión en disco. BIOFARBO 15:3-41.

Fernández-Calienes VA, Mendiola MJ, Monzote FL, García PM, Sariego RI, Acuña RD, Scull LR, Gutiérrez GY. 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.

Forya B. 2013.

<http://www.thetimescameroon.com/2013/09/study-reveals-baka-pygmyes-have-low.html>

Furuta T, Shirai N, Takashima M, Sugimura H., Ohashi K, Ishizaki T, Kaneko E. 2000. Effect of genotypic differences in CYP2C19 on cure rates for *Helicobacter pylori* infection by triple therapy with proton pump inhibitor, amoxicillin, and clarithromycin. Clinical Pharmacology and Therapeutics 69:158-168.

Ghannadi A, Sajjadi S, Abedi D, Yousefi J, Daraei-Ardekani R. 2004. The *in vitro* activity of seven iranian plants of the *Lamiaceae* family against *Helicobacter pylori*. Nigerian Journal of Products and Medicine 8:40-42.

Harris JC, Cottrell SL, Plummer S, Lloyd D. 2001. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). Applied Microbiology and Biotechnology 55:282-286.

Hernández-Hernández C, Lozano-Ponce E, López-Vidal Y, Aguilar-Gutierrez G. 2009. Relevance of *Helicobacter pylori* virulence factors for vaccine development. Salud Pública de México 51:447-454.

Jackson S, Beck PL, Pineo GF, Poon M. 2005. *Helicobacter pylori* eradication: Novel Therapy for immune Thrombocytopenic Purpura? A review of the Literature. American Journal of Hematology 78:142-150.

Jiang X, Doyle M. 2000. Growth supplements for *Helicobacter pylori*. Journal of Clinical Microbiology 38:1984-1987.

Funatogawa K, Hayashi S, Shimomura H, Yoshida T, Hatano T, Ito H, Hirai Y. 2004. Antibacterial activity of Hydrolyzable Tannins Derived from Medicinal Plants against *Helicobacter pylori*, Microbiology and Immunology Journal 48(4):251-256.

Inaba T, Mizuno M, Take S, Suwaki K, Honda T, Kawai K, Fujita M, Tamura T, Yokota K, Oguma K, Okada H, Shiratori Y. 2005. Eradication of *Helicobacter pylori* increases platelet count in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura in Japan. *European Journal of Clinical Investigation* 35:214-219.

Krapp K, Longe JL. 2003. *Enciclopedia de las Medicinas Alternativas*. 1ra Ed. México: Océano. 1568p.

Lagunes-Yanelli B, Calva-Rodríguez R, Ramírez-Tellez E. 2001. Prevalencia de *Helicobacter pylori* en niños sanos de edad escolar. *Revista Mexicana de Patología Clínica* 48:23-26.

Majalca-Martínez C, Rivera-Cabrera J, Ochoa-Perez SA, Giono-Cerezo S. 2001. Transporte, aislamiento, identificación y conservación de cepas de *Helicobacter pylori*. *Bioquímica* 26:85-89.

Mayaud L, Carricajo A, Zhiri A, Aubert G. 2008. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitive to antibiotics. *Journal compilation; Letters in Applied Microbiology* 47:167-173.

Mégraud F., 1997. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 11:43-53.

Nostro A, Cellini L, Di Bartolomeo S, Di Capli E, Grande R, Cannatelli MA, Marzio L, Alonzo V. 2005. Antibacterial Effect of Plant Extracts against *Helicobacter pylori*. *Phytotherapy Research* 19:198-202.

Nutpho P, Ukarapol N. 2006. *Helicobacter pylori* and Immuno-compromised children. *Emerging Infectious Diseases - CDC* 12:171-172.

O'Mahony R, Al-Khtheeri H, Weerasekera D, Fernando N, Vaira D, Holton J, Basset C. 2005. Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicine. *World Journal of Gastroenterology* 11:7499-7507.

Ortega JP, Espino A, Calvo A, Verdugo P, Pruyas M, Nilsen E, Villarroel L, Padilla O, Riquelme A, Rollán A. 2010. Infección por *Helicobacter pylori* en pacientes sintomáticos con patología gastroduodenal benigna. Análisis de 5.664 pacientes. *Revista Médica de Chile* 138:529-535.

Parsonnet J. 1998. *Helicobacter pylori*: The size of the problem. *Revista Científica Gut* 43(1):6-9.

Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelmann JH, Orentreich N, Sibley RK. 1991. *Helicobacter pylori* Infection and the risk of gastric carcinoma. *The new England Journal of Medicine* 325:1127-1131.

- Raymond J, Thiberge JM, Chevalier C, Kalach N, Bergeret M, Labigne A, Dauga C. 2004. Genetic and Transmission analysis of *Helicobacter pylori* Strains within a Family. Emerging Infectious Diseases - CDC 10:1816-1821.
- Rivas-Traverso F, Hernández F. 2000. *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. Revista Biomédica 11:187-205.
- Ruíz-Alvarez V, Rodríguez-Enriquez Y, Hernández-Triana M. 2006. Infección por *Helicobacter pylori* y diabetes en adultos cubanos. Revista Cubana de Investigación Biomedica 25(1):1-7.
- Stasi R, Sarpatawari A, Segal JB, Osborne J, Evangelista ML, Cooper N, Provan D, Newland A, Amadori S, Bussel JB. 2009. "Effects of eradication of *Helicobacter pylori* infection in patients with immune thrombocytopenic purpura: a systematic review. Blood, Journal of the American Society of Hematology 113:1231-1240.
- Repetto MG, Llesuy SF. 2002. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research 35:523-534.
- Tan PV, Boda M, Etoa F. 2010. *In vitro* and *in vivo* anti-*Helicobacter* / *Campylobacter* activity of the aqueous extracts of *Enanthia chlorantha*. Pharmaceutical Biology 48(3): 349-356.
- Triana H, 2001. *Helicobacter pylori*. La bacteria que más infecta al ser humano. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición 15: 42-54.
- Uyub AM, Nwachukwu I, Azlan AA, Fariza SS. 2010. In vitro antibacterial activity and cytotoxicity of selected medicinal plant extracts from Penang Island Malaysia on metronidazole-resistant-*Helicobacter pylori* and some pathogenic bacteria. Ethnobotany Research & Applications 8:95-106.
- Vallejos M, Cerda A, Valenzuela V, Toledo A. 2003. Resistencia antimicrobiana en *Helicobacter pylori*: aspectos clínicos y moleculares. Revista Médica de Chile 131: 1313-1320
- Weeks DL, Eskarandi S, Scott DR, Sachs G. 2000. H⁺ - Gated Urea Channel: The Link Between *Helicobacter pylori* urease and Gastric Colonization. Science, 284: 482-485.
- Wenming W, Yunsheng Y, Gang S. 2012. Recent insights into Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori* eradication. Gastroenterology Research and Practice 2012:1-8.