



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto antibiótico de los extractos de  
*Parthenium hysterophorus* sobre  
*Helicobacter pylori*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

**JAZMÍN PATRICIA ESPINOSA RIVERO**



Directora de Tesis: Dra. Alicia Enriqueta  
Brechú Franco

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno  
Espinosa  
Rivero  
Jazmín Patricia  
53 96 61 83  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
303211095

2. Datos del tutor  
Dra  
Alicia Enriqueta  
Brechú  
Franco

3. Datos del sinodal 1  
Dra  
Irma  
Romero  
Álvarez

4. Datos del sinodal 2  
Dr  
Guillermo  
Laguna  
Hernández

5. Datos del sinodal 3  
M en C  
Sol  
Cristians  
Niizawa

6. Datos del sinodal 4  
Biol  
Israel  
Castillo  
Juárez

7. Datos del trabajo escrito  
Efecto antibiótico de los extractos de *Parthenium hysterophorus*  
sobre *Helicobacter pylori*  
88 p  
2010

El presente trabajo se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. Alicia Enriqueta Brechú Franco.

Las pruebas *in vitro*: ensayo en cultivo líquido y método de dilución en agar, para determinar la actividad de los extractos de *Parthenium hysterophorus* sobre *Helicobacter pylori* se realizaron en el laboratorio 2 del Departamento de Bioquímica en la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Irma Romero Álvarez. Esta tesis fue parcialmente apoyada por DGAPA-UNAM (IN – 218108).

*Este trabajo está dedicado a mis padres: Enrique y Paty, que siempre han confiado en mí y han dedicado 23 años de su vida a apoyarme al 100%. Les agradezco por enseñarme a ver siempre hacia adelante, todo el amor que me han dado, pero sobre todo por enseñarme a ser responsable.*

*Agradezco profundamente a mi hermana Azu por existir y hacer mi vida tan divertida con todos los juegos, conversaciones y momentos vividos. Je t'aime beaucoup petite rat.*

*Gracias Miguel, que te has integrado a mi vida y has estado ahí para apoyarme y hacerme sonreír.*

*Gracias a ustedes he llegado a esta meta.*

*“El conocimiento otorga la libertad”*

*Sri Swami Sivananda*

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Ciencias y todos los profesores que me han dado las bases y la confianza para desarrollarme como profesional.

Al Laboratorio de Estructura y Fisiología de Plantas.

A la Dra. Alicia Enriqueta Brechú Franco, quien ha sido la directora de esta tesis y a quien agradezco su tiempo, paciencia y sobre todo amistad. Gracias por todos los consejos, opiniones y aportaciones a éste trabajo.

Al Dr. Guillermo Laguna Hernández por revisar la tesis, por su asesoría y sus observaciones a lo largo de mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Helia Reyna Osuna Fernández, por sus observaciones constantes a éste proyecto cuando cursé el taller.

A la Dra. Irma Romero Álvarez por haberme brindado su apoyo para llevar a cabo las pruebas *in vitro* en el laboratorio 2 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM. Le agradezco también su asesoría y haber hecho agradable mi estancia ahí.

Al Biólogo Israel Castillo Juárez por su disposición a trabajar en el proyecto y sus comentarios para mejorar la tesis.

Al M. en C. Sol Cristians Niizawa por haber aceptado revisar éste trabajo y sus observaciones para mejorarlo.

A la Bióloga Luz Gisela Martínez García por sus invaluable consejos y su asesoría durante las pruebas *in vitro*, por sus amenas e interesante pláticas y su extraordinaria compañía.

A la Unidad de Análisis Ambiental y al M. en C. Manuel Hernández Quiroz por permitirme utilizar el evaporador rotatorio y dirigirme durante su uso.

Al Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez por facilitarme el uso del liofilizador.

A mis profesoras de la prepa 4: Biól. Irene Quiroz Amenta y Biól. María de los Ángeles Álvarez Espindola por darme la inspiración.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Estructura y Fisiología de Plantas y del Taller “Propagación y validación histológica y farmacológica de plantas medicinales potencialmente útiles en la elaboración de fitomedicamentos”: Alma, Edith, Gris, Jorge, Marisol, Nadia, Ximena y a todos los que por una u otra razón olvidé escribir. Gracias chicos por todas nuestras aventuras.

A toda la gente del laboratorio 2 de la Facultad de Medicina: Cerón, Guillermo, Mijail, Francisco, a Wendy, gracias por tu paciencia para ayudarme con los experimentos. Agradezco también a la Sra. Georgina Flores por su grandísima ayuda en el laboratorio y su grata compañía.

A mis grandes amigas de la Fac: Angie, Betzabe, Marion, Sandra y Trixa, gracias por su amistad y las cosas que cada una me han enseñado.

A todos mis compañeros y amigos de la Facultad de Ciencias. No los escribo porque no quiero olvidar a nadie, pero ustedes saben quiénes son.

A mis super amigas de toda la vida, Nelli y Vero, que hacen tan grata mi vida, estoy orgullosa de ustedes y me da gusto que las tres sigamos desarrollándonos en lo profesional.

A todos y cada uno de los miembros de mi familia, algunos cerca y otros pocos más lejos, que siempre han estado al pendiente de mí y aligeran con una sonrisa, una llamada o comentario todos los problemas que surgen.

A dos angelitos: Jorgito y mi abuelito, gracias por todo lo que compartimos.

ÍNDICE	Página
<b>1. Resumen</b>	1
<b>1.1 Abstract</b>	2
<b>2. Introducción</b>	3
<b>2.1 Gastritis</b>	4
<b>2.1.2 Gastritis y <i>Helicobacter pylori</i></b>	7
<b>2.1.3 Ubicación taxonómica</b>	9
<b>2.2 Tratamiento de la gastritis</b>	13
<b>2.2.1 Tratamientos de primera y segunda línea</b>	16
<b>2.3 Fitomedicamentos contra la gastritis</b>	17
<b>2.4 Plantas utilizadas en el tratamiento contra <i>Helicobacter pylori</i></b>	18
<b>2.5 <i>Parthenium hysterophorus</i></b>	20
<b>2.5.1 Ubicación taxonómica</b>	20
<b>2.5.2 Nombres comunes</b>	22
<b>2.5.3 Información etnobotánica</b>	22
<b>2.5.4 Información fitoquímica y farmacológica</b>	23
<b>2.5.4.1 Evaluación de los extractos de <i>P. hysterophorus</i></b>	25
<b>3. Objetivos</b>	27
<b>4. Justificación</b>	27
<b>5. Hipótesis</b>	27
<b>6. Métodos</b>	28
<b>6.1 Distribución geográfica</b>	28
<b>6.2 Recolección</b>	28
<b>6.3 Extracciones</b>	28
<b>6.4 Ensayo en cultivo líquido</b>	31
<b>6.5 Método de dilución en agar</b>	32
<b>6.6 Análisis estadísticos</b>	36
<b>6.6.1 Controles negativos</b>	36
<b>6.6.2 Grupos experimentales</b>	36

	Página
<b>7. Resultados y discusión</b>	37
<b>7.1 Distribución geográfica</b>	37
<b>7.2 Recolección</b>	39
<b>7.3 Extracciones</b>	39
<b>7.3.1 Extractos de raíz</b>	41
<b>7.3.2 Extractos de parte aérea</b>	42
<b>7.4 Evaluación del potencial anti-<i>Helicobacter pylori</i></b>	43
<b>7.4.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria mediante ensayo en cultivo líquido</b>	43
<b>7.4.1.2 Análisis de varianza de un factor</b>	45
<b>7.4.1.3 Extractos de raíz</b>	46
<b>7.4.1.4 Extractos de parte aérea</b>	51
<b>7.4.1.5 Controles positivos</b>	55
<b>7.4.1.6 Comparación de grupos experimentales</b>	58
<b>7.4.1.6.1 Análisis de varianza de dos factores</b>	63
<b>7.4.1.6.2 Prueba t de student</b>	65
<b>7.4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria mediante método de dilución en agar</b>	68
<b>7.4.2.1 Extracto acuoso de raíz</b>	68
<b>7.4.2.2 Extracto acuoso de parte aérea</b>	71
<b>8. Conclusiones</b>	75
<b>9. Literatura citada</b>	76
<b>10. Anexo</b>	83

## 1. Resumen

*Helicobacter pylori* es un bacilo Gram negativo que provoca gastritis antral crónica activa (López, 1992), está relacionado con las úlceras pépticas y el desarrollo de cáncer gástrico, segundo lugar de mortalidad por cánceres (Parkin *et al.*, 1999). El tratamiento de la gastritis causada por *H. pylori* consiste en una terapia triple, combinando dos antibióticos, compuestos de bismuto o un inhibidor de la bomba de protones (PPI), para disminuir la secreción de ácido gástrico, durante dos semanas para eliminar a la bacteria, reduciendo así los síntomas y previniendo la recurrencia en un 90% de los pacientes. (Aguilar *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2003). Si la triple terapia falla, se utiliza la terapia cuádruple, utilizando tanto compuestos de bismuto, un PPI y dos antibióticos diferentes a los ya usados (Miquel y Argila, 2000). El uso de estos medicamentos provoca diferentes efectos secundarios, es por ello importante encontrar tratamientos alternativos que produzcan pocos efectos secundarios. La propuesta aquí estudiada son los extractos de *Parthenium hysterophorus*, planta usada en la medicina tradicional en el tratamiento de la gastritis.

Se elaboró un mapa de distribución geográfica en México de *P. hysterophorus*, basado en registros de herbarios nacionales y la base de datos de la Red Mundial de Información sobre Biodiversidad-Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (REMIB-CONABIO). Con base en dicho mapa se eligió Cazon de Herrera, Veracruz, como sitio de colecta del material vegetal, el cual una vez colectado se dejó secar durante 15 días. Posteriormente se cortaron las raíces y se dividieron de la parte aérea. Las raíces se pesaron en grupos de tres para conocer la dosis utilizada según la información etnobotánica obtenida. Los polvos secos de raíz y de parte aérea se sometieron a un proceso de extracción sucesiva en Soxhlet con solventes de diferentes polaridades: hexano, diclorometano, metanol. Además se realizó una infusión en agua con polvo seco no utilizado previamente, tanto de raíz como de parte aérea.

Los extractos obtenidos se probaron mediante dos pruebas: ensayo en cultivo líquido y método de dilución en agar, éste solo para los extractos acuosos. Los extractos hexánico, diclorometánico y metanólico de raíz fueron efectivos al inhibir el crecimiento de la población de *H. pylori*. El extracto acuoso de raíz no tuvo una buena actividad anti-*H. pylori*, inhibiendo como máximo, 25.78% del crecimiento poblacional. Los cuatro extractos de parte aérea fueron efectivos e inhibieron el crecimiento de la bacteria, sin embargo sólo los extractos hexánico, diclorometánico y metanol, lo hicieron en el ensayo de cultivo líquido a bajas concentraciones. (31.25 y 15.625 µg/ml). El extracto acuoso sólo presentó actividad inhibitoria en el método de dilución en agar a concentraciones altas (1000 y 500 µg/ml).

La parte aérea de *P. hysterophorus* tiene mayor actividad *in vitro* anti-*H. pylori* que la raíz, por lo que es importante continuar su estudio.

## 1.1 Abstract

*Helicobacter pylori* is a Gram negative bacillus which causes chronic antral active gastritis (López, 1992), it is linked to peptic ulcers and gastric cancer development, which ranks second in mortality from cancer (Parkin *et al.*, 1999). The treatment consists of a triple therapy, mixing two antibiotics, bismuth compounds or a proton-pump inhibitor (PPI), that reduces gastric acid secretion, it is used for two weeks in order to kill the bacteria, reducing symptoms and preventing the bacteria restocking in 90% of patients (Aguilar *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2003). If triple therapy fails, it is used quadruple therapy, using bismuth compounds, a PPI and two antibiotics different from ones used before (Miquel y Argila, 2000). However, it is such an aggressive treatment because it produces side effects. Because of this, it is very important to search for new alternatives. An alternative proposal will study the effects of extracts of *Parthenium hysterophorus*, plant known in traditional medicine as a gastritis treatment.

It was made a Mexico distribution map of *P. hysterophorus*, based on national herbarium registers and REMIB-CONABIO data base. With this, we could choose Cazones de Herrera, Veracruz, to have a collection. The plant material collected was dried for 15 days. After that, it was divided into root and aerial part. The roots were weight in groups of three in order to know the dose which is utilized according to the ethnobotanical information. The dried powder was subjected to a successive extraction process in Soxhlet with several organic solvents: hexanus, dichloromethane and methanol. It was made, too, an infusion in water with no utilized dried powder.

The obtained extracts were tried through two tests: Liquid culture test and Agar dissolution method. Last one, only for aqueous extracts. Hexanus, dichloromethane and methanol root extracts were effective on inhibiting *H. pylori* population growth. The aqueous root extract did not have good activity anti-*H. pylori*, inhibiting at the most the 25.78% bacteria population.

The four aerial part extracts was effective inhibiting the bacteria growth, but only hexanus, dichloromethane and methanol did it in the Liquid culture test on low concentrations (31.25 and 15.625 µg/ml). Whereas, the aqueous extract presented inhibit activity in the Agar dissolution method on high concentrations (1000 and 500 µg/ml).

The *P. hysterophorus* aerial part has higher activity anti-*H. pylori* than root. Because of that it is important to continue this study.

## 2. Introducción.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en 1976, definió a la medicina tradicional como la suma total de conocimientos, habilidades y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias oriundos de las diferentes culturas, sean o no explicables, y usados en el mantenimiento de la salud, así como en la prevención, diagnóstico o tratamiento de las enfermedades físicas o mentales (World Health Organization, 1978).

Esta misma organización, en 1977, dio a conocer el “Programa de Promoción y Desarrollo de la Medicina Tradicional”, donde invitó a todos los países subdesarrollados a valorar y retomar los conocimientos de la medicina tradicional de sus culturas. Asimismo, determinó que el 80% de la población mundial depende de las plantas para la prevención y la atención a su salud (World Health Organization, 1978).

La información sobre las propiedades curativas de las plantas se ha acumulado por sacerdotes, hechiceros, curanderos y las amas de casa, quienes lo han transmitido de generación en generación (Domínguez, 1973).

Desde tiempos prehispánicos, en las culturas mesoamericanas, las plantas han sido uno de los recursos más importantes de la medicina tradicional. Por ejemplo, en el mercado de Tlatelolco de la gran ciudad de Tenochtitlán, existía un pasillo especializado, donde se comercializaban las plantas medicinales (Viesca, 1999)

En México, el primer escrito que describe la riqueza de conocimiento acerca de los recursos herbolarios es el *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*, o Códice de la Cruz-Badiano, realizado en 1552 por el médico indígena Martín de la Cruz y traducido al latín por Juan Badiano (Sánchez *et al.*, 2007).

En muchas sociedades se ve a la medicina tradicional como una alternativa para conservar la salud, sin embargo, en nuestro país, para muchos grupos sociales, indígenas principalmente, es la única medicina accesible, como consecuencia del aislamiento que padecen.

México, al ser un país megadiverso, es poseedor de una gran riqueza de especies; de las 22000 especies de plantas vasculares, el 50% son endémicas. Aproximadamente 3000 especies son utilizadas en la medicina tradicional mexicana, y un tercio de éstas se emplean en el tratamiento de enfermedades asociadas al sistema gastrointestinal (Argueta *et. al.*, 1994).

Una de las enfermedades gastrointestinales más comunes en la actualidad a nivel mundial es la gastritis, es por ello que se convierte en tema de interés para la investigación médica, así como para la búsqueda de tratamientos alternativos, como lo son los fitomedicamentos.

## 2.1 Gastritis

La palabra “gastritis” fue introducida por George Stahl, médico y químico alemán, hace más de 250 años, refiriéndose al proceso de “inflamación del estómago”

La gastritis se define como cualquier tipo de inflamación de la mucosa gástrica, tanto aguda como crónica (Piqué, 1992), sin embargo, con la generación de nuevos conocimientos han surgido múltiples clasificaciones basadas en criterios clínicos o histológicos o patogénicos o endoscópicos según la afinidad del autor por uno u otro campo (López, 1992).

En agosto de 1990, un grupo de gastroenterólogos de todo el mundo presentó en el Congreso Mundial de Gastroenterología, una nueva clasificación de las gastritis, denominada: sistema Sidney. Este sistema mantiene los conceptos universalmente aceptados, así como incluye a los avances científicos respecto a la enfermedad. Se divide en dos vertientes: histológica y endoscópica (Cuadro 1).

La vertiente histológica se denomina según tres componentes:

1. Las características cronológico-topográficas, donde la gastritis puede ser aguda si hay una inflamación de aparición brusca de la mucosa gástrica, o crónica, además se determina su localización en el estómago: antro, cuerpo o total (Fig. 1).
2. Los factores etiopatogénicos asociados.
3. Los caracteres histomorfológicos, que comprenden lesiones cuantificables o no cuantificables y dentro las últimas, ser específicas o no específicas.

La vertiente endoscópica se denomina basándose en:

1. Topografía: denomina a la gastritis en antral, corporal o pangástrica.
2. Tipo de alteración: se describe la alteración y el grado de daño que presenta.

En el sistema Sidney se establecen cinco variables histológicas cuantificadas en cuatro grados de intensidad, que son:

- a) Inflamación. Grado de infiltración celular a nivel de lámina propia, encargada de secretar mucosa.
- b) Atrofia. Mayor y menor pérdida de glándulas gástricas.
- c) Actividad. Infiltrado de neutrófilos a nivel de lámina propia y/o intraepitelial.

d) Metaplasia intestinal. Mayor o menor sustitución de epitelio gástrico por células de tipo intestinal.

e) *Helicobacter pylori*. Presencia de éste organismo en las biopsias (López, 1992).

Vertiente histológica				
Cronología	Topografía	Lesiones morfológicas cuantificables (I, II, III y IV)*	Lesiones morfológicas no cuantificables	Factores etiológicos y/o patogénicos asociados
G. aguda G. crónica Formas especiales	Pangastritis	Inflamación Actividad Atrofia Metaplasia intestinal <i>Helicobacter pylori</i>	Específicas Granulomas <i>Gastrospirilum</i> Citomegalovirus Etc.	<i>H. pylori</i> Autoinmunidad Reflujo biliar Fármacos Tóxicos Idiopática
	Antro Cuerpo		No específicas Contenido mucoso Degeneración epitelial Hiperplasia foveolar Edema Fibrosis Etc.	

Vertiente endoscópica		
Topografía	Términos descriptivos **	Tipos endoscópicos de gastritis
Pangastritis Gastritis de antro Gastritis de cuerpo	Edema Eritema Friabilidad Exudados Erosión plana Erosión elevada Nodularidad Pliegues engrosados Atrofia de pliegues Patrón vascular visible Manchas de sangre	Erimatosa-exudativa Erosiva plana Erosiva elevada Atrófica Hemorrágica Por reflujo biliar Hipertrófica

\*Grados: I: sin lesiones; II: leve; III: moderado; IV: severo. \*\*Grados: I: no existentes; II: leve; III: moderado; IV: severo.

Cuadro 1. Clasificación de las gastritis. Sistema Sidney. Tomado de López, 1992.



Fig. 1. Anatomía del estómago humano. Imagen de medicina<sup>9</sup>

<sup>1</sup> [http://2.bp.blogspot.com/\\_bcGtqhfMWIE/SktvIP00neI/s400/estomago5.jpg](http://2.bp.blogspot.com/_bcGtqhfMWIE/SktvIP00neI/s400/estomago5.jpg)

Este padecimiento causa molestias epigástricas, es decir, en la región superior del estómago, se puede tener una sensación de plenitud postprandial (después de ingerir alimentos), náuseas con o sin vómitos, meteorismo, pirosis (acidez); síntomas que disminuyen la calidad de vida de quien padece esta enfermedad. Frecuentemente se pueden presentar también mareos, sudoración y taquicardia (López, 1992).

### **2.1.2 Gastritis y *Helicobacter pylori*.**

En 1983 en Perth, Australia, Robin Warren y Barry Marshall describieron un bacilo microaerófilo, Gram negativo, de forma helicoidal, en la mucosa gástrica. Lo llamaron *Campylobacter pylori* por su parecido con otras especies de *Campylobacter*, hasta 1988 lo nombraron *Helicobacter pylori*. (Piqué, 1992; Prescott, 2004) y en 2005 ganaron el premio Nobel de Fisiología o Medicina por el descubrimiento de *H. pylori* y su papel en la gastritis y la úlcera péptica.

Es por ello que se considera a *H. pylori* como un factor etiopatogénico de la gastritis. De acuerdo al sistema Sidney, la gastritis causada por ésta bacteria es denominada: gastritis crónica activa asociada a *H. pylori* (López, 1992)

Hay más de 20 especies del género *Helicobacter*, las cuales son divididas en dos: gástricas y enterohepáticas. Estas especies solo infectan a los mamíferos y parecen ser altamente específicas en relación a la especie y órgano que infectan (Cuadro 2) (Kusters *et al.*, 2006).

<b>Especies del género <i>Helicobacter</i></b>	<b>Huésped mamífero primario</b>	<b>Patología</b>	<b>Modelo animal estudiado.</b>
<b>Gástricas</b>			
<i>H. pylori</i>	Humano, primates	Úlcera péptica, gastritis, adenocarcinoma gástrico, linfoma.	Ratón, gerbo mongoliano, cuyo, lechón gnotobiótico
<i>H. felis</i>	Gato, perro, ratón	Gastritis en huéspedes naturales; puede causar úlceras pépticas o adenocarcinoma gástrico en ratón.	Ratón
<i>H. mustelae</i>	Hurón.	Gastritis, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico, linfoma.	Ninguno
<i>H. acinonychis</i>	Guepardo, tigre, otros grandes felinos	Gastritis, úlcera péptica	Ratón.
<i>H. heilmannii</i>	Humano, perro, gato, mono, guepardo, rata	Gastritis, síntomas dispépticos, linfoma.	Ratón
<b>Enterohepáticas</b>			
<i>H. hepaticus</i>	Ratón, otros roedores	Tiflocolitis proliferativa, hepatitis, Carcinoma hepatocelular.	Ninguno.

Cuadro 2. Algunas especies del género *Helicobacter*, hospederos y enfermedades causadas (Modificado de Kusters *et al.*, 2006).

### 2.1.3 Ubicación taxonómica (Prescott *et al.*, 2004):

Dominio: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Epsilonproteobacteria.

Familia: Helicobacteraceae

Género: *Helicobacter*

Especie: *Helicobacter pylori*

*H. pylori* es un bacilo Gram negativo de 0.5-1.0 x 2.5-5.0  $\mu\text{m}$ , de forma helicoidal, curvada o recta con extremos redondeados; flagelos polares múltiples con vainas (Fig. 2).

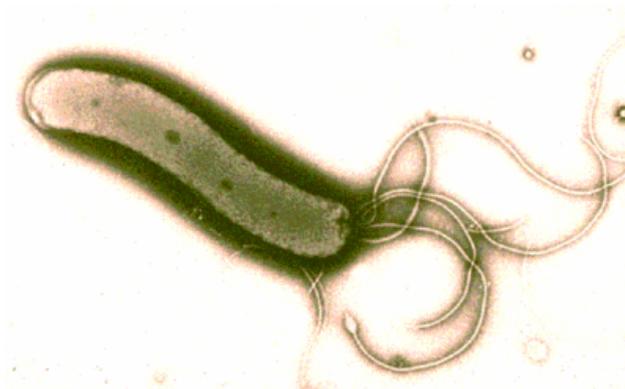


Fig.2. *Helicobacter pylori* (Imagen de D.J.Kelly, 2006)

Esta bacteria ha coevolucionado con los humanos y se transmite de persona a persona, por contacto directo con heces o mediante alimentos contaminados, también se cree que es una enfermedad zoonótica, ya que la han encontrado en animales domésticos (Aguilar *et al.*, 2001; Blaser y Artheron, 2004).

En países en vías de desarrollo, del 70 al 90% de la población está infectada con este organismo, en los países desarrollados es del 25 al 50%; aunque esta cifra es mucho mayor a la de los pacientes con gastritis crónica activa asociada a *H. pylori*, hecho que se puede explicar con el equilibrio que existe entre *H. pylori* y su hospedero, que, cuando se rompe, da lugar a las enfermedades causadas por la bacteria (Blaser y Artheron, 2004).

Del 70 al 90% de los pacientes con gastritis crónica antral no erosiva tienen *H. pylori* en la mucosa gástrica (Prescott *et al.*, 2004).

*H. pylori* también provoca úlceras pépticas, adenocarcinomas gástricos y linfoma asociado a la mucosa de tejido linfoide (MALT) (Rieder *et al.*, 2005).

*H. pylori* es responsable del 85% de las úlceras gástricas y 95% de las duodenales, en 1994 se clasificó como carcinogénico de cáncer gástrico, el cual ocupa el segundo lugar de mortalidad por cánceres (IARC, 1994; Parkin *et al.*, 1999)

*H. pylori* se sitúa por debajo de la capa de moco gástrico, el 98% reside en alguna de las múltiples capas mucilaginosas, mientras que el 2% ataca al epitelio gástrico (Yoshiyama y Nakazawa, 2000).

Las fimbrias son unas de las adhesinas relacionadas con este proceso. *H. pylori* se une a los antígenos de Lewis (que forman parte de los antígenos que determinan el grupo sanguíneo O) y al monosacárido ácido siálico, que también se encuentra en las glicoproteínas de la superficie de las células epiteliales gástricas (Fig. 3).

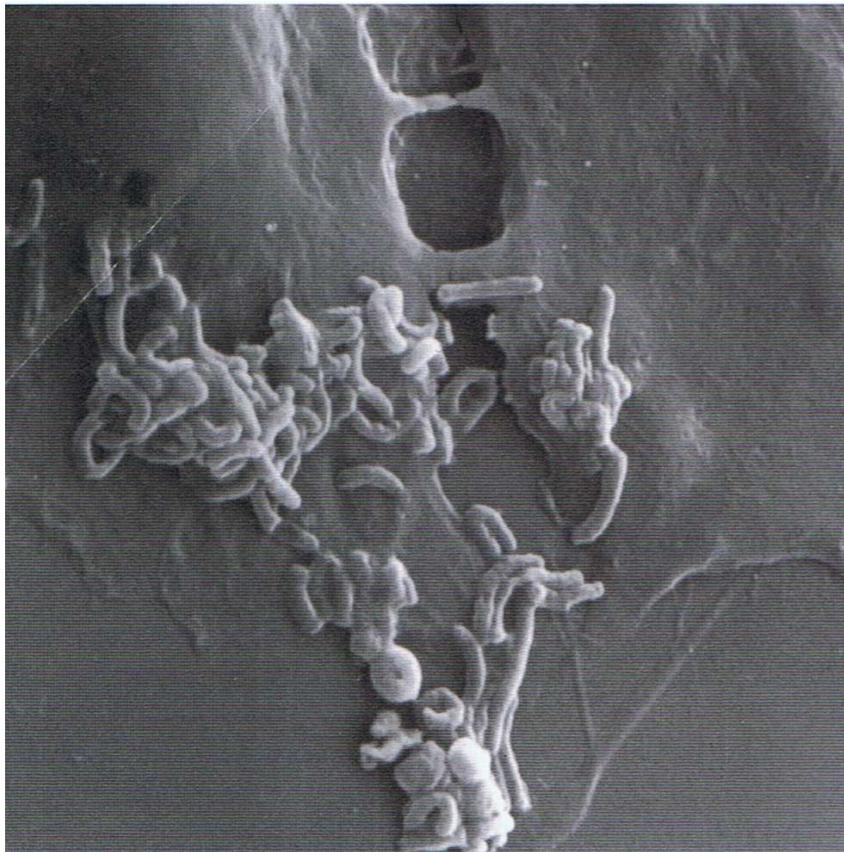


Fig.3. *Helicobacter pylori* adherida a las células gástricas. Fotografía con microscopio electrónico de barrido (X3441). Modificado de Prescott *et al.*, 2004.

La bacteria puede adherirse también al duodeno, al esófago proximal y al distal, al recto y al divertículo de Meckel (Aguilar *et al.*, 2001).

*H. pylori* es una bacteria microaerófila, es decir, requiere niveles de oxígeno (O<sub>2</sub>) por debajo de 2-10% para crecer y es dañada por el O<sub>2</sub> atmosférico (20%), para contrarrestar esto *H. pylori* tiene las enzimas catalasa y oxidasa que destruyen los radicales peróxido de hidrogeno y óxido.

Los principales factores que proporcionan virulencia son:

- Enzima Ureasa, ésta enzima crea un ambiente alcalino por hidrólisis de urea para producir amoníaco, que protege a la bacteria del ácido gástrico, aunado a que esta enzima provoca apoptosis en células gástricas *in vitro* (Aguilar *et al.*, 2001; Prescott *et al.*, 2004).
- Citotoxina vacuolizante VacA, es una proteína que forma poros en las células epiteliales del estómago, permitiendo la salida de aniones y urea, ésta última utilizada por la misma bacteria para la protección contra el ácido estomacal; además induce la disminución de las uniones estrechas entre las células epiteliales, provocando la salida de nutrientes; también causa vacuolización, endosomas y lisosomas, que terminan por matar a la célula (Blaser y Artheron, 2004; Rieder *et al.*, 2005).
- Productos de genes de la isla de patogenicidad cagPAI, la cual tiene 31 genes que activan las proteínas cinasas activadoras de mitosis MAPK, que regulan la proliferación celular, diferenciación, respuestas inflamatorias y la apoptosis. No se conocen proteínas homólogas a esta en otras especies de *Helicobacter*, lo cual indica una alta especificidad de infección a los humanos (Aguilar *et al.*, 2001).

También posee antígenos Lewis X y Y como componentes del antígeno O del lipopolisacárido en su membrana externa, con los que imita a las células del hospedero y engaña al sistema inmune para evitar su eliminación. (Yoshiyama y Nakazawa, 2000)

Sin embargo, no todas las cepas de *H. pylori* son patógenas, se ha observado que algunas evitan la aparición de enfermedades gástricas superiores, como reflujo, cáncer de esófago y síndrome de Barret; pero el uso desmedido de antibióticos ha provocado la selección de cepas patógenas. (Blaser y Artheron, 2004)

*H. pylori* se puede cultivar en medios selectivos como Skirrow, Butzler o Campy-BAP, se debe incubar a 37°C. Es resistente a la cefsulodina y los medios de cultivo podrían tener agentes reductores, como el caldo tioglicolato, para mantener la microaerofilia.

Los principales medios de cultivo utilizados se componen de lo siguiente:

Skirrow: Agar sangre base o agar Brucella. 5-7% sangre de caballo lisada, 10 mg vancomicina, 2.50 UI polimixina B, 5 mg trimetropina.

Butzler: Agar tioglicolato, 15% sangre de oveja desfibrinada. 25.0 UI baritricina, 10.0 UI polimixina B, 5 mg novobiocina, 50 mg actidiona.

Campy-BAP: Agar sangre base o agar Brucella, 5-7% sangre de caballo lisada, 10 mg vancomicina, 2.50 UI polimixina B, 5 mg trimetropina, 2 mg anfotericina B, 15 mg cefalotina

La identificación se realiza mediante pruebas invasivas y no invasivas (Miquel y Argila, 2000)

Invasivas.

Para llevar a cabo estos métodos de diagnóstico es necesario realizar una endoscopia.

- Histología
- Cultivo de las muestras de biopsia gástrica (Blecker *et al.*, 1993; Granberg *et al.*, 1993).
- Prueba rápida de la ureasa.
- Tinción de Gram
- PCR
- Giemsa, plata o naranja de acridina
- Tinción de eosina-hematoxilina.
- Prueba de la enzima ureasa, que hidroliza urea para producir iones amonio, aumentando el pH de la solución y provoca un cambio en el color del indicador (Cervantes, 2006).

No invasivas.

- Prueba de aliento con urea marcada con C14 (Morris, 1986).
- Detección de Inmunoglobulina G e Inmunoglobulina A en suero (Granberg *et al.*, 1993).
- Pyloriset EIA-G (Granberg *et al.*, 1993).
- Malakit *Helicobacter pylori* en sangre, que es un Ensayo de Inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Blecker *et al.*, 1993).

## **2.2 Tratamiento de la gastritis.**

Existen diversos tratamientos para ésta enfermedad, los cuales involucran tres tipos de medicamentos (Miquel y Argila, 2000):

- Inhibidores de la bomba de protones (PPI): omeprazol, lansoprazol y pantoprazol.
- Compuestos de bismuto: subsalicilato de bismuto y ranitidina-citrato de bismuto.
- Antibióticos. : penicilinas, tetraciclinas, macrólidos y nitroimidazoles.

El lansoprazol suprime la secreción de ácido en las células parietales gástricas; y presenta actividad *in vitro* contra *H. pylori* (Vademécum de Genéricos Intercambiables Thomson, 2008; Vademécum, Instituto Químico Biológico, 2010)

Las sales de bismuto tienen como propósito eliminar la acidez, la indigestión y las náuseas, sin embargo está contraindicado si se tiene alergia a los salicilatos, también si se es diabético, lo cual es muy común si tomamos en cuenta que habrá más de 285 millones de diabéticos a nivel mundial en el año 2010 (World Diabetes Foundation, 2009); lo que disminuye la posibilidad de utilizarlo para muchas personas. Actúan despegando al organismo de la mucosa gástrica y causando su lisis. (Campo *et al.*, 2007)

La ranitidina inhibe competitivamente la unión de la histamina a los receptores de las células de la pared gástrica (H<sub>2</sub>), reduce la secreción de ácido; es cicatrizante de la mucosa gastrointestinal (Vademécum, Instituto Químico Biológico, 2010)

Antibióticos (cuadro 3):

-Penicilinas.

La amoxicilina es la penicilina más utilizada, tiene una tasa de erradicación del 20%, pero si se utiliza en combinación con un PPI aumenta hasta un 50-60%. La amoxicilina actúa en contra de bacterias Gram positivas y negativas, inhibe la síntesis del mucopéptido de la pared celular bacteriana (Gerrits *et al.*, 2006; Campo *et al.*, 2007; Vademécum de Genéricos Intercambiables Thomson, 2008).

-Tetraciclinas.

Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas, tienen un efecto bacteriostático en Gram positivas y negativas; accedan por difusión pasiva a través de los poros de la membrana celular; se ligan a la subunidad 30S de los ribosomas e inhiben la recepción del aminoacil RNAt al sitio aceptor del complejo RNAm-ribosoma, impidiendo así, la síntesis de aminoácidos (Rodríguez *et al.* 1998; Gerrits *et al.*, 2006). Tienen como desventaja que es necesario emplear altas dosis y numerosas tabletas, incomodando al paciente (Campo *et al.*, 2007).

-Macrólidos.

La claritromicina es el macrólido más poderoso contra *H. pylori*. Interfiere con la síntesis de proteínas, ya que se une a la subunidad 50S del ribosoma e impide que el péptido en crecimiento se desplace del sitio aceptor al donador. (Gundián *et al.*, 1998; Campo *et al.*, 2007; Vademécum de Genéricos Intercambiables Thomson, 2008). Se usa en terapias triples y cuádruples durante 7-14 días.

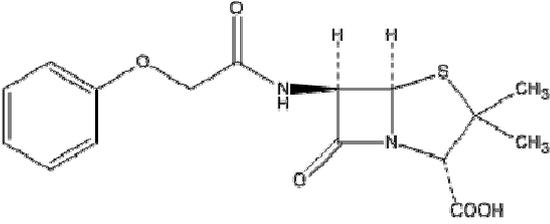
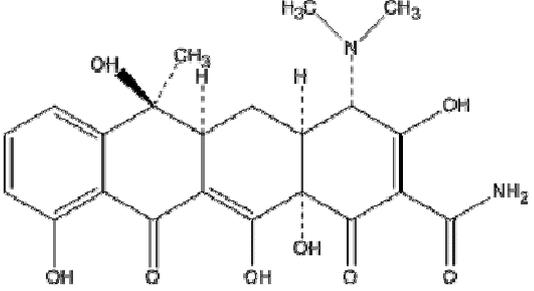
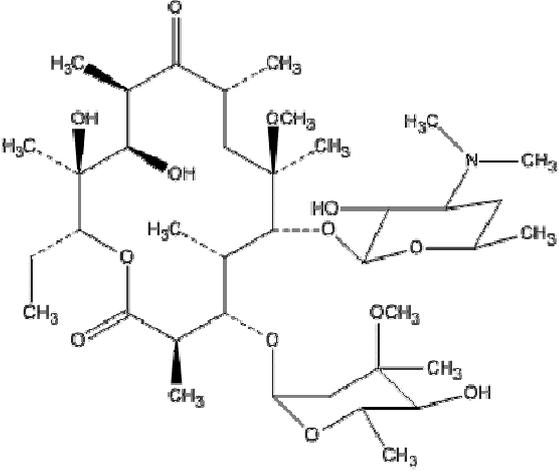
Azitromicina. Se utiliza en combinación con la amoxicilina y un PPI en terapia triple. En terapia cuádruple se usa con un PPI, un compuesto de bismuto y amoxicilina.

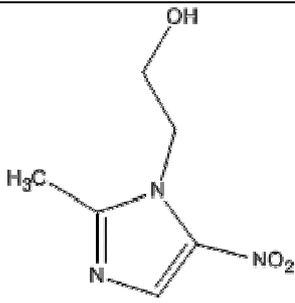
Eritromicina. Presenta una concentración mínima inhibitoria (CMI) muy baja, aunque es inestable en valores de pH bajos; la cantidad de tabletas es alta (8), motivo de desagrado entre los pacientes.

-Nitroimidazoles.

Se utilizan para infecciones con organismos anaerobios. Alteran el potencial redox. Los más utilizados son el metronidazol y el tinidazol en terapia triple o cuádruple.

El metronidazol se activa cuando es reducido el grupo nitro, dentro del organismo susceptible; se forman radicales nitro-aniones e intermediarios imidazol que causa daño letal formando aductos con las proteínas y los ácidos nucleicos (Bendesky y Menéndez, 2001; Gerrits *et al.*, 2006).

Antibióticos	Estructura
Penicilinas	 <p style="text-align: center;">Penicilina V</p>
Tetraciclinas	 <p style="text-align: center;">Fórmula general</p>
Macrólidos	

	Claritromicina
Nitroimidazoles	 <p>Metronidazol</p>

Cuadro 3. Antibióticos utilizados en tratamientos contra *H. pylori*.

En algunas ocasiones *H. pylori* se muestra susceptible a algún antibiótico en ensayos *in vitro* y resistente *in vivo*, posiblemente porque el antibiótico se enfrenta a dificultades para llegar al sitio de la infección en la concentración adecuada y presentar un efecto antibacteriano (Campo *et al.*, 2007; Pajares *et al.*, 2007).

### 2.2.1 Tratamientos de primera y segunda línea.

Anteriormente se utilizaban los tratamientos duales, combinando un PPI con amoxicilina o claritromicina, sin embargo, en la actualidad ya no se consideran efectivos

Se emplean como tratamientos de primera línea los tratamientos triples, éstos se componen de un compuesto de bismuto, tetraciclina o amoxicilina y metronidazol tomadas dos o tres veces al día. Esta combinación es efectiva en más del 90% de los pacientes, sin embargo es incómodo por la cantidad de tabletas y por los múltiples efectos secundarios.

Se recomienda que en los tratamientos de primera línea no se combine claritromicina y metronidazol, ya que éstos son los antibióticos clave para la erradicación de *H. pylori* y se deben utilizar por separado en tratamiento de primera y segunda línea con el fin de no generar doble resistencia (López, 1992).

Algunos ejemplos de terapias triples son:

- Subsalicilato de bismuto (Pepto-Bismol®) combinado con metronidazol y tetraciclina o amoxicilina.
- Claritromicina, amoxicilina y lansoprazol.

En caso de que el tratamiento de primera línea falle, se utiliza el tratamiento de segunda línea, empleando terapia cuádruple.

La combinación se forma de un PPI, un compuesto de bismuto, tetraciclina y metronidazol durante siete días (Boer y Tytgat, 2000; Campo *et al.*, 2007).

No obstante, los tratamientos tienen como consecuencia diversos efectos secundarios, como pueden ser: náuseas, vómito, diarrea, sequedad de boca, gusto metálico, sobreinfección por *Candida* sp. cefalea, mareos, sensación de quemazón uretral o vaginal.

Cuando el tratamiento es prolongado se pueden observar reacciones graves como: convulsiones, adormecimiento, incoordinación motora y en algunos casos pancreatitis. Las reacciones graves se observan en enfermos que reciben altas dosis o tratamientos prolongados. Se recomienda no usarlo en el primer trimestre de embarazo y debe valorarse su uso en etapas más avanzadas, dado que atraviesa la barrera placentaria y penetra en la circulación fetal. También se desaconseja en la lactancia. (Falagas y Gorbach, 1995)

### **2.3 Fitomedicamentos contra la gastritis.**

Como se ha comentado anteriormente, las plantas han desempeñado un papel muy importante en la conservación de la salud a lo largo de la historia, es por eso que se aprovechan sus compuestos activos, alguna parte de su estructura o preparaciones obtenidas de ellas para elaborar medicamentos, llamados fitomedicamentos.

El grupo del Dr. Jorge Álvarez de la Universidad de Guadalajara en colaboración con la Clínica Integral de Medicina Tradicional del Ministerio de Salud Pública de Cuba han desarrollado un fitomedicamento para combatir la gastritis elaborado con *Cymbopogon citratus*, conocida como hierba de limón, en México, o caña santa, en Cuba (Fig. 4).

El fitomedicamento se llama Erilim Extracto® (Fig. 5). Posee efecto desinflamatorio, analgésico, bactericida y fungicida, y por su acción diurética es hipotensor, broncodilatador y expectorante. No es nocivo pero se indica que se debe suspender la toma de cualquier otro antiácido.

Se toma una gota diluida en medio vaso de agua, 10 minutos antes de cada alimento durante 14 días, pero no deben tomarse más de 3 gotas al día. Cada unidad de 3 ml contiene principalmente terpenos como: mircenos, geraniol, citral a y b.

No debe administrarse a hipotensos, mujeres embarazadas o lactando ni menores de edad (Erilim México, 2010)



Fig. 4. *Cymbopogon citratus*



Fig. 5. Erilim Extracto.

Existe en el mercado otro fitomedicamento para el tratamiento de la gastritis y úlceras gástricas, llamado Ulsin® (Figura 6). Esta elaborado con diversas plantas: cancerina (*Hemiangium excelsum*), cuachalalate (*Amphypterygium adstringens*), palo de Brasil (*Haematoxylum brasiletto*), toronjil (*Melissa officinalis*) y zarzaparrilla (*Smilax spinosa*).

Se administra por vía oral, se diluyen 15 gotas en medio vaso con agua, antes de cada comida. No se recomienda durante el embarazo o la lactancia.



Fig. 6. Ulsin® (Naturamar, 2010)

#### **2.4 Plantas utilizadas en el tratamiento contra *Helicobacter pylori*.**

Hasta 2007, se enlistaron 327 plantas a nivel mundial, con potencial anti-*H. pylori*, pero a la mayoría solo se le ha demostrado efectos *in vitro*. Castillo y Romero clasificaron sus posibles efectos en:

1.- *Preventivo*. Previenen la colonización en el epitelio gástrico como ejemplos, brócoli, ajo, chile, algunos cítricos.

2.- *Atenuante*. Disminuye o retrasa el crecimiento de la bacteria. Ej., arroz, hojas de *Arctostaphylos uva-ursi* y *Vaccinium vitis-idaea*.

3.- *Protector*. Disminuyen inflamación y daño a la mucosa. Ej., *Camellia sinensis*, *Prunus mume*, *Panax ginseng*, *Croton sublyratus* y *Evodia rutaecarpa*.

4.- *Eliminador*. Se han encontrado diversos agentes derivados de plantas con esta actividad *in vitro*, más no *in vivo*. (Castillo y Romero, 2007)

Se realizó un estudio del efecto de los extractos de la corteza de *Amphipterygium adstringens*, llamado comúnmente cuachalalate; donde se aislaron los ácidos anacárdicos los cuales presentaron actividad anti-*H. pylori*; fueron comparados con amoxicilina y metronidazol, dando como resultado que aunque no son tan efectivos como los antibióticos, si hay efectos bacteriostáticos; se cree que actúan en la membrana plasmática y se observó que las bacterias se hacen más pequeñas tras aplicar el tratamiento (Castillo *et al.*, 2007)

Existe otro estudio, donde se analizó la actividad de los extractos metanólico y acuoso de 53 plantas usadas en la medicina tradicional mexicana para problemas gastrointestinales, determinando su CMI mediante dilución en agar y dilución en cultivo líquido. Las actividades resultantes se clasificaron de la siguiente forma: Extractos acuosos.- valores de CMI en  $\mu\text{g/ml}$  > 1000, nula; 1000, baja; 500, moderada; 250, buena; y < 250 a < 125, alta. Extractos metanólicos.- valores de CMI en  $\mu\text{g/ml}$  > 500, nula; 500-250, baja; 125-62.5, moderada; <62.5 a 31.25, buena; y 15.6 a < 7.8, alta.

El 77% de éstas plantas fueron activas en al menos uno de los ensayos, presentado una actividad de moderada a alta contra *H. pylori* (Castillo *et al.*, 2009).

### **2.5 *Parthenium hysterophorus*.**

Es una planta herbácea, erecta y ramosa de 50-80 cm y hasta 1.5 m de altura (Fig. 7), tiene hojas alternas, pecioladas, bipinnadas hasta de 20-30 cm de largo. El tallo es ramificado y estriado. Las flores se encuentran en cabezuelas en inflorescencias cimosas y pequeñas de color blanco que sobresalen del follaje. Tienen el involucre anchamente campanulado, de 2 a 3 mm de largo, receptáculo hemisférico, paleas de hasta 1.5 mm de largo, ensanchadas y pubescentes en el ápice, flores del radio con láminas de menos de 1 mm de largo, truncadas a emarginadas en el ápice; flores del disco aproximadamente 60, corolas de casi 1.5 mm de largo, angostamente infundibuliforme, sin pelos (Fig. 8).

Frutos y semillas: aquenios de las flores liguladas oblanceolados a obovados, de casi 2 mm de largo, negruzco, con o sin pelos, vilano de 2 escamas petaloides de 5 a 7 mm de largo.

Características especiales:  $2n = 34$ .

Florece de junio a noviembre (Malezas de México, 2010).

### 2.5.1 Ubicación taxonómica (APG II, 2003):

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae



Fig.7. *Parthenium hysterophorus*. (Pedro Tenorio Lezama, 2006)<sup>2</sup>

---

<sup>2</sup> <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/parthenium-hysterophorus/imagenes/habito.jpg>



Fig. 8. Inflorescencia de *Parthenium hysterophorus*. (Pedro Tenorio Lezama, 2006)<sup>3</sup>

Se distribuye en los estados de Aguascalientes, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luís Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala, Yucatán y Zacatecas (Villaseñor y Espinosa, 1998).

### **2.5.2 Nombres Comunes.**

Esta planta tiene más de 20 nombres comunes, que dependen de la región en la que se encuentra. Entre ellos están:

Altamisa cimarrona, altamisa del campo, altimisilla, amargosa, arrocillo, artemis-uits, chaile, chachayatl, chochoyate, chuchuiate, cicutilla, cola de ardilla, confitillo, escobilla, estafiate, falsa altamisa, hierba de la oveja, hierba del burro, hierba del gusano, hormiguillo, huachochole, jihuite amargo, manzanilla del campo, romerillo, zacate amargo (Martínez, 1969; Villarreal, 1983; Ejemplares del herbario etnobotánico del IMSS, 2009).

En maya se le conoce como hauay y en lengua huasteca es llamado tzaile y tzail-cuet (Martínez, 1969).

### **2.5.3 Información etnobotánica.**

El contacto con la planta causa dermatitis y alergia rinitis en animales (Towers *et al.*, 1977 en Das, 2007)

Usando toda la planta. Se utiliza como analgésico en reumatismo articular subagudo y reuma muscular, cefaleas, gastralgias (Martínez, 1969).

---

<sup>3</sup> <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/parthenium-incanum/imagenes/inflorescencia-acercamiento.jpg>

Se dice que las raíces en decocción se utilizan en el tratamiento de la malaria (Caraballo *et al.*, 2004).

Junto con la manzanilla se usa para “barrer”, es decir, realizar “limpias”; su olor ahuyenta las pulgas; es utilizada contra el herpes, granos en la cabeza y contra la rabia (Ejemplares del herbario etnobotánico del IMSS).

Con la infusión, se lavan los piquetes de mosquito y se secan. El té se toma como agua de tiempo para la infección en el estomago (Comunicación personal de la Sra. Mireya Zamora en el estudio etnobotánico de Leonardo Zamora en Tantalamos, Veracruz).

Se utiliza para la gastritis, tomándose la infusión de la raíz de tres “matas” en un litro de agua dos veces al día (Comunicación personal del Sr. Abdón Espíndola Mérida).

#### **2.5.4 Información fitoquímica y farmacológica.**

La familia Asteraceae es conocida popularmente debido a que presenta el mayor número de especies de angiospermas con propiedades medicinales. Es por esto que se han estudiado los diversos componentes responsables de las actividades biológicas o farmacológicas.

El género *Parthenium* es rico en flavonoides, del tipo flavonoles.

Las especies *P. hysterophorus*, *P. bippinatifidum* y *P. glomeratum* comparten flavonoles glicosidos, (Shen *et al.*, 1976) como el camferol (Fig. 9) y la quercetina (Fig. 10), a los cuales se le han atribuido propiedades antioxidantes, antibacteriales, antivirales y antiinflamatorias, además de disminuir la actividad de los trombocitos (Osman *et al.*, 1998; Ravanel *et al.*, 1982; Tapas *et al.*, 2008).

*P. hysterophorus* tiene terpenos del tipo sesquiterpenos, como: coronopilina (Fig. 11), 2- $\beta$  hidroxicoronopilina, quercetagenina-3, 7 dimetileter, 3- $\beta$  acetoxineoambrosina; dentro del grupo de los sesquiterpenos se encuentran los pseudoguainólidos como la partenina, hidropartenina, 4- $\beta$ -acetoxi-11- $\beta$ -13-dihidropartenina, histerina A-D, tetraeurina A (Rüesch y Mabry, 1969; Das *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2008; Shah y Ahmad, 2009) y, charminerona, éste último el primer seco-pseudoguainólido reportado para la planta (Venkataiah *et al.*, 2003).

La partenina (Fig. 12) es el mayor constituyente de los metabolitos secundarios de la planta (Das *et al.*, 2007). Tiene propiedades alelopáticas (Batish *et al.*, 2002). Es sintetizada en los tricomas durante todo el ciclo de vida de la planta, en especial durante los estados generativos, ya que es citotóxica para muchas especies de plantas y animales, este hecho ayuda a la planta a propagarse sin perturbaciones (Kupchan *et al.*, 1971 en Das *et al.*, 2007; Reinhard *et al.*, 2006 en Belz, 2008). Esto se demuestra con otros estudios al respecto:

-El riego de plántulas de *Sinapis arvensis* (brassicaceae), con partenina, causa necrosis en la superficie de las hojas (Belz, 2008).

-La partenina extraída de *P. hysterophorus* es tóxica en cultivos de *Entamoeba histolytica* y el resultado es tan bueno como el tratamiento con metronidazol (Sharma y Bhutani, 1988 en Shah y Ahmad, 2009).

También se han aislado de *P. hysterophorus* fitosteroles: campesterol (Fig. 13),  $\beta$ -sitosterol (Fig. 14) y estigmasterol; con la propiedad de reducir el nivel de colesterol y prevenir su aumento en hígado y plasma en humanos (Farquhar *et al.*, 1956; Batta *et al.*, 2006; Shah y Ahmad, 2009).

El syringaresinol (Fig. 15) es un lignano presente en esta especie, su uso está reportado en el tratamiento de heridas, irritaciones, fiebre, anemia, malaria, problemas del corazón (Das *et al.*, 1999).

También contiene ácido ursólico (Fig. 16), que induce apoptosis en células cancerosas (Shan *et al.*, 2009) y ácido clorogénico (Fig. 17), con propiedades antioxidantes (Lan, 2007).

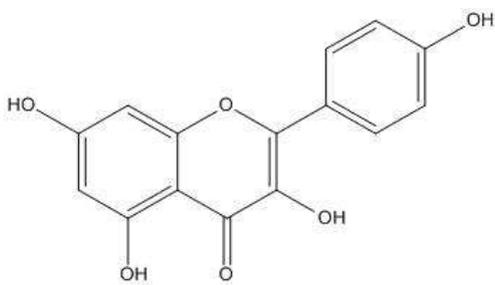


Fig 9. Camferol.

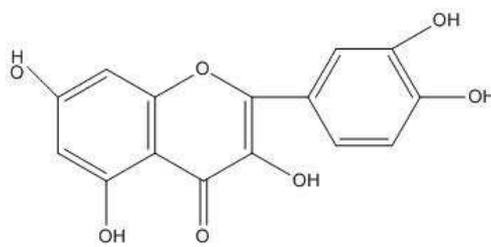


Fig. 10. Quercetina

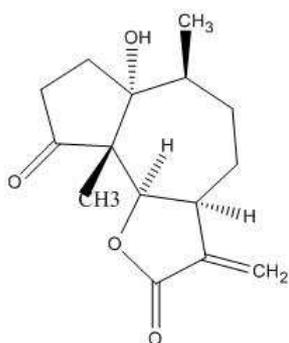


Fig. 11. Coronopilina

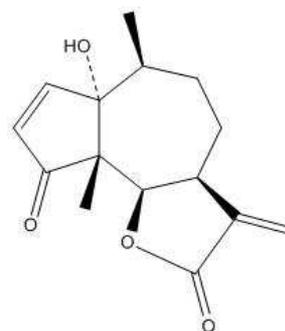


Fig. 12. Partenina.

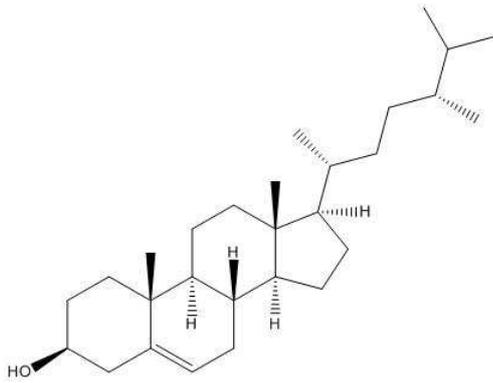


Fig. 13. Campesterol.

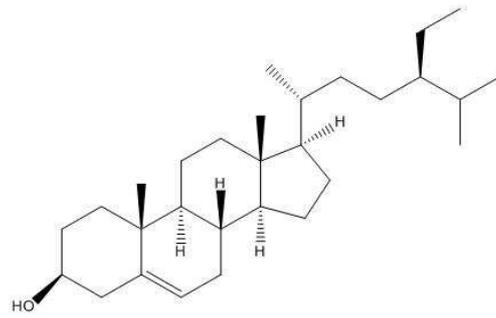


Fig. 14.  $\beta$ -sitosterol.

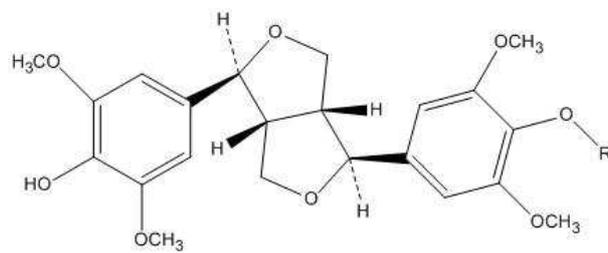


Fig. 15. Syringaresinol.

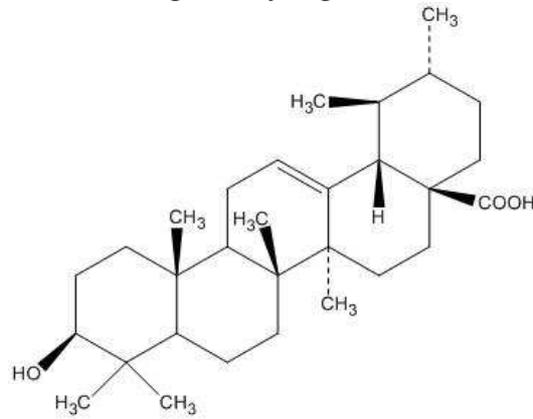


Fig. 16. Ácido ursólico.

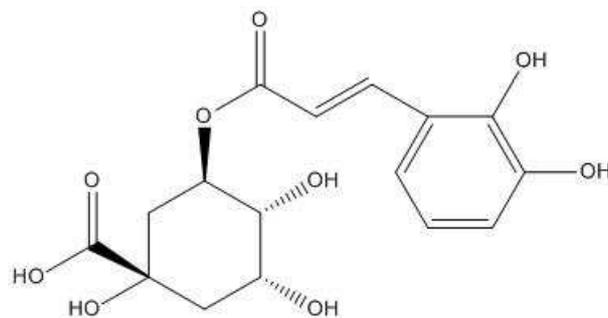


Fig. 17. Ácido clorogénico.

#### 2.5.4.1 Evaluación de los extractos de *P. hysterothorus*.

En cuanto a los efectos de los extractos de *P. hysterothorus*, se han realizado diversos estudios, enfocados en la valoración del conocimiento tradicional.

El extracto etanólico de la planta fue evaluado *in vitro* e *in vivo* contra *Trypanosoma evansi*, resultando en la eliminación del parásito en dosis de 100 y 300 mg/kg de peso, aunque resultó tóxico en una dosis de 1000 mg/kg de peso (Talakal, 1995 en Shah y Ahmad, 2009).

El extracto etanólico de *P. hysterothorus* tiene efecto inhibitorio sobre *Plasmodium falciparum*, el organismo responsable de la malaria, con una mínima concentración inhibitoria (CMI) de 12.5 µg/ml (Rodríguez *et al.*, 2006).

El extracto etanólico de toda la planta fue probada en semillas de las malezas: *Bidens pilosa* (Asteraceae) y *Avena fatua* (Poaceae). Daña la membrana celular e inactiva a la enzima deshidrogenasa en raíces, además de causar la pérdida de la clorofila en las hojas, lo que detiene su germinación y crecimiento (Pandey, 1996 en Batish *et al.*, 2002).

El extracto metanólico de las flores presentó una importante actividad antitumoral (Mukherjee and Chatterjee, 1993 en Das *et al.*, 2007).

Se utilizaron los extractos metanólicos para realizar una prueba de dosis letal 50 en ratas, mediante administración oral e intravenosa, dando como resultado que la dosis letal es de 42 mg/kg. (Narasinham *et al.*, 1984)

Se probó el extracto acuoso de las partes aéreas de *P. hysterothorus* en tres especies de hongos, *Drechlera tetrámera*, *Aspergillus niger* y *Phoma glomerata*, patógenos para muchas plantas utilizadas en la agricultura. Bajas concentraciones (10, 20 y 30% extracto) mostraron actividad antifúngica, mientras que altas concentraciones no mostraron actividad alguna (Bajwa *et al.*, 2003).

El extracto acuoso de *P. hysterothorus* inhibió la germinación de *Raphanus sativus*, *Brassica campestris* y *B. oleracea* (Brassicaceae) cuando se aplicó a baja concentración. Tuvo efecto inhibitorio en la elongación de la raíz en *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Artemisia dubia* y en *Ageratina aderophora* (Maharjan *et al.*, 2007).

El extracto acuoso de las flores tiene efecto hipoglucemiante en ratas diabéticas (Patel *et al.*, 2008).

El extracto acuoso a base de *P. hysterothorus* posee efecto insecticida y antialimentario sobre las larvas de *Spodoptera frugiperda* (Villate *et al.*, 2006)

Con el extracto acuoso se realizaron un champú y una loción y se aplicaron a perros infectados con escabiasis, observándose una mejoría (Águila *et al.*, 2000).

Se realizó un estudio donde se dañó con etanol el estomago de ratones, el cual es un modelo representativo de la enfermedad de la úlcera gástrica en humanos (Silen, 1988 en Bucciarelli y Skliar, 2007), encontrándose que el extracto acuoso tiene efecto gastroprotector (Bucciarelli y Skliar, 2007).

### **3. Objetivos.**

#### ✓ **Objetivo general:**

- Evaluar el efecto de los extractos de *Parthenium hysterophorus* sobre *Helicobacter pylori*.

#### ✓ **Objetivos particulares:**

- ❖ Conocer la distribución geográfica en México de *Parthenium hysterophorus* y recolectar especímenes para su depósito en un herbario.
- ❖ Obtener extractos de *Parthenium hysterophorus* con diferentes polaridades y evaluar el efecto antibacteriano sobre *Helicobacter pylori*.
- ❖ Comparar el extracto de *Parthenium hysterophorus* con mayor actividad con antibióticos de referencia.

### **4. Justificación.**

La medicina tradicional es una parte fundamental de las culturas del mundo, sin embargo usualmente es devaluada y mal comparada con la medicina científica, es por esto que es necesario validar los conocimientos que aporta.

La gastritis se ha convertido en una de las enfermedades más importantes y los tratamientos alopáticos, aunque son efectivos, generan efectos secundarios a corto y largo plazo que provocan que el paciente los abandone y no recupere su salud, además de provocar resistencias de las bacterias a los antibióticos usados. Por ello es importante encontrar tratamientos alternativos efectivos para el control de la enfermedad y que produzcan mínimos o nulos efectos secundarios.

### **5. Hipótesis.**

Si la infusión de la raíz de *Parthenium hysterophorus* tiene efectos antibacterianos, entonces el extracto acuoso de dichas raíces provocará la disminución de la población de *Helicobacter pylori* en igual o mayor proporción que el antibiótico o el tratamiento habitual.

## **6. Métodos.**

### **6.1 Distribución geográfica.**

Para crear un mapa de la distribución geográfica de *Parthenium hysterophorus*, así como conocer su uso etnobotánico, se revisó:

- ♣ Base de datos de la Red Mundial de Información sobre Biodiversidad –Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (REMIB-CONABIO) y se consideraron los resultados de 1950 a 2009.
- ♣ Herbario Etnobotánico del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSSM).
- ♣ Herbario de la Escuela de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

Posteriormente se realizó una base de datos que fue procesada en el software Arc View GIS versión 3.1.

### **6.2 Recolección.**

El material vegetal se colectó el 24 de octubre de 2008, en el municipio de Cazones de Herrera, que se localiza en la zona norte del estado de Veracruz (20°41'42''N, 97°19'15''W).

Se recolectaron 1.5 kg de plantas completas, de las cuales un ejemplar fue depositado en el Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM. Y el resto se dejó secar en un lugar sombreado y seco para su utilización en la elaboración de las extracciones.

### **6.3 Extracciones.**

El material vegetal se dejó secar durante 15 días. Posteriormente las raíces fueron separadas de la parte vegetativa y se pesaron. Éstas se ordenaron por tamaños y se tomaron tres raíces de tres individuos combinando los tamaños y se pesaron, cuya media se utilizaría para conocer la dosis utilizada en la medicina tradicional.

Tanto las raíces, como la parte aérea de la planta se pulverizaron en un molino convencional para realizar extracciones sucesivas.

Para llevar a cabo las extracciones, se tomaron 40 gramos del polvo seco de raíz y parte aérea por separado y se realizaron tres extracciones en equipo Soxhlet de ocho horas cada una en tres solventes con diferente polaridad; hexano, diclorometano y metanol.

Se obtuvieron los extractos hexánico, diclorometánico y metanólico, a los cuales se les eliminó el disolvente utilizando un evaporador rotatorio, posteriormente se les dejó secar a temperatura ambiente.

En el caso de los extractos acuosos, se utilizaron 40 g de polvo de parte aérea y solamente 10 g de polvo de raíz, debido a la falta de material y se expusieron a agua destilada en ebullición durante 10 minutos. Las infusiones obtenidas se dejaron reposar durante 24 horas, fueron filtradas y colocadas en el congelador para ser liofilizadas posteriormente.

Una vez que todos los extractos llegaron a una desecación absoluta, se calcularon los rendimientos (Fig. 18).

Se calculó la cantidad de cada extracto de raíz de *P. hysterophorus* en la dosis utilizada en la medicina tradicional, mediante la siguiente fórmula:

$$C = \frac{(\bar{x} \text{ peso de 3 raíces}) (\text{peso seco extracto})}{\text{Peso polvo utilizado en cada solvente}}$$

Conociendo esta cantidad, se calculó la concentración del extracto acuoso de raíz cuando el extracto se decocciona en un litro de agua.

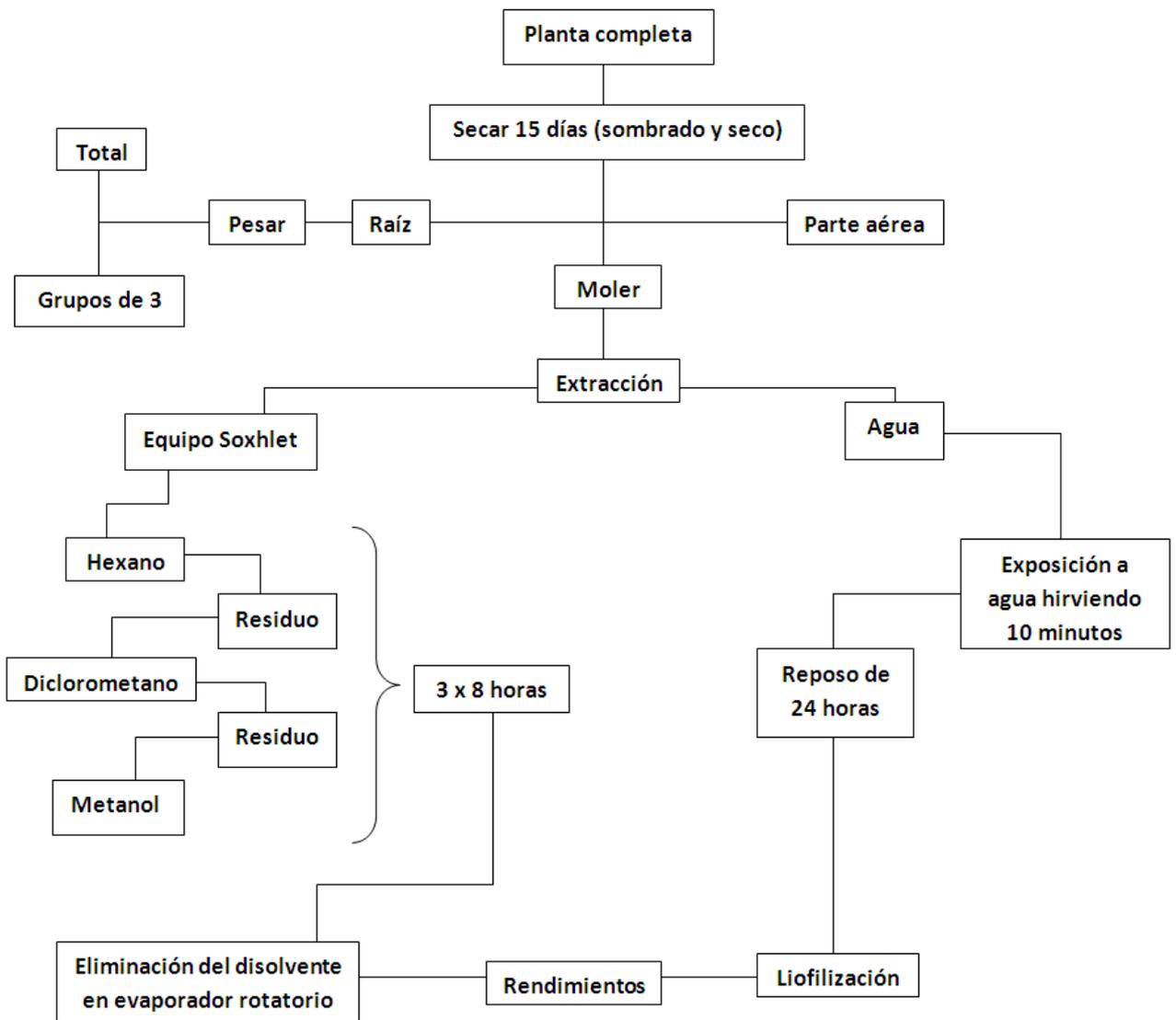


Fig.18. Método para la obtención de los extractos utilizados.

Una vez que se obtuvieron los extractos se probó su actividad sobre *Helicobacter pylori*, mediante dos pruebas *in vitro*: en cultivo líquido y en el caso de los extractos acuosos se realizó una prueba adicional, método de dilución en agar.

Ambas pruebas se realizaron en el laboratorio de la Dra. Irma Romero Álvarez, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM.

#### 6.4 Ensayo en cultivo líquido.

Se utilizó la cepa de *Helicobacter pylori* ATCC 43504, la cual tiene la citotoxina vacuolizante VacA y la proteína Cag A.

Las bacterias utilizadas se encontraban en viales que estaban congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  en un refrigerador REVCO, con medio de cosecha, que contenía 28g/l de medio Brucella Broth (DIFCO), glicerol 10%, suero fetal bovino 10% (Gibco BRL) y vancomicina 10 mg/l (SIGMA).

Para realizar el ensayo en cultivo líquido, los extractos hexánico, diclorometánico y metanólico se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y los extractos acuosos se disolvieron en agua destilada. Se prepararon el mismo día del ensayo. Las concentraciones finales fueron: 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125 y 3.9625  $\mu\text{g/ml}$ .

Se tomó un vial conteniendo *H. pylori*, la cual estaba congelada a  $-70^{\circ}\text{C}$  (REVCO) y se disolvió en caldo Muller-Hinton (DIFCO) con ciclodextrina (2%), vancomicina (10 mg/ml), trimetropina (5 mg/l), amfotericina B (2 mg/l) y polimixina B (2.5 mg/l) (SIGMA), hasta obtener una suspensión homogénea con una densidad óptica (DO) a 600 nm de 0.2 (Espectrofotómetro Pharmacia Biotech Ultrospec 2000), momento en el cual las bacterias se encuentran en fase de adaptación al medio (fase lag).

El cultivo con *H. pylori* se incubó en una estufa de  $\text{CO}_2$  (Nuair Ts Autflow), durante 5 o 6 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , 10%  $\text{CO}_2$  y 150 rpm, hasta obtener una  $\text{DO}_{600} = 0.3$ , cuando las bacterias se encuentran en el inicio de la fase exponencial (fase log) y hay  $\approx 10^8$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (Castillo *et al.*, 2009).

Al llegar a este punto se tomaron 1.5 ml del cultivo y se colocaron en tubos de ensaye estériles, se aplicaron los diferentes extractos a las concentraciones de 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125 y 3.9625  $\mu\text{g/ml}$ . Cada una por triplicado.

Se utilizaron como controles negativos DMSO y agua destilada para el caso de los extractos acuosos. Como control positivo se utilizaron dos antibióticos: amoxicilina, con concentraciones de 0.1, 0.05, 0.01 y 0.005  $\mu\text{g/ml}$  y metronidazol a concentraciones de 400, 300, 200 y 100  $\mu\text{g/ml}$ .

Después de aplicar el tratamiento a cada tubo, se agitó con un Vórtex (Genie 2 cat No. 3030A). De cada tubo se tomó una alícuota de 0.6 ml y se leyeron a  $\text{DO}_{600}$  para obtener una medición inicial.

Todos los tubos con cada condición experimental se incubaron bajo las condiciones óptimas para la bacteria, antes descritas, durante 21 horas. El cultivo de cada tubo se volvió a leer a  $\text{DO}_{600}$ , para obtener una medición final.

Para calcular el porcentaje de inhibición de cada tratamiento, se obtuvo la media de las diferencias de DO final menos DO inicial del control negativo (DMSO o agua destilada), la cual corresponde al 100% de crecimiento, y por tanto, al 0% de inhibición; y se compararon con las medias de las diferencias de lectura de cada tratamiento. Con los resultados obtenidos se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para cada extracto (Castillo *et al.*, 2009) (Fig. 19).

La fórmula para determinar el porcentaje de inhibición de *H. pylori* para cada tratamiento es la siguiente:

$$I = 100 - C$$

donde:

I = % de inhibición

C = % de crecimiento

Para calcular el porcentaje de crecimiento de *H. pylori* ante cada tratamiento se utiliza la siguiente fórmula:

$$C = \frac{[\bar{x}(\text{DO}_f - \text{DO}_i)] (100)}{\bar{x}(\text{DO}_f - \text{DO}_i) \text{ control negativo}}$$

### 6.5 Método de dilución en agar.

Se realizó de acuerdo a las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005)

Los extractos acuosos, tanto de raíz como de parte aérea se disolvieron en 10 ml de agua destilada para obtener concentraciones finales de: 1000, 500, 250 y 125  $\mu\text{g/ml}$ , cada uno se disolvió en una placa con agar Muller Hinton (previamente esterilizado), sangre de carnero (5%) y 4 antibióticos:

- Amfotericina 2 mg/l. Previene el crecimiento de hongos.
- Polimixina 2.5 mg/l. Evita el crecimiento de *Pseudomona* sp.
- Trimetropina 5 mg/l. Impide el crecimiento de otras bacterias Gram negativas.
- Vancomicina 19 mg/l. Evita el crecimiento de Gram positivas.

Con estas disoluciones se prepararon tres placas para cultivo por cada concentración, las cuales se dejaron secar en una estufa a 37°C durante 24 horas para quitar el exceso de humedad. Como control negativo se prepararon tres placas sin extracto. En cada una de las placas se sembró 0.1 ml ( $\approx 10^8$  UFC) de *H. pylori* ATCC 43504 con DO600= 0.1 determinada en una dilución 1:10 en medio Muller Hinton, ciclodextrina 2% y vancomicina. Se dejó incubar bajo condiciones óptimas durante 6 días.

La CMI se determinó como la concentración a la cual no había crecimiento de *H. pylori* en la placa (Fig. 20).

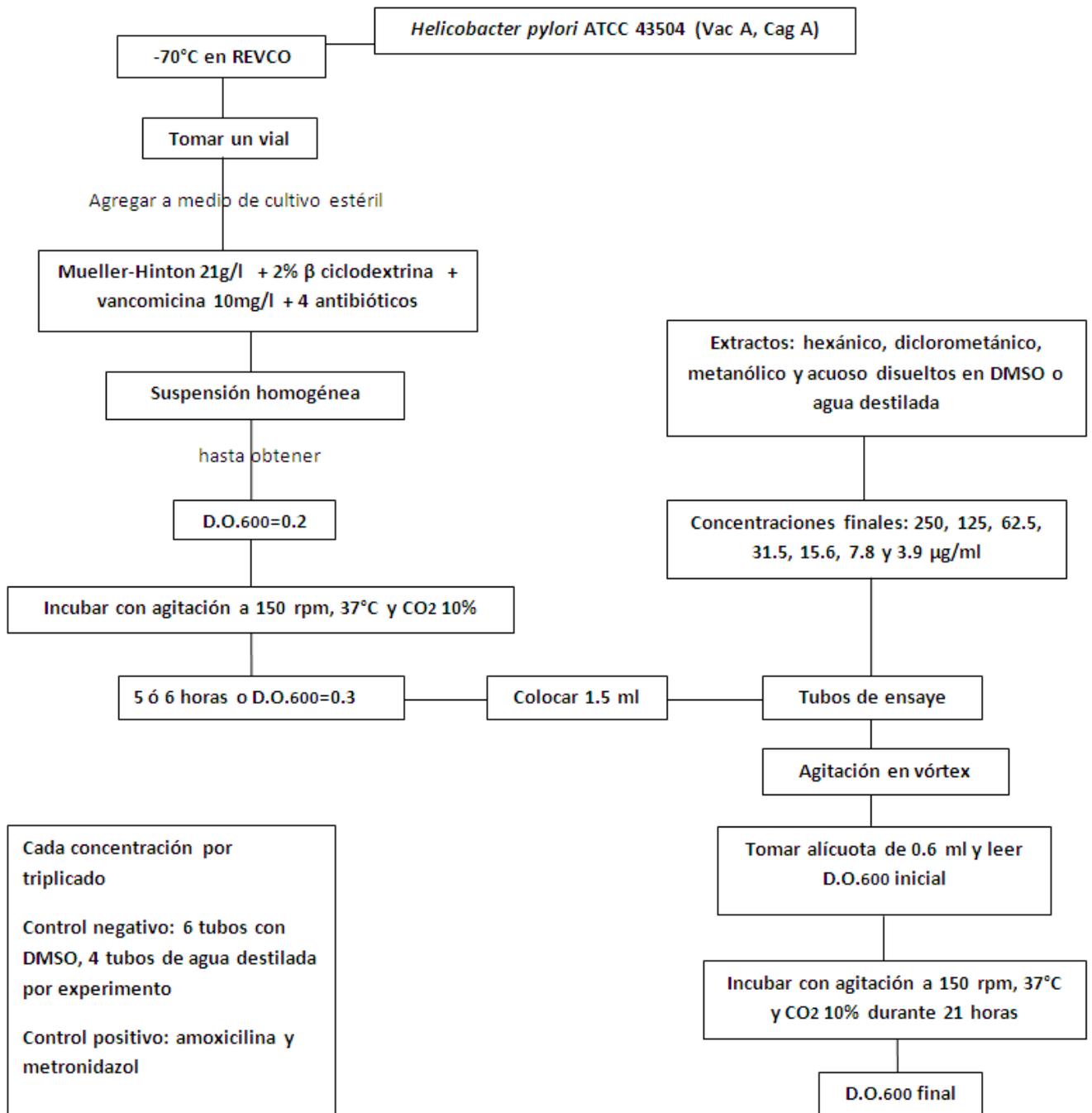


Fig. 19. Método de ensayo en cultivo líquido.

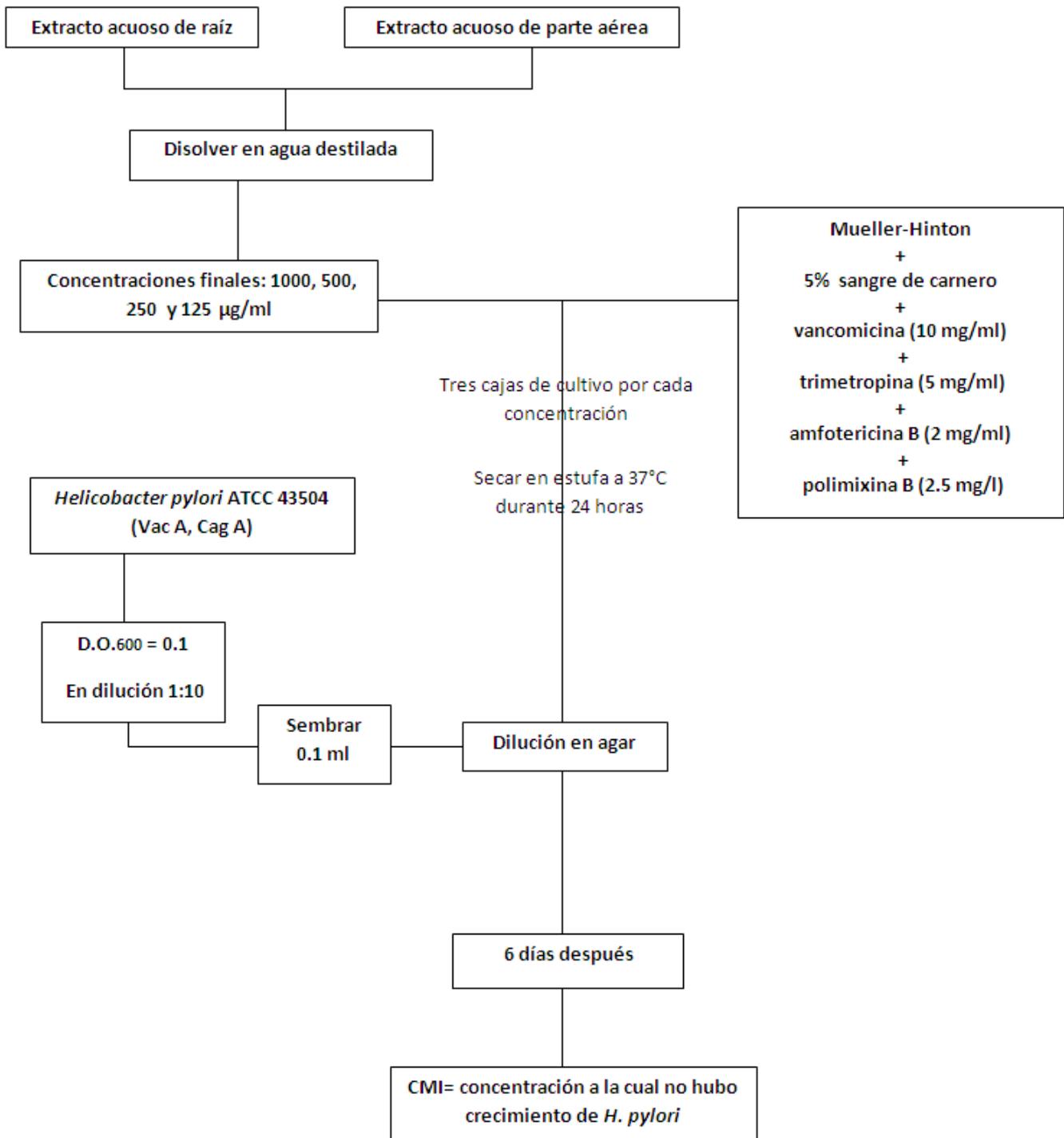


Fig. 20. Método de dilución en agar.

## **6.6 Análisis estadísticos**

### **6.6.1 Controles negativos**

Se calculó la incertidumbre de los controles negativos para analizar la variabilidad respecto a sus medias y se compararon mediante un análisis de varianza de un factor para número desigual de observaciones.

### **6.6.2 Grupos experimentales**

Se numeraron diez grupos experimentales por analizar:

1. extracto hexánico de raíz
2. extracto diclorometánico de raíz
3. extracto metanólico de raíz
4. extracto acuoso de raíz
5. extracto hexánico de parte aérea
6. extracto diclorometánico de parte aérea
7. extracto metanólico de parte aérea
8. extracto acuoso de parte aérea
9. control positivo amoxicilina
10. control positivo metronidazol

A los diez grupos se les calculó la incertidumbre para encontrar la variabilidad respecto a sus medias de inhibición.

Se realizó un análisis de varianza de dos factores para analizar si hay diferencia significativa entre los grupos experimentales, así como entre las concentraciones utilizadas en el presente estudio.

Finalmente se comparó mediante una prueba *t* de student para muestras independientes a los diferentes grupos entre sí y conocer si hay diferencia significativa entre ellos, así como entre las concentraciones utilizadas.

## **7. Resultados y discusión.**

### **7.1 Distribución geográfica.**

Al revisar el Herbario etnobotánico del Instituto Mexicano del Seguro Social, se encontraron 18 ejemplares registrados de los años 1978 a 1992, mientras que en el herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, se encontraron 134 ejemplares registrados del año 1837 a 1997. Los estados donde más ejemplares colectados se reportan son Veracruz (19.6 %), San Luis Potosí (11.9 %), Tamaulipas (8.4 %) y Yucatán (8.4 %) (Fig. 21).

La base de datos de la Red Mundial de Información sobre Biodiversidad –Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (REMIB-CONABIO) arrojó 372 datos de localización en México de *P. hysterothorus*.

Se tomaron en cuenta solo los datos que fueran posteriores a 1950, para evitar un resultado falso debido a la constante perturbación de los ecosistemas donde se desarrolla la especie.

El mapa de distribución geográfica (Fig. 22) muestra que *P. hysterothorus* se distribuye en 22 estados de la República Mexicana, habitando distintos tipos de ecosistemas. En años anteriores, se consideraba que *P. hysterothorus* habitaba 27 estados de México (Villaseñor y Espinosa, 1998), lo que señala que esta especie cuenta con una amplia distribución y que se encuentra también en los estados que no están reportados.

De acuerdo al número de repeticiones de localidad en la base de datos generada, así como la cercanía, se eligió Cazon de Herrera, estado de Veracruz como sitio de colecta.

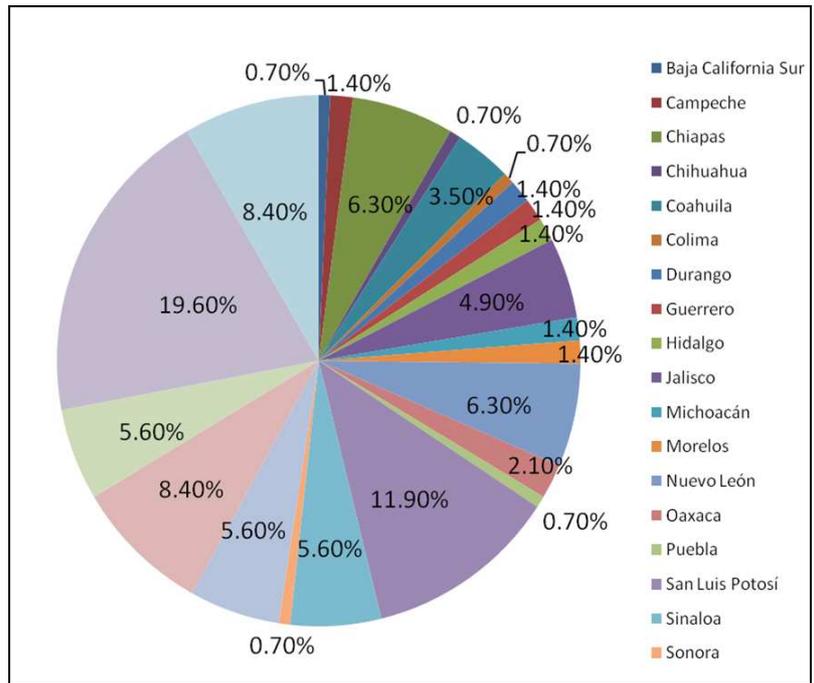


Fig. 21. Distribución por Estado de los ejemplares de herbario de *Parthenium hysterophorus*.

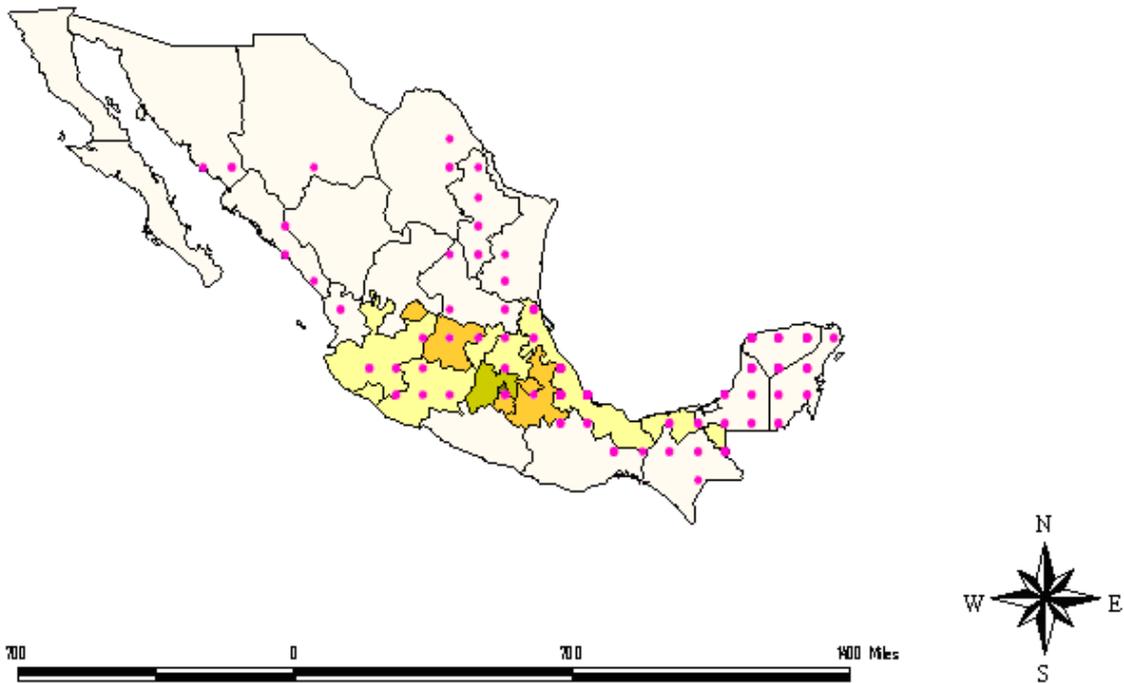


Fig.22. Mapa de distribución geográfica de *Parthenium hysterophorus* en México. REMIB-CONABIO y Herbarios IMSSM e IPN, 2010.

## 7.2 Recolección.

La colecta del material vegetal se realizó en el municipio de Cazonos de Herrera en el estado de Veracruz. En las coordenadas (20°41'42''N, 97°19'15''W) el día 24 de octubre de 2008. Se depositó un ejemplar botánico en el Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM. (Fig. 23).

La información etnobotánica arrojó que la gente utiliza la raíz de tres individuos de la planta, hervida en un litro de agua, tomado dos veces al día, como tratamiento para la gastritis.

Nombre científico: <i>Parthenium hysterophorus</i>	
Familia: Asteraceae	Nombre vulgar: Chuchuiate
Localidad: Cazonos de Herrera.	
Estado: Veracruz.	Fecha: 24 de octubre de 2008
Hábito: Herbácea	
	Altitud: 7 m
Colector: Jazmín Patricia Espinosa Rivero	No. 1
Observaciones: Se usa en el tratamiento de la gastritis.	
Determinó: M. en C. Armando Gómez Campos.	

Fig.23. Ficha del ejemplar botánico de *Parthenium hysterophorus* depositada en el herbario.

## 7.3 Extracciones

El material colectado se dejó secar durante 15 días en un lugar sombreado y seco, donde no sufrió contaminación alguna. Las raíces se separaron de la parte aérea y pesaron en su totalidad 53.36 g

Se pudo observar que las raíces variaban de tamaño considerablemente (Fig. 24), por lo que se ordenaron por tamaño y se pesaron en grupos de tres eligiendo tamaños distintos. (Fig. 25)

Para tratar de determinar la dosis utilizada por la gente, en el tratamiento contra gastritis. El valor encontrado fue 0.52 g.



Fig. 24. Comparación de diferentes tamaños de raíces.



Fig. 25. Ordenamiento por tamaño de las raíces para formar grupos de tres y determinar dosis de acuerdo al uso tradicional.

### 7.3.1 Extractos de raíz.

Se obtuvieron 0.1186 g de extracto hexánico, lo cual corresponde al 0.296% de rendimiento; 0.3436 g de extracto diclorometánico, que es 0.859%; con metanol como solvente se obtuvieron 4.0901 g, lo que es 10.22%; y 0.4958 g de extracto acuoso, que corresponde al 4.958%. (Cuadro 4)

Mediante estas extracciones selectivas por polaridad de los componentes se obtuvieron bajos rendimientos, ya que se obtuvieron valores menores al 10%, excepto para el metanol, que superó este valor. Sin embargo, las cantidades de extracto fueron suficientes para realizar las pruebas de actividad anti-*H. pylori*.

Referente a la concentración utilizada por la gente es de 25.767 µg/ml de extracto acuoso. También se calculó la cantidad de extracto en la dosis utilizada por la gente, para cada solvente (Cuadro 4)

El metanol tuvo el mayor rendimiento (10.22 %), seguido del agua, el diclorometano y por último el hexano.

<b>Raíz</b>				
Solvente	Peso polvo (g)	Peso seco extracto (g)	%	Cantidad en dosis de 0.52 g (mg)
Hexano	40	0.1186	0.296	1.542
Diclorometano	40	0.3436	0.859	4.467
Metanol	40	4.0901	10.22	53.171
Agua	10	0.4958	4.958	25.767

Cuadro 4. Rendimientos calculados para extractos de raíz.

### 7.3.2 Extractos de parte aérea.

En el cuadro 5 se resume la cantidad de extracto obtenido, así como el porcentaje de rendimiento para cada uno de los solventes utilizados en la extracción de la parte aérea de *P. hysterophorus*.

Al igual que en la raíz, el metanol fue el solvente que extrajo mayor concentración de extracto, después el agua, el diclorometano y el hexano.

<b>Parte aérea</b>			
Solvente	Peso polvo seco	Peso seco extracto (g)	%
Hexano	40	0.2362	0.590
Diclorometano	40	1.1738	2.934
Metanol	40	3.8944	9.736
Agua	40	2.767	6.917

Cuadro 5. Rendimientos calculados para extractos de parte aérea.

## 7.4 Evaluación del potencial anti-*Helicobacter pylori*

### 7.4.1 Determinación de la CMI mediante ensayo en cultivo líquido.

Los cultivos experimentales se realizaron en seis ocasiones diferentes, usando en cada una de ellas un número de tubos con agua destilada o DMSO como control negativo

También se calculó la incertidumbre (I) (Elorza, 2009), para encontrar la variabilidad respecto a las medias muestreadas (Cuadro 6).

$$I = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

CONTROL	Número de tubos	Media de crecimiento	Desviación estándar	Incertidumbre
Control 1	10	0.852	0.080	0.0254
Control 2	10	0.745	0.084	0.0266
Control 3	10	0.662	0.060	0.0190
Control 4	6	0.724	0.029	0.0118
Control 5	6	0.830	0.195	0.0795
Control 6	6	0.865	0.140	0.0570

Cuadro 6. Número de tubos empleados, media, desviación estándar e incertidumbre de los controles negativos utilizados.

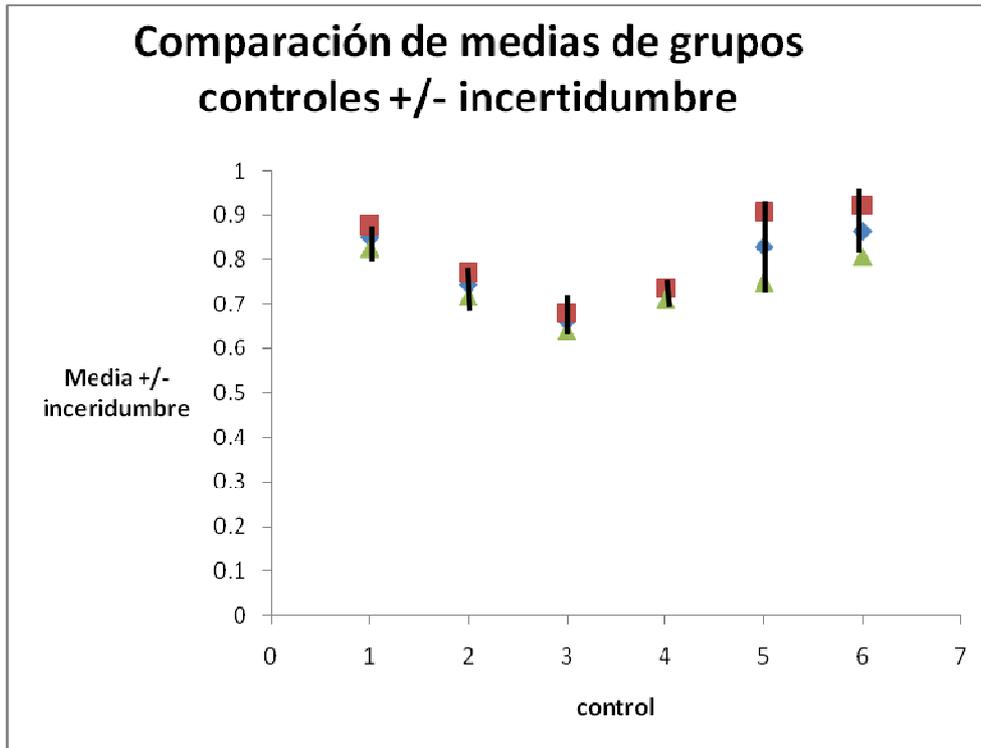


Fig. 26. Comparación de las medias de los controles y su incertidumbre.

En la figura 26 se observa que los controles no son muy diferentes, a excepción del control 3, que tiene una media más baja que los demás. Los controles 2 y 4 presentan una media de crecimiento muy similar. Los controles 1, 5 y 6 presentan las medias más altas, sin embargo los controles 5 y 6 presentan mayor incertidumbre, es decir, existe mayor variabilidad en los valores de las medias muestreadas.

#### 7.4.1.2 Análisis de varianza de un factor.

Con el propósito de unir todas las mediciones de los controles en un control único se compararon mediante un análisis de varianza de un factor para número desigual de observaciones (Cuadro 7).

Se contrastaron dos hipótesis:

Hipótesis nula ( $H_0$ ): No se encuentran diferencias significativas entre las medias resultantes de los controles, por tanto se considera que son iguales.

Hipótesis alterna ( $H_a$ ): Se considera que hay diferencias significativas entre las medias resultantes de los controles, por tanto son diferentes.

Variación	Grados de Libertad	Media de Cuadrados	F
Entre tratamientos $Vb = \sum_j n_j (\bar{x}_j - \bar{x})^2$ $Vb = 0.278$	(a-1) 5	$Vb/a-1$ 0.056	$F = \frac{Vb/a-1}{Vw/n-a}$ F = 5.250 con 5, 42 grados de libertad
Dentro de tratamientos $Vw = V - Vb = 0.445$	(n-a) 42	$Vw/n-a$ 0.011	
Total $V = \sum_{j,k} (x_{jk} - \bar{x})^2$ $Vb + Vw = 0.724$	(n-1) 47		

Cuadro 7. Análisis de varianza de un factor para los controles negativos usados (Spiegel, 1976).

Ya que el valor de la F calculada (5.25) para los grupos es mayor a la F crítica (2.45) para una  $p < 0.05$ , se rechaza la  $H_0$  y se considera que las medias de los controles son diferentes.

Esto puede deberse a situaciones particulares como la calibración de los instrumentos, cambios por los materiales utilizados o variaciones en las maniobras realizadas. Por esto cada cultivo experimental se comparó con el control negativo correspondiente y se calculó el porcentaje de inhibición sobre *H. pylori*. De esta manera se normalizan las mediciones y son susceptibles de compararse entre sí.

#### 7.4.1.3 Extractos de raíz.

De los cuatro extractos a probar, solo el extracto metanólico se pudo disolver con facilidad y se probó a partir de una concentración de 250  $\mu\text{g/ml}$ ; mientras que el hexánico, el diclorometánico y el acuoso se tuvieron que probar a partir de una concentración más baja (125  $\mu\text{g/ml}$ )

Al realizar los experimentos, se utilizó la primera disolución como stock y se prepararon diluciones 1:2 para probar concentraciones más bajas hasta encontrar la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Las CMI encontradas fueron de 15.625  $\mu\text{g/ml}$ , 31.25  $\mu\text{g/ml}$  y 125  $\mu\text{g/ml}$  para los extractos hexánico, diclorometánico y metanólico, respectivamente. El extracto acuoso no presentó actividad inhibitoria (Cuadros 8-11 y Figuras 27-30).

Concentración $\mu\text{g/ml}$	% inhibición
125	104.34%
62.5	109.51%
31.25	114.31%
15.625*	112.09%
7.8125	79.87%
3.90625	59.46%

Cuadro 8. Porcentaje de inhibición para cada concentración de extracto hexánico de raíz.\*CMI.

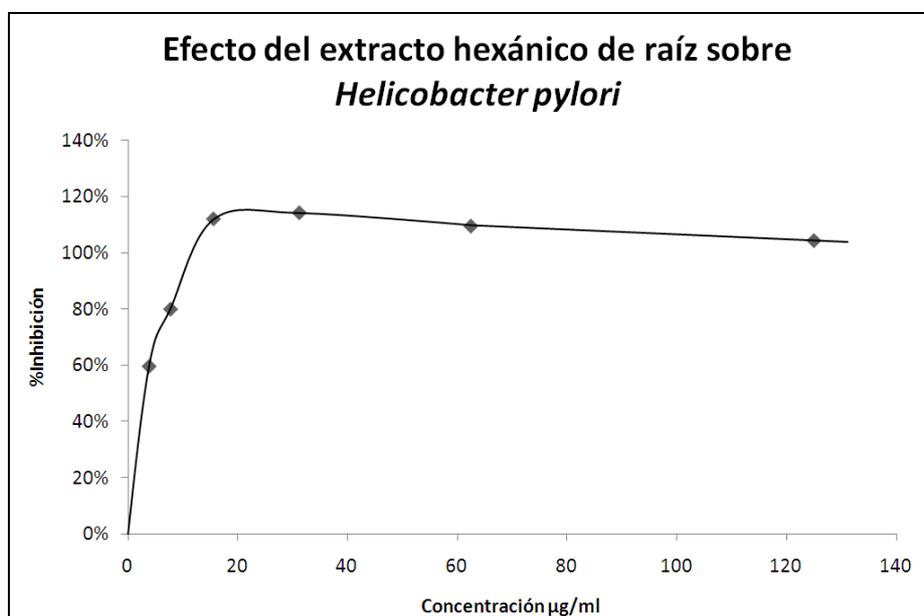


Fig. 27. Efecto del extracto hexánico de raíz sobre *Helicobacter pylori*.

Concentración $\mu\text{g/ml}$	% inhibición
125	106.57%
62.5	111.38%
31.25*	113.32%
15.625	92.13%
7.8125	68.19%
3.90625	66.71%

Cuadro 9. Porcentaje de inhibición para cada concentración de extracto diclorometánico de raíz.\*CMI.

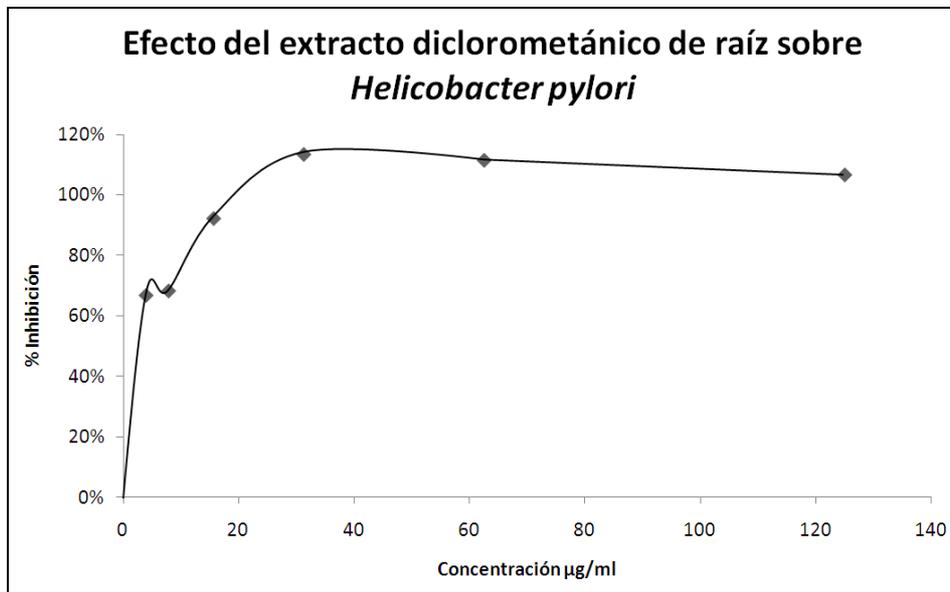


Fig. 28. Efecto del extracto diclorometánico de raíz sobre *Helicobacter pylori*.

Concentración $\mu\text{g/ml}$	% inhibición
250	114.42%
125*	113.97%
62.5	77.13%
31.25	29.04%

Cuadro 10. Porcentaje de inhibición para cada concentración de extracto metanólico de raíz.\*CMI.

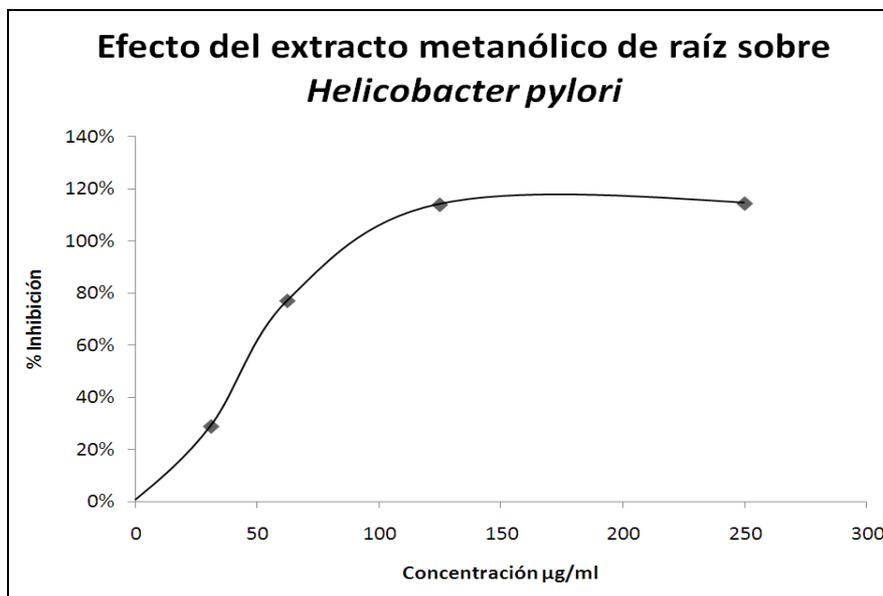


Fig. 29. Efecto del extracto metanólico de raíz sobre *Helicobacter pylori*.

Concentración $\mu\text{g/ml}$	% inhibición
125	-0.59%
62.5	3.40%
31.25	1.50%
15.625	0.50%
7.8125	25.78%

Cuadro 11. Porcentaje de inhibición para cada concentración de extracto acuoso de raíz.

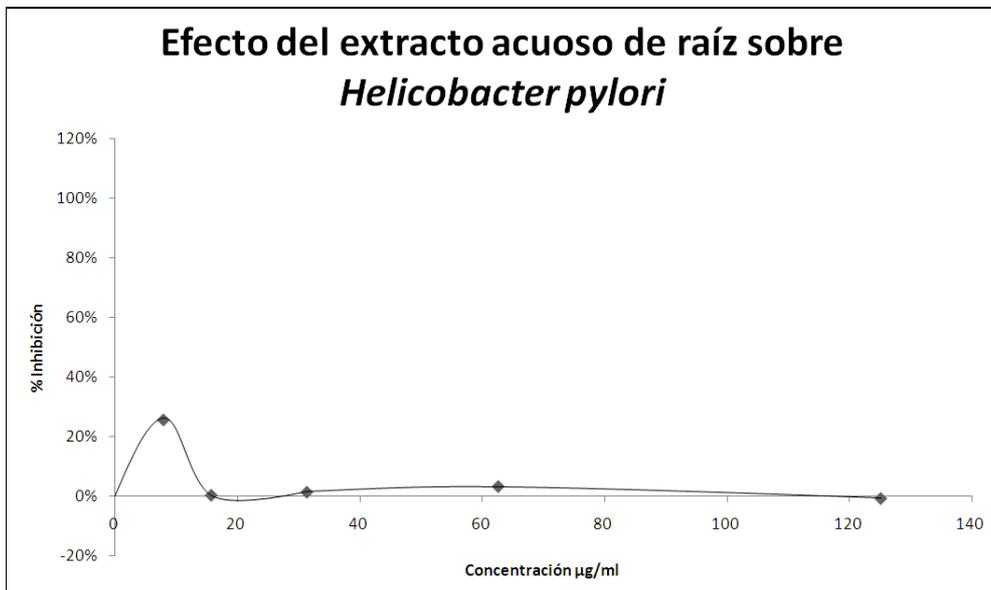


Fig. 30. Efecto del extracto acuoso de raíz sobre *Helicobacter pylori*.

El hecho de tener porcentajes de inhibición mayores a 100 % se interpreta como la capacidad del extracto de no solo inhibir el crecimiento de la población de *H. pylori*, si no también destruir un porcentaje de células que se sembraron inicialmente, ya que éstas al sufrir lisis, se precipitan, disminuyendo el valor de la densidad óptica.

La mayor actividad *in vitro* se presentó en los extractos hexánico y diclorometánico, que tienen compuestos no polares, sin embargo se observa un aumento en el porcentaje de inhibición en medida que la concentración del extracto baja, hasta llegar al CIM (Cuadro 8 y 9). Es posible que el extracto se haya precipitado y los compuestos activos no se hayan distribuido uniformemente en la mezcla, provocando que se tomara más disolvente y menos extracto en el momento de aplicar el tratamiento al cultivo.

La CMI del extracto metanólico fue mayor a la de los extractos hexánico y diclorometánico. El porcentaje de inhibición de este extracto se ve claramente influido por la concentración a la que fue aplicado; entre mayor era la concentración, mayor era el porcentaje de inhibición (Cuadro 10).

El extracto acuoso de raíz no presentó una buena actividad anti-*H. pylori*, esto puede deberse a:

- El calor constante al que estuvo sometido el extracto durante su obtención descompuso los compuestos que pudieran tener alguna actividad.
- Los componentes de este extracto no tienen actividad anti-*H. pylori*.

Este último punto abre la posibilidad de probar el efecto de este extracto sobre algún otro microorganismo, ya que además se ha visto su efecto insecticida en lepidópteros y ácaros (Águila *et al.*, 2000; Villate *et al.*, 2006).

#### **7.4.1.4 Extractos de parte aérea.**

A diferencia de los extractos de raíz, los cuatro extractos de parte aérea se disolvieron con facilidad, y se probaron a partir de una concentración de 250 µg/ml

Al realizar los experimentos, se utilizó la primera disolución como stock y se prepararon diluciones 1:2 para probar concentraciones más bajas hasta encontrar la CMI.

Las CMI encontradas fueron de 31.25 µg/ml, 15.625 µg/ml y 31.25 µg/ml para los extractos hexánico, diclorometánico y metanólico, respectivamente. El extracto acuoso presentó un porcentaje de inhibición de 72.21% como máximo, a una concentración de 250 µg/ml (Cuadros 12-15 y Figuras 31-34).

Concentración $\mu\text{g/ml}$	% inhibición
250	117.82%
125	119.79%
62.5	120.09%
31.25*	113.41%
15.625	95.63%
7.8125	66.58%
3.90625	1.93%

Cuadro 12. Porcentaje de inhibición para cada concentración de extracto hexánico de parte aérea.\*CMI.

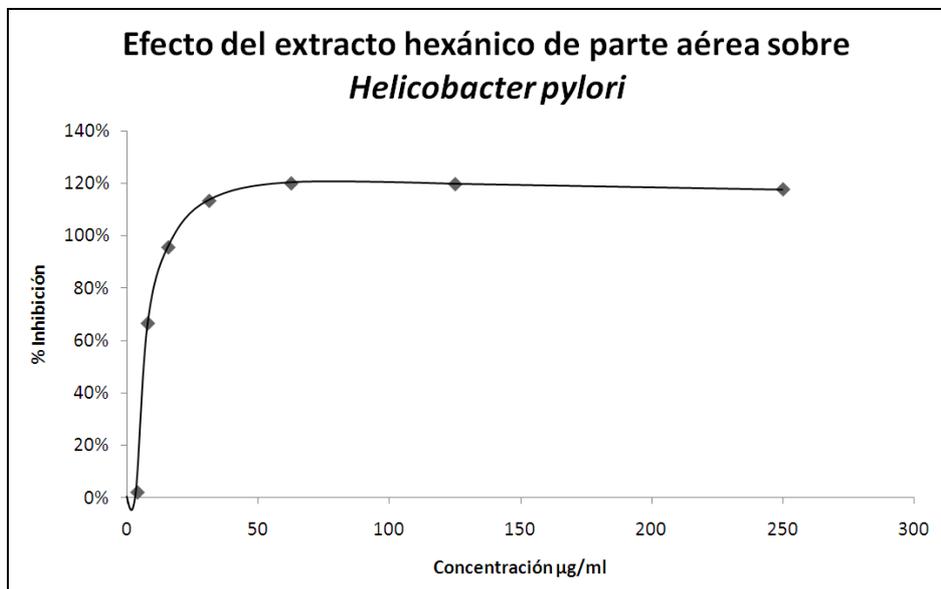


Fig. 31. Efecto del extracto hexánico de parte aérea sobre *Helicobacter pylori*.

Concentración $\mu\text{g/ml}$	% inhibición
250	95.17%
125	106.34%
62.5	115.56%
31.25	115.96%
15.625*	103.90%
7.8125	82.81%
3.90625	44.48%

Cuadro 13. Porcentaje de inhibición para cada concentración de extracto diclorometánico de parte aérea.\*CMI.

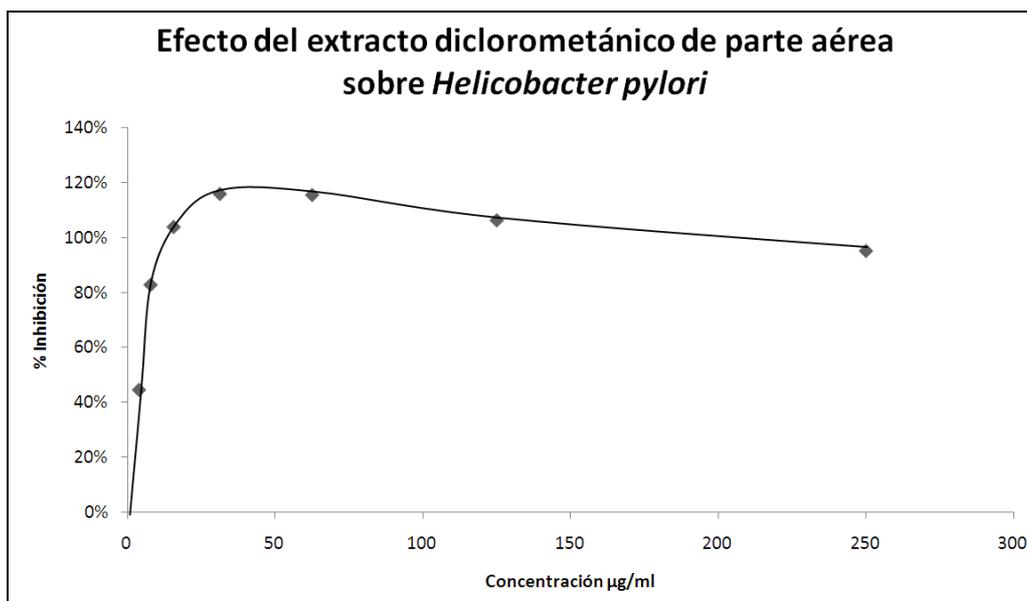


Fig. 32. Efecto del extracto con diclorometano de parte aérea sobre *Helicobacter pylori*.

Concentración $\mu\text{g/ml}$	% inhibición
250	113.90%
125	112.84%
62.5	119.34%
31.25*	116.13%
15.625	88.31%
7.8125	41.85%
3.90625	52.35%

Cuadro 14. Porcentaje de inhibición para cada concentración de extracto metanólico de parte aérea.\*CMI

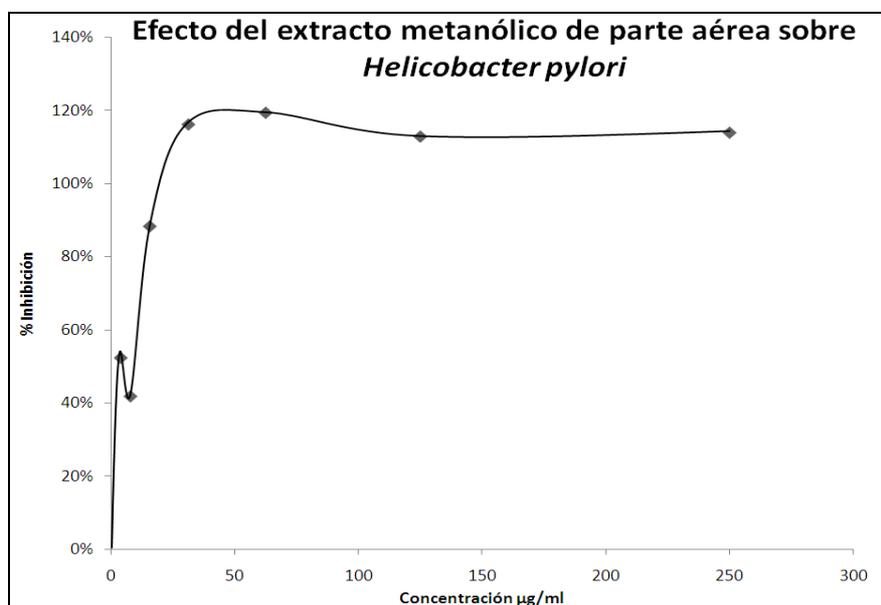


Fig. 33. Efecto del extracto metanólico de parte aérea sobre *Helicobacter pylori*.

Concentración $\mu\text{g/ml}$	% inhibición
250	72.21%
125	34.33%
62.5	24.16%
31.25	13.52%
15.625	24.72%

Cuadro 15. Porcentaje de inhibición para cada concentración de extracto acuoso de parte aérea.

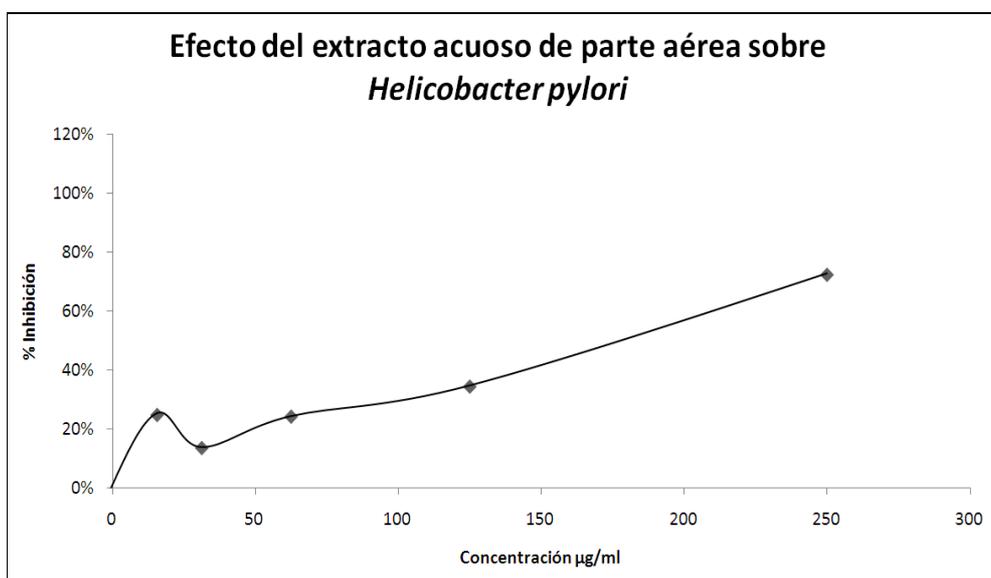


Fig. 34. Efecto del extracto acuoso de parte aérea sobre *Helicobacter pylori*.

Se presentó actividad anti-*H. pylori* en los cuatro extractos: hexánico, diclorometánico, metanólico y acuoso, los tres primeros, con CMI muy parecidas y el último no tan efectivo como los extractos con los demás solventes orgánicos.

Al igual que en los extractos de raíz, se observa un aumento en el porcentaje de inhibición en medida que la concentración del extracto baja, hasta llegar al CIM (Cuadros 12, 13 y 14), a pesar de que los extractos de parte aérea se disolvieron con facilidad.

Es posible que los extractos más concentrados presenten mayor cantidad de colorante, aumentando los valores de la densidad óptica, aunque sea imperceptible a la vista.

El extracto acuoso de parte aérea presentó actividad anti-*H. pylori*, a diferencia del extracto acuoso de raíz, debido a que tiene compuestos activos, que además han mostrado actividad antifúngica (Bajwa *et al.* 2003), alelopática (Maharjan *et al.*, 2007) e insecticida en lepidópteros y ácaros (Águila *et al.*, 2000; Villate *et al.*, 2006).

#### **7.4.1.5 Controles positivos**

Se utilizaron las primeras disoluciones como stock y se prepararon diluciones 1:2 para probar concentraciones más bajas hasta encontrar la CMI.

Amoxicilina

La amoxicilina se probó en concentraciones de 0.1, 0.05, 0.01 y 0.005  $\mu\text{g/ml}$ .

La CMI de la amoxicilina es de 0.05  $\mu\text{g/ml}$ . (Cuadro 16 y Figura 35)

➤ Metronidazol.

El metronidazol se probó a concentraciones de 400, 300, 200 y 100  $\mu\text{g/ml}$ .

La CMI del metronidazol es de 300  $\mu\text{g/ml}$ . (Cuadro 17 y Figura 36)

Concentración $\mu\text{g/ml}$	% inhibición
0.1	99.59%
0.05*	105.66%
0.01	99.31%
0.005	82.73%

Cuadro 16. Porcentaje de inhibición para cada concentración de amoxicilina.\*CMI

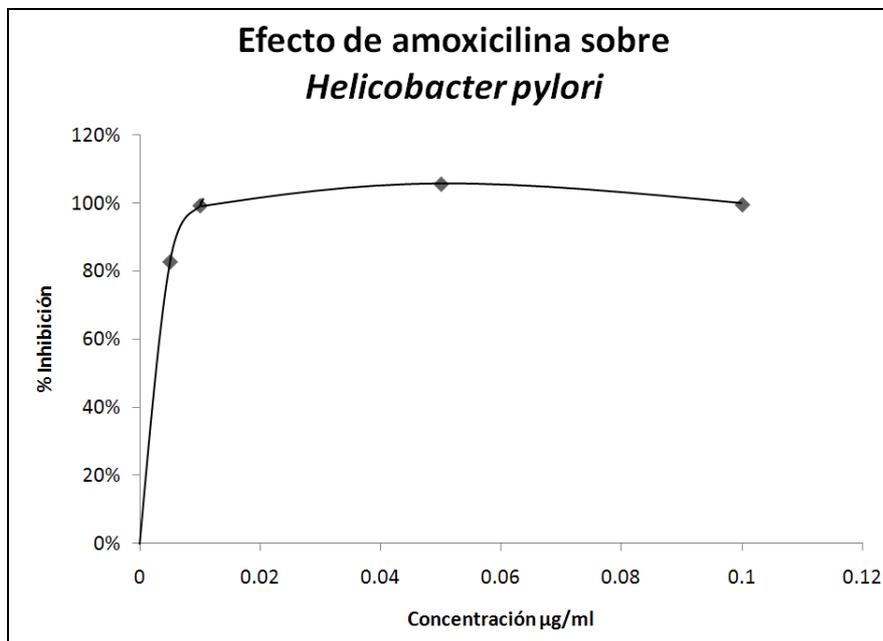


Fig. 35. Efecto de amoxicilina sobre *Helicobacter pylori*.

Concentración $\mu\text{g/ml}$	% inhibición
400	106.99%
300*	105.79%
200	98.55%
100	78.08%

Cuadro 17. Porcentaje de inhibición para cada concentración de metronidazol.\*CMI

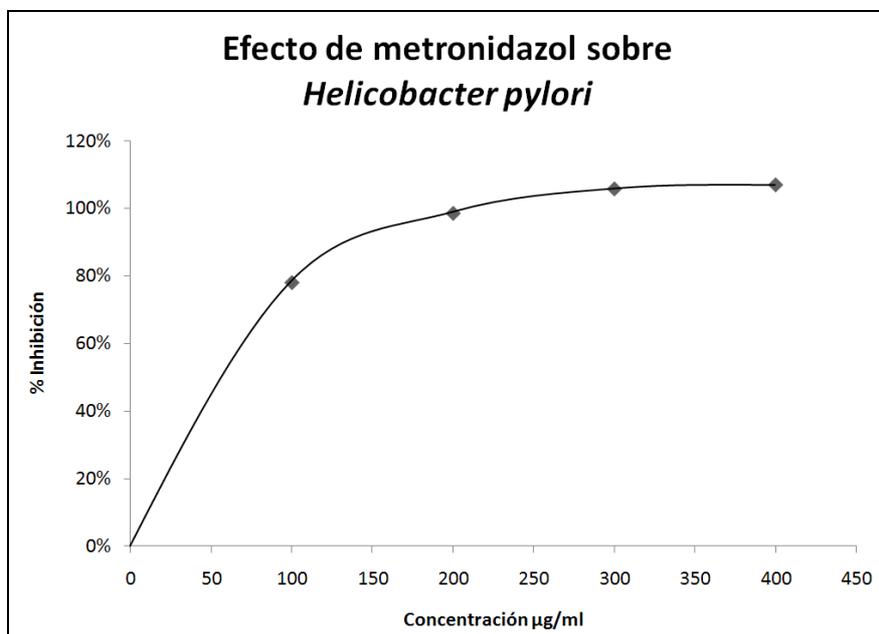


Fig. 36. Efecto de metronidazol sobre *Helicobacter pylori*.

#### **7.4.1.6 Comparación de grupos experimentales.**

Se realizaron diez grupos de cultivos experimentales, cuatro corresponden a los extractos obtenidos de la raíz (hexánico, diclorometánico, metanólico y acuoso), cuatro obtenidos de la parte aérea (hexánico, diclorometánico, metanólico y acuoso) y dos controles positivos (amoxicilina y metronidazol) (Fig. 35 y 36). El efecto de la amoxicilina no se presentó en estas gráficas porque las concentraciones que se manejaron son muy bajas y su efecto no sería claramente perceptible.

A cada grupo experimental se le registró el número de concentraciones estudiadas y el total de tubos analizados. Asimismo se calculó la media total de inhibición para cada grupo experimental, su desviación estándar e incertidumbre (I), para encontrar la variabilidad entre ellos (Cuadro 18 y Figura 39).

### Efecto de los extractos de raíz sobre *Helicobacter pylori*

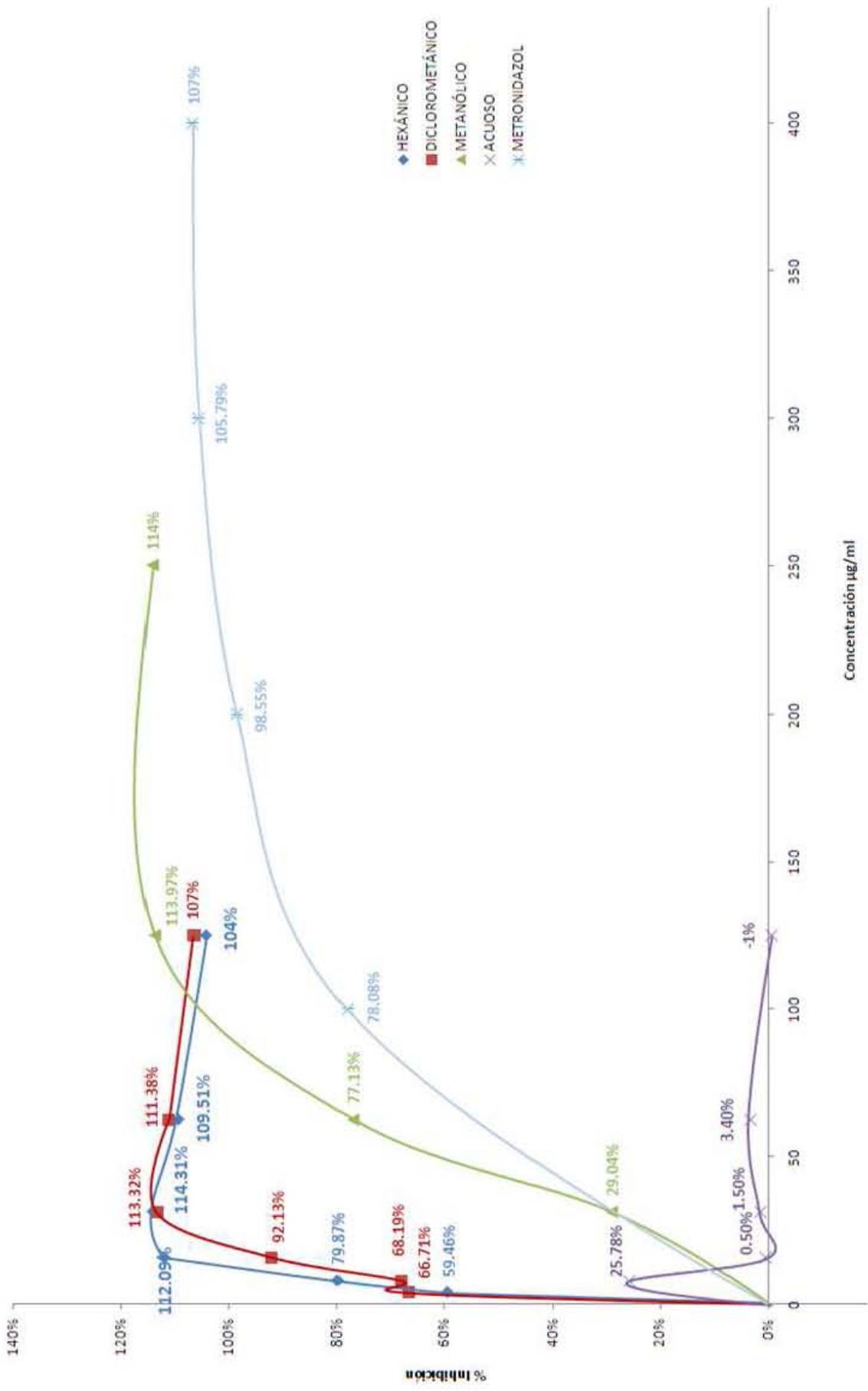


Fig. 37. Efecto de los extractos de raíz sobre *Helicobacter pylori*

## Efecto de los extractos de parte aérea sobre *Helicobacter pylori*

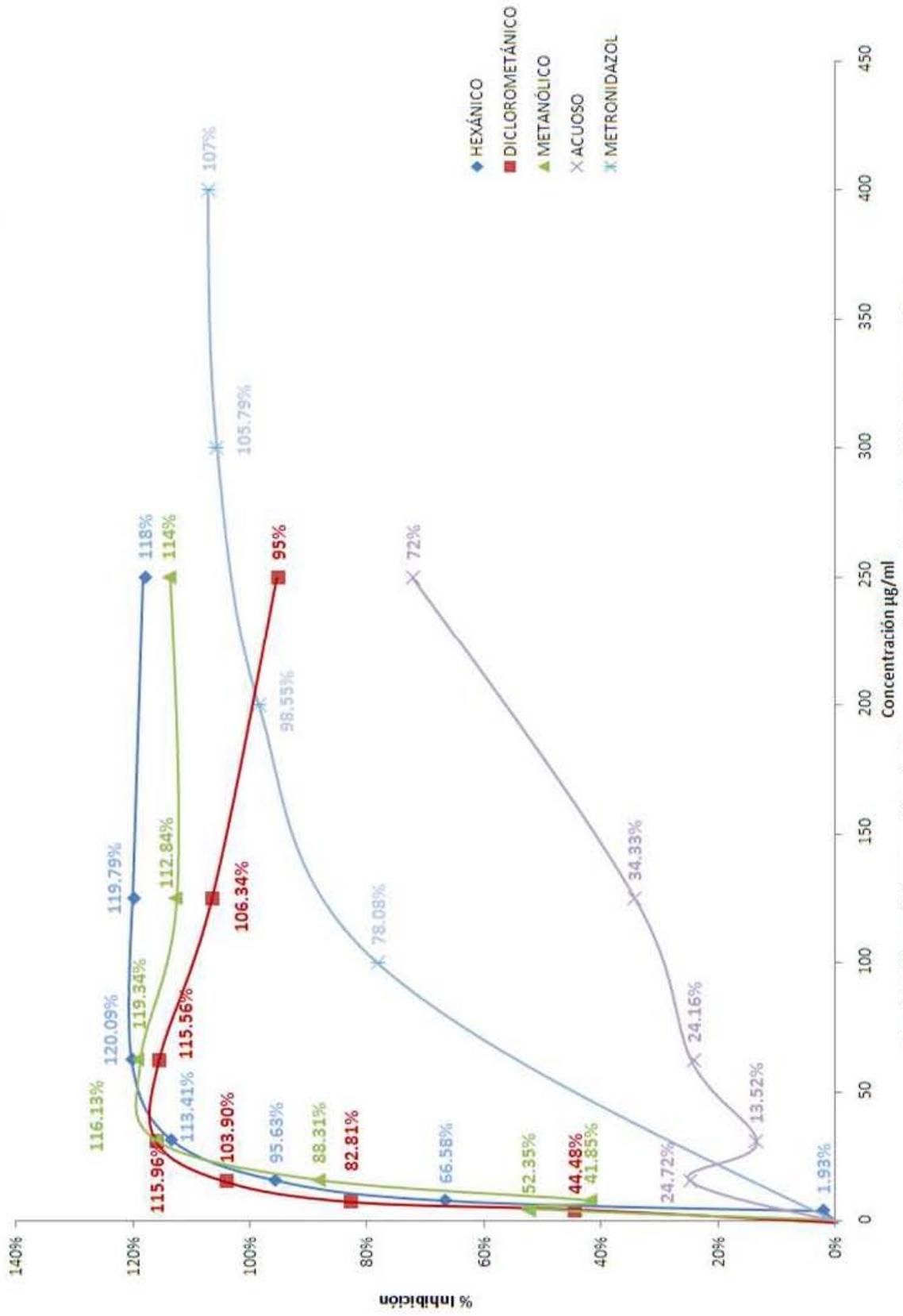


Fig. 38. Efecto del metronidazol y los extractos de parte aérea sobre *Helicobacter pylori*.

Grupo		Número de concentraciones	Número de tubos	Media total de inhibición	Desviación estándar	Incertidumbre
1	Extracto hexánico de raíz	6	24	100.84	20.357	4.1554
2	Extracto con diclorometano de raíz	6	24	95.48	19.762	4.0338
3	Extracto metanólico de raíz	4	24	83.64	37.631	7.6814
4	Extracto acuoso de raíz	5	24	4.16	17.515	3.5751
5	Extracto Hexánico de parte aérea	7	30	95.77	36.028	6.5778
6	Extracto con diclorometano de parte aérea	7	39	100.21	22.362	3.5808
7	Extracto metanólico de parte aérea	7	30	96.53	32.194	5.8777
8	Extracto acuoso de parte aérea	4	24	30.08	27.989	5.7133
9	Control Amoxicilina	4	12	96.81	8.959	2.5861
10	Control Metronidazol	4	12	97.39	13.012	3.7564

Cuadro 18. Valores calculados para cada uno de los 10 grupos experimentales en los análisis estadísticos.

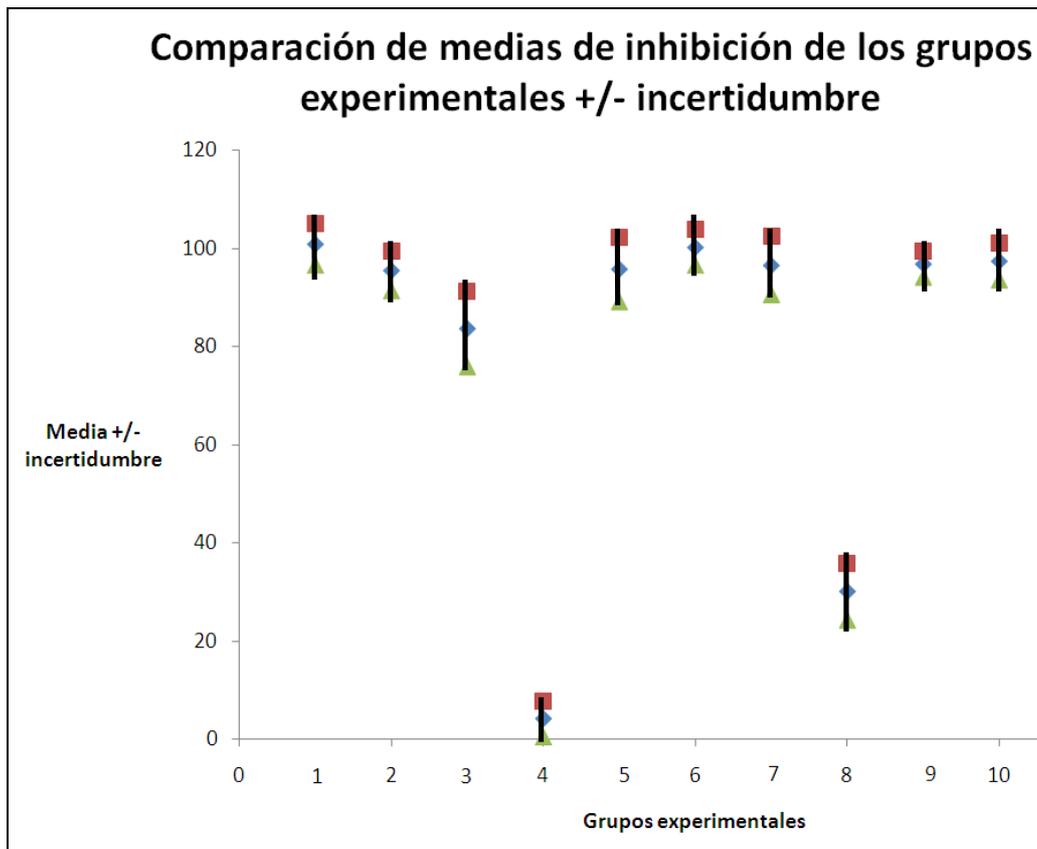


Fig. 39. Comparación de las medias de inhibición de los grupos experimentales y la incertidumbre.

Al observar las figuras 37 y 38 se puede señalar que la actividad de los extractos es diferente entre sí.

En el caso de extractos de raíz, es mayor la inhibición en el extracto hexánico, seguido del extracto diclorometánico y después el metanólico. Estos tres inhiben en mayor porcentaje a concentraciones más bajas que el metronidazol. El extracto acuoso resultó ser poco efectivo, inhibiendo como máximo el 25.78% del crecimiento bacteriano.

Estas aseveraciones se confirman al examinar la figura 39. En dicha gráfica el grupo 1 tiene una mayor media que los grupos 2, 3, 10 e, indudablemente, el grupo 4 (Cuadro 18).

Los extractos de parte aérea no tuvieron un comportamiento muy distinto al de los extractos de raíz. En la figura 38 se muestra que el extracto más eficaz fue el hexánico; con una línea de tendencia muy parecida, le sigue el extracto metanólico y el extracto diclorometánico ocupa el tercer lugar en efectividad. Estos tres grupos tienen mayor efecto inhibitorio que el metronidazol.

El extracto acuoso de parte aérea inhibió hasta el 72.21% del crecimiento de *H. pylori*, por tanto, tuvo un mayor porcentaje que el extracto acuoso de raíz, sin embargo no alcanzó los niveles de inhibición que los demás grupos.

En el cuadro 18 se presenta otro orden de efectividad para los extractos de parte aérea: en primer lugar el extracto diclorometánico, después el metanólico, el hexánico, y el extracto acuoso. Además se observa que el metronidazol resultó ser más efectivo que el extracto metanólico y hexánico.

Cabe mencionar que en la figura 39 no se observa una diferencia notable entre los grupos experimentales que corresponden a la parte aérea. Es por eso que se realizaron más pruebas estadísticas.

#### **7.4.1.6.1 Análisis de varianza de dos factores.**

Para determinar si existen diferencias entre los grupos y entre las concentraciones, que no se deban al azar, se realizó un análisis de varianza de dos factores con números desiguales de observaciones (Cuadro 19).

Se contrastaron dos hipótesis para cada factor:

*Grupos experimentales:*

Ho: No se encuentran diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición de los grupos experimentales, por tanto se considera que son iguales.

Ha: Se considera que hay diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición de los grupos experimentales, por tanto hay diferencia entre ellos.

*Concentraciones:*

Ho: No se encuentran diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición de las concentraciones utilizadas, por tanto se considera que son iguales.

Ha: Se considera que hay diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición de las concentraciones utilizadas, por tanto hay diferencia entre ellas.

Variación	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	
Entre grupos $V_r = b \sum_j (\bar{x}_j - \bar{x})^2$ $V_r = 25907.24$	(a-1) 9	$V_r / a - 1$ 28100.80	$\frac{V_r / a - 1}{V_e / (a-1)(b-1)}$ <b>12.39</b>	G.L. 9, 54
Entre concentraciones $V_c = a \sum_k (\bar{x}_k - \bar{x})^2$ $V_c = 43158.96$	(b-1) 6	$V_c / b - 1$ 7192.83	$\frac{V_c / b - 1}{V_e / (a-1)(b-1)}$ <b>3.17</b>	G. L. 6, 54
Aleatoria o residual $V_e = V_t - V_r - V_c$ $V_e = 122447.23$	(a-1) *(b-1) 54	$V_e / (a-1)(b-1)$ 2267.54		
Total $V_t = \sum_{j, k} (x_{jk} - \bar{x})^2$ $V_t = 418511.43$				

Cuadro 19. Análisis de varianza de dos factores (Spiegel, 1976).

*Grupos experimentales:*

Ya que el valor de la F calculada (12.39) para los grupos es mayor a la F crítica (2.12) para una  $p < 0.05$ , se rechaza la  $H_0$  y se considera que hay diferencia entre los grupos experimentales.

*Concentraciones:*

Ya que el valor de la F calculada (3.17) para las concentraciones es mayor a la F crítica (2.34), para una  $p < 0.05$ , se rechaza la hipótesis de igualdad entre concentraciones.

Mediante este análisis de varianza se confirma que existe diferencia entre todos los extractos y con los controles positivos, además que hay diferencia al aplicar los tratamientos experimentales a diferentes concentraciones.

#### 7.4.1.6.2 Prueba t de student

Con el objetivo de comparar los grupos experimentales y las concentraciones entre sí, se realizó una prueba t de Student para muestras independientes (Cuadros 20 y 21).

El modelo matemático utilizado fue el siguiente:

$$t = \frac{\overline{X_1} - \overline{X_2}}{\sigma_p \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}}$$

donde:

t = valor estadístico de la prueba t de Student

$\overline{X_1}$  = valor promedio del grupo 1

$\overline{X_2}$  = valor promedio del grupo 2

$\sigma_p$  = desviación estándar ponderada de ambos grupos

$N_1$  = tamaño de la muestra del grupo 1

$N_2$  = tamaño de la muestra del grupo 2

Las hipótesis fueron las siguientes:

H<sub>0</sub>: No hay diferencia significativa entre las medias de inhibición los grupos comparados.

H<sub>a</sub>: Se considera que hay diferencia significativa entre las medias de inhibición de las concentraciones comparadas.

Grupo	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.9067	1.9282	17.2666	0.6051	0.1104	0.5610	9.8056	0.6369	0.5204
2		1.3357	16.5855	-0.0338	-0.8387	-0.1371	9.1540	-0.2158	-0.2950
3			9.1838	-1.1818	-2.1572	-1.3300	5.4770	-1.1617	-1.1947
4				-11.2095	-17.6429	-12.4028	-3.7656	-16.7468	-15.8643
5					-0.6207	-0.0853	7.1972	-0.0971	-0.1489
6						0.5524	10.7878	0.5046	0.4081
7							7.8327	-0.0292	-0.0878
8								-7.8281	-7.6909
9									-0.1218

Cuadro 20. Comparación de grupos experimentales mediante prueba de t de student con  $p < 0.05$ .      Igualdad entre grupos.

Al compararse cada grupo mediante la t de Student se aprecia igualdad entre casi todos los grupos a excepción de los grupos de los extractos acuosos, tanto de raíz, como de parte aérea (Cuadro 20).

Con esto se supone que el efecto de todos los extractos, excepto los acuosos, no son significativamente diferentes del efecto de la amoxicilina y el metronidazol, por lo que tienen buena actividad anti-*H. pylori*.

Concentración	125 µg/ml	62.5 µg/ml	31.25 µg/ml	15.625 µg/ml	7.8125 µg/ml	3.90625 µg/ml
250 µg/ml	1.8080	2.3403	1.7003	2.7948	5.5848	6.1822
125 µg/ml		0.5538	-0.0131	0.9873	1.9036	2.9826
62.5 µg/ml			-0.6214	0.3683	1.2833	2.4508
31.25 µg/ml				1.1399	1.8751	2.9817
15.625 µg/ml					0.9839	2.3061
7.8125 µg/ml						1.8330

Cuadro 21. Comparación de concentraciones utilizadas mediante prueba t de student con  $p < 0.05$   Igualdad entre concentraciones.  Diferencia entre concentraciones.

Al compararse cada concentración mediante la t de student se aprecia que las concentraciones de 250 µg/ml y 3.90625 µg/ml son diferentes a las demás concentraciones (Cuadro 21).

Esto quiere decir que cuando se usa una concentración alta (250 µg/ml) se pueden obtener porcentajes de inhibición significativamente más altos que en las demás concentraciones y cuando se utiliza una concentración baja (3.90625 µg/ml) los porcentajes de inhibición son significativamente menores a los de concentraciones mayores.

En el cuadro 18 se percibe en general que no existe diferencia significativa entre las concentraciones de 125, 62.5, 31.25, 15.625 y 7.8125 µg/ml a excepción de las diferencias entre la concentración de 7.8125 µg/ml con 125 y 31.25 µg/ml que pueden deberse a la desigualdad de observaciones que hubo por cada concentración.

Aunque ya existen pruebas de toxicidad donde se hace referencia a concentraciones mayores a las estudiadas en este trabajo, 1000 mg/kg de peso (Talakal, 1995 en Shah y Ahmad, 2009) y 42 mg/kg (Narasinhham *et al.*, 1984), el hecho de que se pueda demostrar una igualdad en la efectividad de la planta a diferentes concentraciones más bajas, es muy importante, porque no sería necesaria una dosis alta que pueda poner en peligro la salud del paciente y ésta sería tan efectiva como los antibióticos de referencia.

#### 7.4.2 Determinación de la CMI mediante método de dilución en agar.

Dado que los extractos acuosos de la raíz y de la parte aérea no mostraron efectos inhibitorios sobre *H. pylori* en el ensayo en cultivo líquido, se optó por evaluar sus efectos mediante al método de dilución en agar, de acuerdo a las recomendaciones del CLSI.

##### 7.4.2.1 Extracto acuoso de raíz.

En el agar sin extracto, es decir el control, crecieron colonias que se distribuyeron uniformemente. Aunque se esperaba la formación de un tapete, el crecimiento fue suficiente para ser comparado con los grupos experimentales. Los experimentos se realizaron en dos ocasiones distintas (Cuadros 22 y 23).

Con una concentración de 1000 µg/ml se observó una disminución del número de colonias. A concentraciones de 500 y 250 µg/ml se presentó crecimiento de colonias aisladas. En la concentración de 125 µg/ml hubo menor número de colonias, sin embargo, éstas eran de mayor tamaño (Fig. 40-42).

Extracto acuoso de raíz		
Concentración µg/ml	Crecimiento	Observaciones
0	+++	colonias distribuidas uniformemente
1000	+++	abundantes colonias aisladas
500	+++	abundantes colonias aisladas
250	+++	colonias aisladas
125	+++	mayor tamaño de las colonias, aunque en menor cantidad

Cuadro 22. Resultados de crecimiento para el extracto acuoso de raíz.

Extracto acuoso de raíz		
Concentración µg/ml	Crecimiento	Observaciones
0	+++	abundantes colonias que forman un tapete
1000	+	colonias aisladas
500	+++	abundantes colonias aisladas
250	+++	abundantes colonias aisladas
125	+++	abundantes colonias aisladas

Cuadro 23. Resultados de crecimiento para el extracto acuoso de raíz.

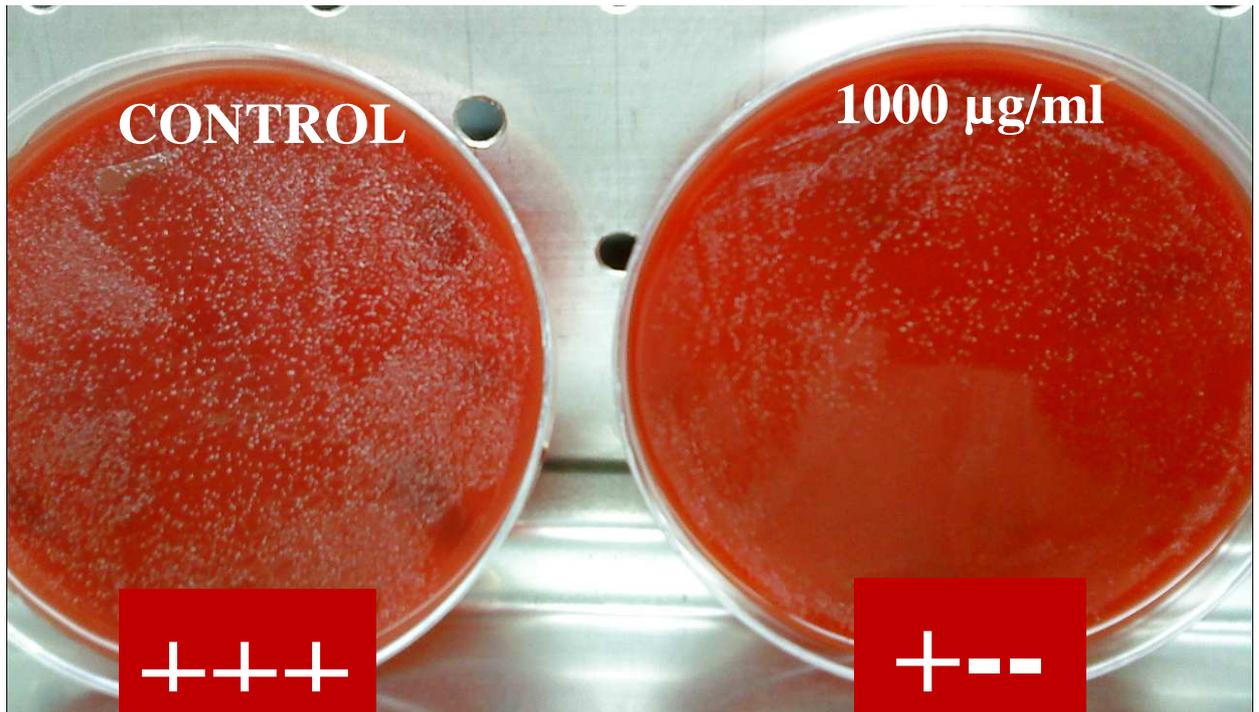


Fig. 40. Control negativo (izq.) y extracto acuoso de raíz 1000 µg/ml (dcha.)

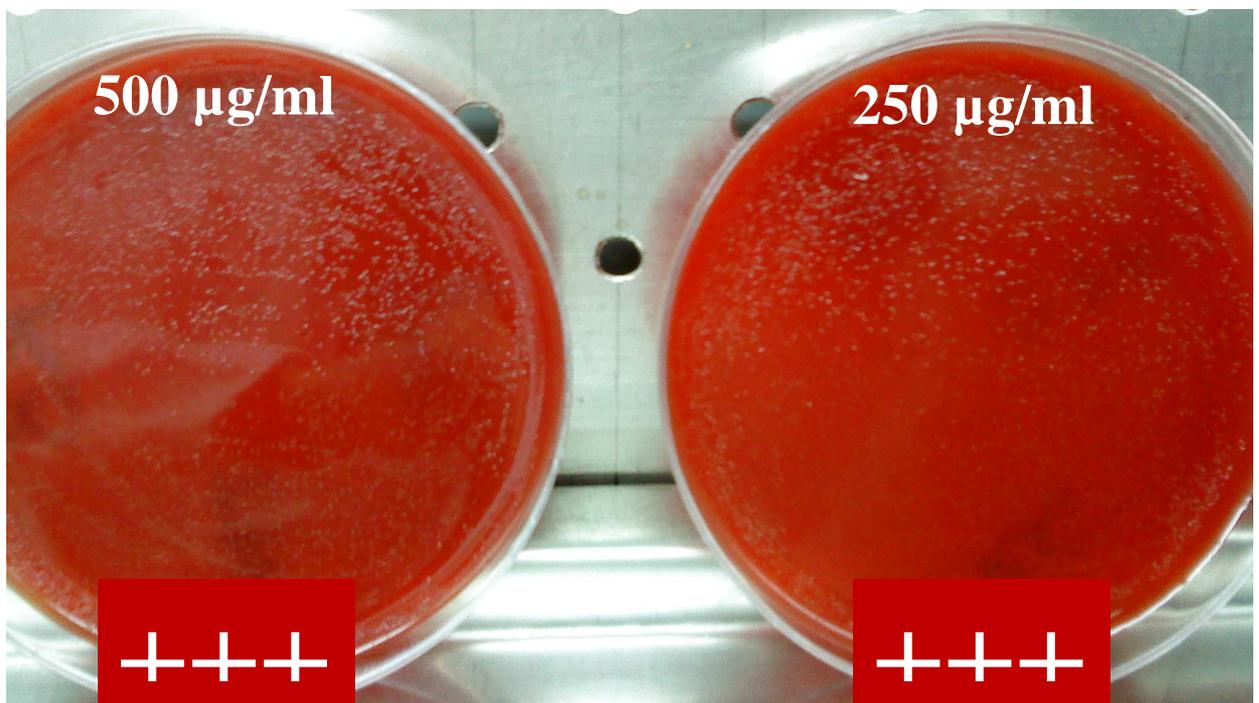


Fig. 41. Extracto acuoso de raíz 500 µg/ml (izq.) y 250 µg/ml (dcha.)

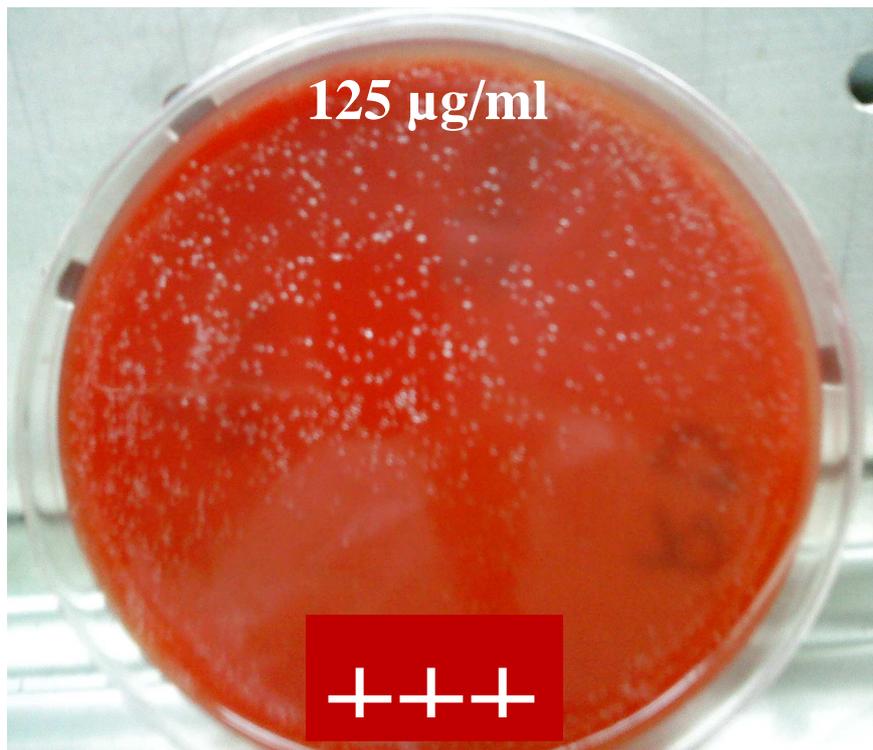


Fig. 42. Extracto acuoso de raíz 125 µg/ml

En presencia del extracto acuoso de raíz, el crecimiento de las colonias se percibió alterado, ya que éstas crecieron aisladamente y no de manera uniforme, como sucedió en el caso del control.

Las concentraciones más altas: 1000, 500 y 250 µg/ml, no permitieron el crecimiento normal de las colonias. La concentración de 125 µg/ml permitió un mayor crecimiento de las colonias, aumentando su tamaño.

El extracto acuoso de raíz no fue efectivo porque no inhibió el crecimiento de *H. pylori*.

#### 7.4.2.2 Extracto acuoso de parte aérea.

En el control negativo se presentó un crecimiento uniforme en toda la superficie del agar.

En las concentraciones de 1000 y 500  $\mu\text{g/ml}$  no se presentó crecimiento alguno, en la concentración de 250  $\mu\text{g/ml}$  se presentó crecimiento de algunas colonias aisladas, pero que solo fueron visibles a contra luz. Finalmente a la concentración de 125  $\mu\text{g/ml}$  crecieron pocas colonias aisladas (Cuadros 24 y 25 y Fig. 43-45).

Extracto acuoso de parte aérea		
Concentración $\mu\text{g/ml}$	Crecimiento	Observaciones
0	+++	colonias distribuidas uniformemente
1000	---	el agar se tornó color café
500	---	agar color café
250	+--	colonias aisladas vistas solo bajo luz
125	+++	colonias aisladas y pequeñas

Cuadro 24. Resultados de crecimiento para el extracto acuoso de parte aérea.

Extracto acuoso de parte aérea		
Concentración $\mu\text{g/ml}$	Crecimiento	Observaciones
0	+++	abundantes colonias que forman un tapete
1000	---	el agar se tornó color café
500	---	agar color café
250	+--	agar color café
125	++-	pocas colonias aisladas

Cuadro 25. Resultados de crecimiento para el extracto acuoso de parte aérea.

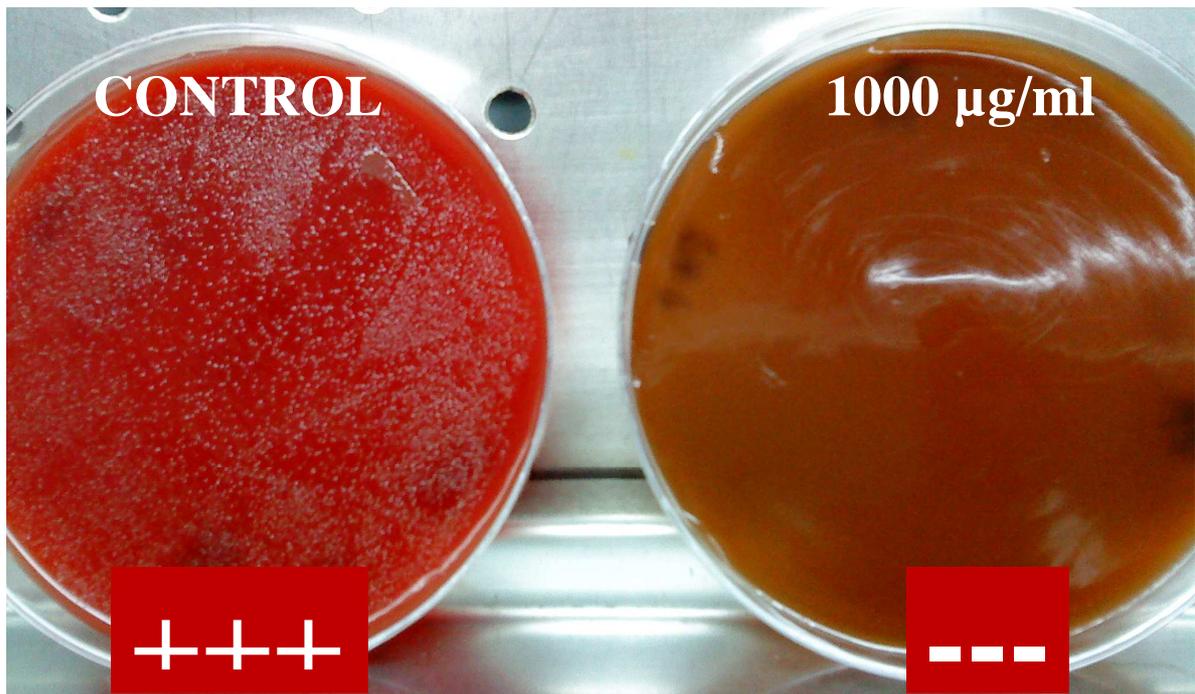


Fig. 43. Control negativo (izq.) y extracto acuoso de parte aérea 1000 µg/ml (dcha.)

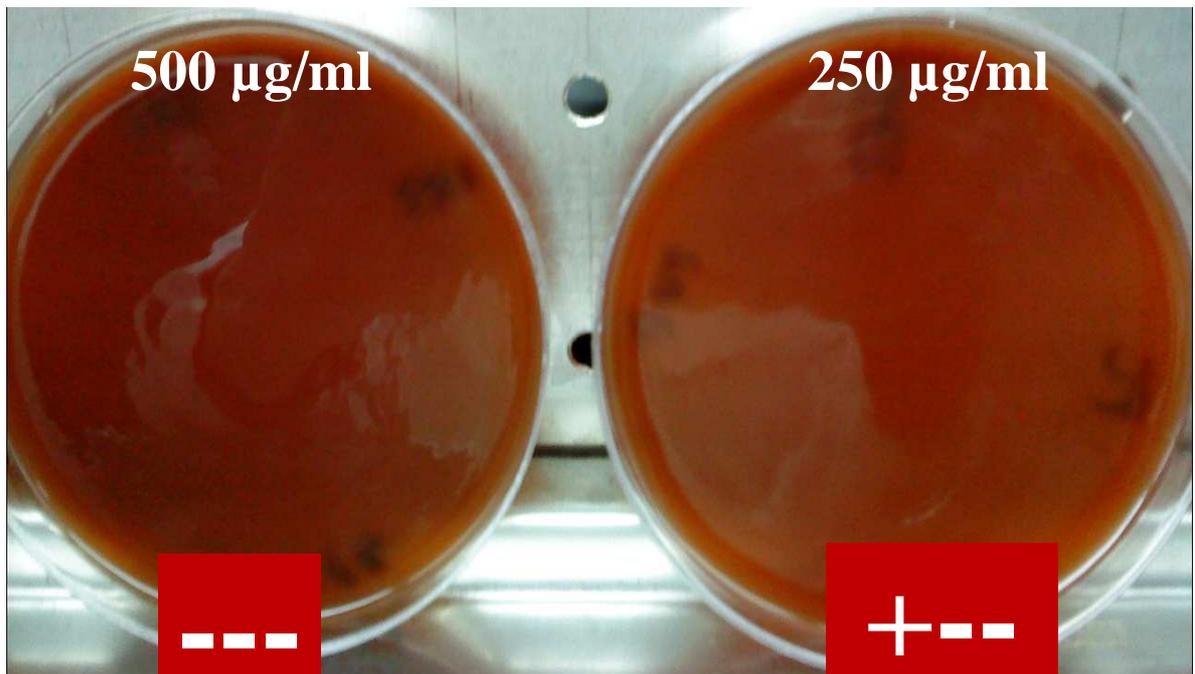


Fig. 44. Extracto acuoso de parte aérea 500 µg/ml (izq.) y 250 µg/ml (dcha.)

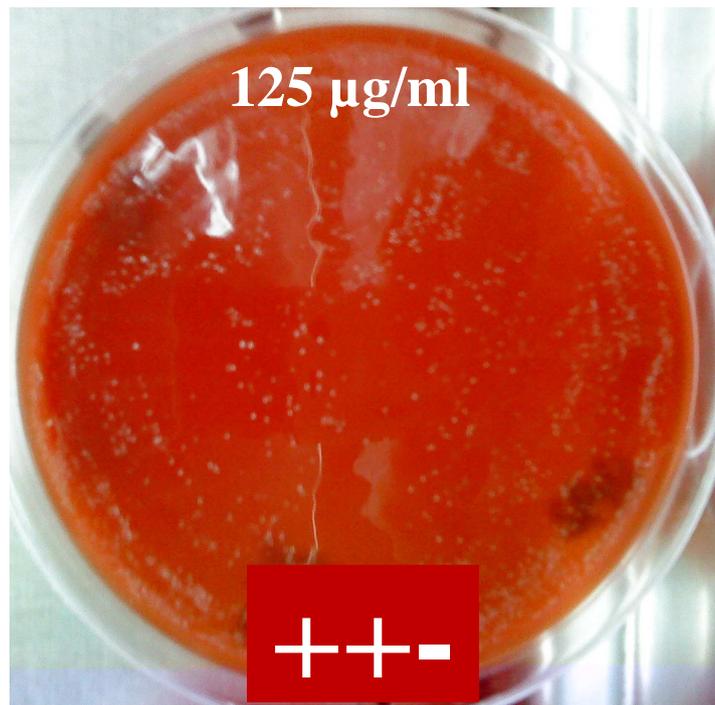


Fig. 45. Extracto acuoso de parte aérea 125 µg/ml

En las concentraciones de 1000, 500 y 250 µg/ml el agar cambió de color rojo a café, posiblemente éste extracto tiene alguna sustancia que reacciona con los componentes del medio de cultivo. Se pudo observar que la tonalidad del color café era proporcional a la concentración a la que se había diluido el extracto (Fig. 46).

A concentraciones altas (1000 y 500 µg/ml) existe cantidad suficiente de compuesto activo para inhibir completamente el crecimiento de *H. pylori*. A concentraciones menores (250 y 125 µg/ml) el extracto logra crear un ambiente estresante que dificulta el crecimiento de la bacteria.

El extracto acuoso de parte aérea fue efectivo porque inhibió el crecimiento de *H. pylori*, y su CMI es de 500 µg/ml. Se puede decir que su actividad es moderada de acuerdo a la clasificación de Castillo *et al.*, 2009.

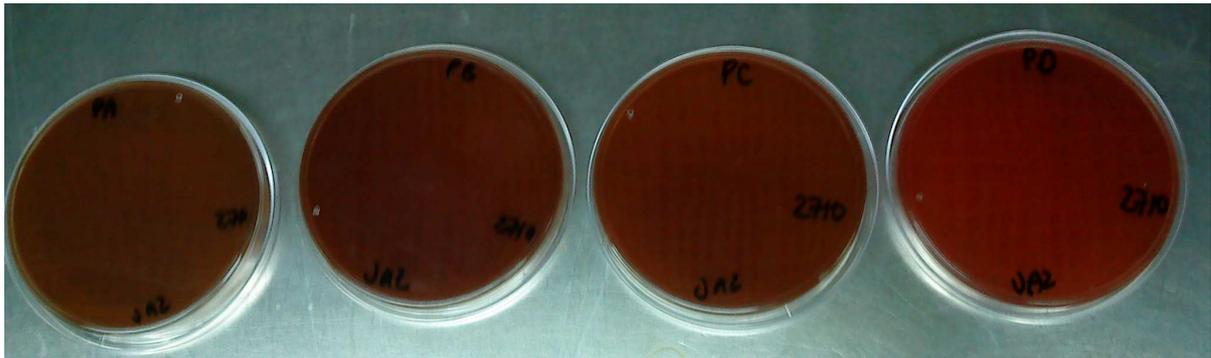


Fig. 46. Comparación de color en agares con extractos de parte aérea.

Aunque las dos pruebas *in vitro* empleadas (ensayo en cultivo líquido y método de dilución en agar) no son comparables, los resultados obtenidos se corresponden, ya que el extracto acuoso de raíz no resultó con actividad anti-*H. pylori* en ninguna de las dos pruebas, mientras que el extracto acuoso de parte aérea presenta inhibición del 100% a una concentración de 500  $\mu\text{g/ml}$  en el método de dilución en agar y una inhibición de 72.21 % a la concentración de 250  $\mu\text{g/ml}$ .

Los resultados obtenidos no concuerdan con la información etnobotánica, por lo que es probable que su modo de uso no elimine a la bacteria a la primera toma, sino que se trate de un efecto aditivo y se controle la población en las tomas posteriores.

Sin embargo, esta planta, en particular la parte aérea, es efectiva, por lo que se recalca la importancia de seguir el estudio de *P. hysterophorus*, buscar la técnica adecuada para obtener los extractos acuosos sin comprometer la integridad de los compuestos activos de éste; así como las dosis letales de los extractos, ya que se trata de una planta con actividad alelopática (Batish *et al.*, 2002; Kupchan *et al.*, 1971 en Das *et al.*, 2007; Reinhard *et al.*, 2006 en Belz, 2007) y es tóxica al contacto (Towers *et al.*, 1977 en Das *et al.*, 2007).

Es importante el desarrollo de un ensayo en un modelo animal, ya que es usual que los resultados varíen en pruebas *in vitro* e *in vivo*; y encontrar así una alternativa segura y eficaz en el tratamiento de la gastritis crónica activa asociada a *H. pylori*.

Se deben realizar, además, estudios fitoquímicos que muestren a el o los compuestos activos responsables de la actividad anti-*H. pylori* expresada en este estudio.

Con este estudio se invita a profundizar los conocimientos acerca de los recursos vegetales con los que contamos, además de valorar lo que ha heredado la medicina tradicional desde tiempos prehispánicos, así como a los pueblos que mantienen vivos dichos conocimientos.

También es importante valorar esta planta como recurso y la manera en la que puede ser aprovechado sustentablemente por los pueblos que acogen los conocimientos de la medicina tradicional mexicana.

## 8. Conclusiones.

- ❖ *Parthenium hysterophorus* es una planta herbácea, localizada en al menos 22 estados de la República Mexicana, predominantemente en la zona tropical, debido a su gran distribución, es conocida por muchos nombres comunes y distintos usos medicinales.
- ❖ Con el metanol se obtuvo mayor porcentaje de rendimiento de extracción, seguido del agua, el diclorometano y por último el hexano. Por tanto se puede decir que la planta en estudio tiene, en su mayoría, componentes polares.
- ❖ En el caso de la parte aérea, el metanol fue el solvente que obtuvo mayor rendimiento de extracción, después el agua, el diclorometano y el hexano.
- ❖ Los extractos hexánico, diclorometánico y metanólico de raíz fueron efectivos e inhibieron el crecimiento de *Helicobacter pylori*.
- ❖ El extracto acuoso de raíz no presentó actividad anti-*Helicobacter pylori*.
- ❖ Los cuatro extractos de parte aérea tuvieron un efecto inhibitorio en el crecimiento de la población de *Helicobacter pylori*.
- ❖ Solo los extractos hexánico, diclorometánico y metanólico, tanto de raíz como de parte aérea, presentaron un efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano sin diferencia significativa en relación a dos antibióticos de referencia.
- ❖ Se presenta a *Parthenium hysterophorus* como una planta con actividad anti-*Helicobacter pylori*.; y objeto de estudios posteriores para el desarrollo de una nueva alternativa de tratamiento contra la gastritis.

## 9. Literatura citada.

1. Águila B, Meneses R, González L, Madrigal E, Fernández D. Extracto acuoso de escoba amarga. Estudio preliminar de sus propiedades. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2000; 5(3):123-4.
2. Aguilar G, Ayala G, Fierros Z G. Helicobacter pylori: Recent advances in study of its pathogenicity and prevention. Salud Pública Méx. 2001; 43(3):237-247.
3. Argueta V A, Cano L M, Rodarte M E (Coor.) Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. México. Instituto Nacional Indigenista. 1994. Vol 1. 583 p
4. Bajwa R A, Khalid T, Cheema S. Antifungal activity of allelopathic plant extracts III: Growth response of some pathogenic fungi to aqueous extract of Parthenium hysterophorus. Journal of Plant Pathology. 2003; 2(3):145-56.
5. Batta A K, Xu G, Honda A, Miyazaki T, Salen G. Stigmasterol reduces plasma cholesterol levels and inhibits hepatic synthesis and intestinal absorption in the rat. Metabolism Clinical and Experimental. 2006; 55(3):292-9.
6. Batish D R, Singh H P, Kohli R K, Saxena D B, Kaur S. Allelopathic effects of parthenin against two weedy species, Avena fatua and Bidens pilosa. Environmental and Experimental Botany. 2002. 47(2):149-55.
7. Belz G R. Stimulation versus inhibition. Bioactivity of parthenin, a phytochemical from Parthenium hysterophorus L. Dose-Response. 2008; 6(1):80-96.
8. Bendesky A, Menéndez D. Metronidazol: una visión integral. Revista de la Facultad de Medicina, UNAM. 2001; 44(6):255-9.
9. Blaser M, Artheron J. Helicobacter pylori persistence: biology and disease. Journal of Clinical Investigation. 2004; 113(3):321-8.
10. Blecker U, Lanciers S, Hauser B, Vandenplas Y. Diagnosis of Helicobacter pylori infections in adults and children by using the malakit Helicobacter pylori, a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of Clinical Microbiology. 1993; 31(7):1770-3.
11. Boer A W, Tytgat G N J. Treatment of Helicobacter pylori infection. British Medical Journal. 2000; 320(7226):31-4.
12. Bucciarelli A, Skliar M I. Medicinal plants from Argentina with gastro protective activity. Ars Pharmaceutica. 2007; 48(4):361-9.
13. Campo S M A, Zullo A, Hassan A, Morini S. Antibiotic treatment strategies for Helicobacter pylori infection. Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery. 2007; 2:11.7.

14. Caraballo A, Caraballo B, Rodriguez A. Preliminary assessment of medicinal plants used as antimalarials in the southeastern Venezuelan amazon. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2004; 37(2):186-8.
15. Castillo J I, Romero I. Plantas con actividad anti-*Helicobacter pylori*: una revisión. Boletín de la Sociedad Botánica Mexicana. 2007; 80:35-61
16. Castillo J I, Rivero F C, Celis H, Romero I. Anti- *Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphiterygium adstringens*. Journal of Ethnopharmacology. 2007; 114(1):72-7
17. Castillo J I, González V, Jaime A H, Martínez G, Linares E, Bye R, Romero I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. Journal of Ethnopharmacology. 2009; 122(2):402-5.
18. Cervantes G E. *Helicobacter pylori* e infecciones asociadas. Revista de la Facultad de Medicina, UNAM. 2006; 49(4):163-8.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement M100-S15. 2005; 25(1): 167 p.
20. Das B, Venkataiah B, Kashinatham A. (+) - Syringaresinol from *Parthenium hysterophorus*. Fitoterapia. 1999; 70(1):101-2.
21. Das B, Saidi R V, Krishnaiah M, Sharma A V S, Ravi K K, Rao V, Sridhar V. Acetylated pseudoguanaiolides from *Parthenium hysterophorus* and their cytotoxic activity. Phytochemistry. 2007; 68(15):2029-34.
22. Das B, Ravinder R K, Ravikanth B, Subrahmanya S A V, Sridhar B. Two new pseudoguanaiolides from the flowers of *Parthenium hysterophorus*. Helvetica Chimica Acta. 2008; 91(6):1137-43.
23. Domínguez X A. Métodos de Investigación fitoquímica. México. Limusa.1973. 281 p
24. Elorza P T H. Estadística para las ciencias sociales, del comportamiento y de la salud. México D.F. 3° ed. CENGAGE Learning. 2009. p 340-1.
25. Falagas M E, Gorbach S L. Clindamicina y metronidazol en: Tratamiento antimicrobiano. Parte II Clínica Médica de Norteamérica. Interamericana.1995. 823-44.
26. Farquhar J W, Smith R E, Dempsey M E. The effect of Beta Sitosterol on the serum lipids of young men with arteriosclerotic heart disease. Circulation. 1956; 14(1):77-82.

27. Gerrits M M, van Vliet A H, Kuipers E J, Kuster J G. Helicobacter pylori and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. The Lancet Infectious Diseases. 2006; 6(11): 699-709.
28. Granberg C, Mansikka A, Lehtonen O P, Kujari H, Grönfors R, Nurmi H, Räihä I, Stahlberg M R, Leino R. Diagnosis of Helicobacter pylori infection by using Pyloriset (EIA-G) and EIA-A for detection of serum immunoglobulin G (IgG) and IgA antibodies. Journal of Clinical Microbiology. 1993; 31(6):1450-3.
29. Gundián G P J, Barreto P J, Rodríguez R M A, Pino A P P, Lim A N. Macrólidos. Acta Médica. 1998; 8(1):71-4.
30. International Agency for Research on Cancer. Schistosomes, Liver Flukes and Helicobacter pylori. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. World Health Organization. 1994; 61:270 p.
31. Keith S J, Westran R P. Clinical Bacteriology. USA. Masson S.A. 2003. 192 p.
32. Kusters J G, Vliet A H M, Kuipers E J. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. Clinical Microbiological Reviews. 2006; 19(3):449-90.
33. Lan W. Effect of chlorogenic acid on antioxidant activity of Flos lonicerae extracts. Journal of Zhejiang University- Science B. 2007; 8 (9):673-9.
34. López A G. Gastritis. Medicine. 1992; 6(2):73-85.
35. Maharjan S, Shrestha B B, Jha P K. Allelopathic effects of aqueous extract of leaves of Parthenium hysterophorus L. on seed germination and seedling growth of some cultivated and wild herbaceous species. Scientific world. 2007. 5(5):33-9.
36. Martínez M. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. México. Fondo de Cultura Económica.1987. 1247 p
37. Martínez M. Las plantas Medicinales de México. México. 5° ed. Botas. 1969. p 68-9
38. Miquel D B, Argila C M. Tratamiento de la infección por Helicobacter pylori. Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud. 2000; 24(6): 141-6.
39. Moreno A. Infecciones por Campylobacter sp de Enfermedades producidas por bacterias en: Farreras. Rozman. Medicina Interna. Madrid.12° ed. Doyma. 1992. p 2271-2.
40. Morris A, McIntyre D, Rose T, Nicholson G. 1986. Rapid diagnosis of Campylobacter pyloridis gastritis. The Lancet. 327(8473):149
41. Narasimham T R, Keshava M B S, Harindranath N, Subba R P V. Characterization of a toxin from Parthenium hysterophorus and its mode of excretion in animals. Journal of Bioscience.1984; 6(5):729-38

42. Osman H E, Maalej N, Shanmuganayagam D, Folts J D. Grape juice but not orange or grapefruit juice inhibits platelet activity in dogs and monkeys (*Macaca fascicularis*). Journal of Nutrition. 1998; 128(12):2307-12.
43. Pajares G J M, Pajares V R, Gisbert J P. *Helicobacter pylori* infection: antibiotic resistance. Revista Española de Enfermedades Digestivas. 2007; 99(2):63-70.
44. Parkin D M, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. A Cancer Journal for Clinicians. 1999; 49(1):33-64.
45. Patel V S, Chitra V, Lashkmi P L, Krishnaraju V. Hypoglycemic effect of aqueous extract of *Parthenium hysterophorus* L. in normal and alloxan induced diabetic rats. Indian Journal of Pharmacology. 2008; 40(4):183-5.
46. Piqué J M Gastritis. en: Farreras V P, Rozman C. Medicina Interna. Madrid. 12<sup>o</sup> ed. Doyma. 1992. p 70-6.
47. Prescott L, Harley J, Klein D. Microbiología. Madrid. 5<sup>o</sup> ed. Mc Graw Hill. 2004. 1240 p
48. Ravanel P, Tissut M, Douce R. Effects of kaempferol on the oxidative properties of intact plant mitochondria. Plant Physiology. 1982; 69(2):375-8.
49. Rieder G, Fischer W, Haas R. Interaction of *Helicobacter pylori* with host cells: function of secreted and translocated molecules. Current Opinion in Microbiology. 2005; 8(1):67-73.
50. Rodríguez R M A, Gundián G P J, Barreto P J, Lim A N, Areu A, Pardo N A. Tetraciclinas. Acta Médica. 1998; 8(1):75-9
51. Rodríguez P M, Martínez J M, Rivero R L, Álvarez H M H, Valdez A F C, Rodríguez D A, Lizama R S, Payrol J A. Evaluación de la actividad antimalárica de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional cubana. Revista de Ciencias farmacéuticas básica e aplicada. 2006; 27(3):197-205.
52. Rodríguez W, Pareja C A, Yushimito L, Ramírez R A, Gilman H R, Watanabe Y J, Rodríguez U C, Mendoza R D, Guerra V J, Leey C J, Chinga A E, Velapatiño B, Valencia T. Tratamiento del *Helicobacter pylori* con Omeprazol, Amoxicilina y Claritromicina en esquemas de 7 y 10 días. Revista de Gastroenterología del Perú. 2003; 23(3):177-83.
53. Rüesch H, Mabry T J. The isolation and structure of Tetraneurin- A, a new pseudoguaianolide from *Parthenium alpinum* var *tetraneuris* (compositae). Tetrahedron. 1969; 25(4):805-11.

54. Sánchez R J F, Islas P V, Tejeda M R E, Koch W, Mora G J L A, Hernández A. V, Sánchez G E G. El *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*, un legado farmacéutico del colegio de la Santa Cruz de Tlatelolco. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 2007; 38(4):30-6.
55. Serna C L, Cravioto J. Estadística simplificada. Para la investigación en ciencias de la salud. México D. F. 1° ed. Trillas. 1991. 438 p.
56. Shah K M, Ahmad S. Pharmacognostical, Phytochemical, Biological and Tissue Culture Studies on *Parthenium hysterophorus* Linn: A Review. The Internet Journal of Alternative Medicine. 2009; 6 (2)
57. Shan J, Xuan Y, Zheng S, Dong Q, Zhang S. Ursolic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of HT-29 colon cancer cells by inhibiting the EGFR/MAPK pathway. Journal of Zhejiang University- Science B. 2009; 10(9):668-74.
58. Shen M C, Rodriguez E, Kerr K, Mabry T J. Flavonoids of four species of *Parthenium* (Compositae). Phytochemistry. 1976; 15(6):1045-7.
59. Spiegel M R. Teoría y problemas de probabilidad y estadística. México D.F.1° ed. Mc Graw Hill. 1976. p 306-38.
60. Tapas A R, Sakarkar D M, Kakde R B. Flavonoids as nutraceuticals: A review. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2008; 7(3):1089-99.
61. The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Botanical Journal of the Linnean Society. 2003; 141(4):399-436.
62. Van de Wouw B A, de Boer W A, Jansz A R, Roymans R T, Staals A T. Comparison of three commercially available enzyme-linked immunosorbent assays and biopsy-dependent diagnosis for detecting *Helicobacter pylori* infection. Journal of Clinical Microbiology. 1996; 34(1):94-7
63. Venkataiah B, Ramesh C, Ravindranath N, Das B. Charminarone, a *secopseudoguaianolide* from *Parthenium hysterophorus*. Phytochemistry. 2003. 63(4):383-6.
64. Viesca T C. Usos de las plantas medicinales mexicanas. Arqueología mexicana. 1999. 7(39). 30-5.
65. Villarreal Q J A. Malezas de Buenavista, Coahuila. Saltillo. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro". 1983. 271 p.
66. Villaseñor J, Espinosa F. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y México, D.F. Fondo de Cultura Económica, 1998.

67. Villate G M, Vento D D, Mederos M D, Rodríguez Y, Chala R S. Efecto Biológico de extractos de hojas, flores y raíces de *Parthenium hysterophorus* L. sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith. CIGET Pinar del Río. 2006; 8 (1). (<http://www.ciget.pinar.cu/No.2006-1/efecto.htm>)

68. World Health Organization. The promotion and development of traditional medicine. Technical Report Series. Report of a WHO meeting. Geneva. 1978. 44 p.

69. Yoshiyama H, Nakazawa T. Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. Microbes and infection. 2000; 2 (1):55-60.

70. Erilim Extracto:

<http://www.erilim.com/productos/extracto.html> ( 9 de febrero de 2010)

71. Malezas de México:

<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/parthenium-hysterophorus/fichas/pagina1.htm> ( 30 de enero de 2010)

72. Gobierno de la provincia de Misiones, Argentina:

[http://www.misiones.gov.ar/salud/index.php?option=com\\_content&task=view&id=13&Itemid=7](http://www.misiones.gov.ar/salud/index.php?option=com_content&task=view&id=13&Itemid=7) ( 2 de noviembre de 2008)

73. Municipios de México:

<http://www.e-mexico.gob.mx/work/EMM04/Veracruz/mpios/30033a.htm> ( 22 de octubre de 2008)

74. Naturamar:

<http://www.naturamar.com.mx/pdf/fito/ulsin.pdf> (18 de mayo de 2010)

75. Red Mundial de Información sobre Biodiversidad:

[http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/remib\\_esp.html](http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/remib_esp.html) ( 5 febrero de 2009)

76. Vademécum de Genéricos Intercambiables:

[http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi\\_2k8/](http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/) (10 de febrero de 2010)

77. Vademécum, Instituto Químico Biológico:

<http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/r004.htm> (10 de febrero de 2010)

78. World Diabetes Foundation:

<http://www.worlddiabetesfoundation.org/composite-35.htm> ( 3 de febrero de 2010)

## 10. Anexo

Experimentos realizados en el ensayo de cultivo líquido.

Extractos de raíz.

- Hexánico

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Promedio	% crecimiento	% inhibición
Control	0	0.852	100%	0
HEXANO				
C	125	-0.037	-4.34%	104.34%
D	62.5	-0.081	-9.51%	109.51%
E	31.25	-0.110	-12.91%	112.91%
F	15.625	-0.086	-10.09%	110.09%

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Promedio	% crecimiento	% inhibición
Control	0	0.745	100%	0
HEXANO				
E	31.25	-0.117	-15.70%	115.70%
F	15.625	-0.105	-14.09%	114.09%
G	7.8125	0.150	20.13%	79.87%
H	3.90625	0.302	40.54%	59.46%

- Con diclorometano

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Promedio	% crecimiento	% inhibición
Control	0	0.852	100	0
DICLOROMETANO				
C	125	-0.056	-6.57%	106.57%
D	62.5	-0.097	-11.38%	111.38%
E	31.25	-0.091	-10.68%	110.68%
F	15.625	0.062	7.28%	92.72%

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Promedio	% crecimiento	% inhibición
Control	0	0.745	100	0
DICLOROMETANO				
E	31.25	-0.119	-15.97%	115.97%
F	15.625	0.063	8.46%	91.54%
G	7.8125	0.237	31.81%	68.19%
H	3.90625	0.248	33.29%	66.71%

- Metanólico

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Promedio	% crecimiento	% inhibición
Control	0	0.852	100	0
METANOL				
B	250	-0.121	-14.20%	114.20%
C	125	-0.095	-11.15%	111.15%
D	62.5	0.233	27.35%	72.65%
E	31.25	0.682	80.05%	19.95%

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Promedio	% crecimiento	% inhibición
Control	0	0.745	100%	0%
METANOL				
B	250	-0.109	-14.63%	114.63%
C	125	-0.125	-16.78%	116.78%
D	62.5	0.137	18.39%	81.61%
E	31.25	0.461	61.88%	38.12%

- Acuoso

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Promedio	% crecimiento	% inhibición
Control	0	0.852	100	0
AGUA				
C	125	0.857	100.59%	-0.59%
D	62.5	0.823	96.60%	3.40%
E	31.25	0.746	87.59%	12.41%
F	15.625	0.816	95.77%	4.23%

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Promedio	% crecimiento	% inhibición
Control	0	0.745	100%	0%
AGUA				
E	31.25	0.815	109.40%	-9.40%
F	15.625	0.728	97.72%	2.28%
F1	15.625	0.782	105.00%	-5.00%
G1	7.8125	0.553	74.22%	25.78%

Extractos de parte aérea

- Hexánico

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Promedio	% crecimiento	% inhibición
Control	0	0.662	100%	0%
HEXANO				
B	250	-0.118	-17.82%	117.82%
C	125	-0.131	-19.79%	119.79%
D	62.5	-0.133	-20.09%	120.09%
E	31.25	-0.105	-15.86%	115.86%

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Promedio	% crecimiento	% inhibición
Control	0	0.724	100%	0%
HEXANO				
E	31.25	-0.097	-13.40%	113.40%
F	15.625	0.031	4.28%	95.72%
G	7.8125	0.242	33.42%	66.58%
H	3.90625	0.710	98.07%	1.93%

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Promedio	% crecimiento	% inhibición
Control	0	0.83	100%	0%
HEXANO				
E	31.25	-0.091	-10.96%	110.96%
F	15.625	0.037	4.46%	95.54%

- Con diclorometano

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Promedio	% crecimiento	% inhibición
Control	0	0.662	100%	0
DICLOROMETANO				
B	250	0.032	4.83%	95.17%
C	125	-0.042	-6.34%	106.34%
D	62.5	-0.103	-15.56%	115.56%
E	31.25	-0.136	-20.54%	120.54%

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Promedio	% crecimiento	% inhibición
Control	0	0.724	100%	0%
DICLOROMETANO				
E	31.25	-0.144	-19.89%	119.89%
F	15.625	-0.105	-14.50%	114.50%
G	7.8125	0.078	10.77%	89.23%
H	3.90625	0.402	55.52%	44.48%

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Promedio	% crecimiento	% inhibición
Control	0	0.83	100%	0%
DICLOROMETANO				
E	31.25	-0.109	-13.13%	113.13%
F	15.625	0.004	0.48%	99.52%
G	7.8125	0.196	23.61%	76.39%

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Promedio	% crecimiento	% inhibición
Control	0	0.865	100%	0%
DICLOROMETANO				
E	31.25	-0.089	-10.29%	110.29%
F	15.625	0.020	2.31%	97.69%

- Metanólico

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Promedio	% crecimiento	% inhibición
Control	0	0.662	100%	0%
METANOL				
B	250	-0.092	-13.90%	113.90%
C	125	-0.085	-12.84%	112.84%
D	62.5	-0.128	-19.34%	119.34%
E	31.25	-0.124	-18.73%	118.73%

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Promedio	% crecimiento	% inhibición
Control	0	0.724	100%	0%
METANOL				
E	31.25	-0.104	-14.36%	114.36%
F	15.625	0.157	21.69%	78.31%
G	7.8125	0.421	58.15%	41.85%
H	3.90625	0.345	47.65%	52.35%

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Promedio	% crecimiento	% inhibición
Control	0	0.83	100%	0%
METANOL				
E	31.25	-0.127	-15.30%	115.30%
F	15.625	0.014	1.69%	98.31%

- Acuoso

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Promedio	% crecimiento	% inhibición
Control	0	0.662	100%	0%
AGUA				
B	250	0.184	27.79%	72.21%
C	125	0.288	43.50%	56.50%
D	62.5	0.418	63.14%	36.86%
E	31.25	0.494	74.62%	25.38%

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Promedio	% crecimiento	% inhibición
Control	0	0.724	100%	0%
AGUA				
C	125	0.636	87.84%	12.16%
D	62.5	0.641	88.54%	11.46%
E	31.25	0.712	98.34%	1.66%
F	15.625	0.545	75.28%	24.72%

- Amoxicilina

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Promedio	% crecimiento	% inhibición
Control	0	0.724	100%	0%
AMOXICILINA				
a	0.1	0.003	0.41%	99.59%
b	0.05	-0.041	-5.66%	105.66%
c	0.01	0.005	0.69%	99.31%
d	0.005	0.125	17.27%	82.73%

➤ Metronidazol

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Promedio	% crecimiento	% inhibición
Control	0	0.830	100%	0%
METRONIDAZOL				
a	400	-0.058	-6.99%	106.99%
b	300	-0.048	-5.79%	105.79%
c	200	0.012	1.45%	98.55%
d	100	0.182	21.92%	78.08%