

## ACTIVIDAD ANTI-*Helicobacter pylori* DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Artemisia ludoviciana*

Barrón González MP\*, Medrano Cosme AE, Leal López KI, Eguarte Lara DJ, Cuellar Guevara FL, Quiñones Gutiérrez Y, Rodríguez Garza R.

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Ciudad Universitaria, Pedro de Alba S/N, CP: 66455. Monterrey, Nuevo León, México. \*maria.barrongn@uanl.edu.mx

### RESUMEN:

*Helicobacter pylori* es un patógeno causante de padecimientos gastrointestinales como gastritis, úlceras, y en algunos casos cáncer de estómago. Debido a que los tratamientos indicados contra la sintomatología ocasionan efectos secundarios, y a la resistencia por parte de la bacteria contra los antibióticos, se ha optado por buscar nuevos compuestos activos que puedan erradicar a *H. pylori*. Las investigaciones se han enfocado en las plantas, que por muchos años se han utilizado dentro de la medicina tradicional contra padecimientos gastrointestinales, ya que poseen metabolitos que actúan como antimicrobianos. En este trabajo se evaluó la actividad biológica del extracto metanólico de *Artemisia ludoviciana*, en comparación con la droga ceftriaxona, la cual inhibe en su totalidad a la bacteria, mientras que el extracto de *A. ludoviciana* presenta actividad inhibitoria sobre *H. pylori*. Previamente se realizó el análisis fitoquímico y tóxicológico de dicho extracto, mostrando moderada toxicidad frente a *Artemia salina*. Además, posee metabolitos secundarios tales como alcaloides, sesquiterpenlactonas, saponinas, esteroides, triterpenos y flavonoides, siendo quizá éstos los responsables de su actividad antimicrobiana. Por último, se evaluó su capacidad antioxidante, resultando que el extracto metanólico de *A. ludoviciana* posee actividad antioxidante..

**Palabras clave:** *Artemisia ludoviciana*, *Helicobacter pylori*, *Artemia salina*

### ABSTRACT:

*Helicobacter pylori* is a causative agent of gastrointestinal diseases such as gastritis, ulcers, and in some cases stomach cancer. Because the treatments indicated against the symptoms cause side effects, and the resistance of the bacteria against antibiotics, it has been decided to look for new active compounds that can eradicate *H. pylori*. Research has focused on plants, which for many years have been used in traditional medicine against gastrointestinal diseases, as they have metabolites that act as antimicrobials. In this work, the biological activity of the methanolic extract of *Artemisia ludoviciana* was evaluated, in comparison with the drug ceftriaxone, which inhibits the bacterium in its entirety, while the extract of *A. ludoviciana* shows inhibition of the activity on *H. pylori*. Previously, the phytochemical and toxic analysis of said extract was carried out, showing moderate toxicity against *Artemia salina*. In addition, it has secondary metabolites such as alkaloids, sesquiterpenlactones, saponins, sterols, triterpenes and flavonoids, as well as those responsible for its antimicrobial activity. Finally, antioxidant capacity was evaluated, resulting that the methanolic extract of *A. ludoviciana* has antioxidant activity..

**Key Words:** *Artemisia ludoviciana*, *Helicobacter pylori*, *Artemia salina*

**Área:** Microbiología y biotecnología.

## INTRODUCCIÓN

*Helicobacter pylori* es un bacilo gram negativo, curvo o espirilado, microaerófilo, que mide de 2 a 3 nm por 3.5 por 0.5 nm de ancho y posee seis flagelos unipolares que le dan gran movilidad. Esta bacteria coloniza el estómago del 70 al 80% de la población en países en desarrollo y su presencia incrementa el riesgo de padecer gastritis, úlcera péptica y/o cáncer gástrico (Majalca *et al.* 2001).

Se han encontrado factores de virulencia de la bacteria que influyen en el desarrollo de dichos padecimientos tales como adhesinas, flagelos lofotricos, la presencia de CagA, VacA, la enzima ureasa, hemolisinas, b-catenina, gastrina, mucinasa, catalasa y lipasa, pudiendo también influir aspectos medioambientales y propios del hospedero (área geográfica, genética, sistema inmune, edad, raza, alimentación, estatus socioeconómico, entre otros) (Graham *et al.* 1991; Segal *et al.* 2001).

Existen diferentes terapias que han sido prescritas para el tratamiento de *H. pylori* con diferentes combinaciones de agentes terapéuticos tales como antibióticos, bismuto e inhibidores de la bomba de protones, encontrándose como primeras opciones, la terapia triple estándar, la terapia secuencial y la terapia concomitante o cuádruple (Sierra *et al.* 2014).

Sin embargo, la resistencia emergente de dicho microorganismo a los antibióticos utilizados, especialmente omeprazol, claritromicina y metronidazol, limita su uso en el tratamiento de infecciones en países desarrollados, y

más aún, en países en vías de desarrollo (Lind *et al.* 1999). El crecimiento de la resistencia a los antibióticos y las complicaciones específicas, son los mayores problemas de las medicinas utilizadas, los cuales demandan la búsqueda de nuevos compuestos, especialmente de fuentes naturales, como lo son las plantas medicinales (Zahra *et al.* 2011).

Tanto la OMS, como los Centros de Prevención y Control de Enfermedades (CDC), han reconocido esta necesidad y dentro de sus estrategias para enfrentar el problema mundial que representan los microorganismos causantes de importantes enfermedades, han definido una en la que se propone el desarrollo de nuevos antibióticos, señalando que en el reino vegetal es posible encontrar moléculas que cumplan con los requisitos químicos y fisiológicos para igualar el mecanismo de acción de los productos antibióticos que se necesitan para la población (Fauci 1998; Mitscher 1975).

A la fecha se han aislado un gran número de compuestos procedentes de organismos vegetales y se estima que constituyen tan sólo el 10% de los metabolitos secundarios (Schultes 1978). Entre estos se encuentran fenoles, quinonas, taninos, cumarinas, flavonas y alcaloides. Un porcentaje importante posee cierta actividad frente a los microorganismos (Domingo y López 2003).

Actualmente, a nivel mundial se reporta cada vez más una gran variedad de compuestos y agentes provenientes de fuentes naturales con actividad antimicrobiana, y específicamente se ha demostrado el potencial que tienen estos metabolitos secundarios para inhibir a *H. pylori* de manera *in vitro*, destacándose flavonoides, taninos, cumarinas, terpenos, quinolonas y alcaloides. Sin embargo, sólo a muy pocos de ellos se les ha demostrado que mantienen su actividad *in vivo* (Palacios *et al.* 2011).

La presente investigación se enfocó en la evaluación de la actividad antimicrobiana sobre *H. pylori*, de extractos metanólicos de *Artemisia ludoviciana*, se determinó la actividad toxicológica sobre *Artemia salina* y la actividad antioxidante.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

- a) *Helicobacter pylori* #43504 fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC).
- b) *Artemia salina*. Los huevecillos de *A. salina* (Brine Shrimp Eggs San Francisco Bay Brand INC), fueron adquiridos en Petco, EUA.
- c) Material vegetal: *Artemisia ludoviciana*: se obtuvo en el mercado popular del municipio de Matehuala, San Luis Potosí, el cual se encuentra ubicado en la parte norte del estado, en la zona altiplano, la cabecera municipal tiene las siguientes coordenadas: 100°39" de longitud oeste y 23°39" de latitud norte, con una altura de 1,570 metros sobre el nivel del mar. Sus límites son: al norte Cedral, al este Nuevo León, al Sur Villa de Guadalupe, al oeste Villa de Guadalupe y Villa de la Paz. En este municipio predomina el clima seco semicálido. En la parte extrema noroeste, tiene una pequeña franja de clima seco templado. La temperatura media anual es de 19.3 °C y una precipitación pluvial de 450 mm. Su vegetación consta de matorral desértico, matorral espinoso, nopalera, izotal, magueyal, cardonal y pastizal (<http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM24sanluispotosi/index.html>) accesado 23 de noviembre de 2016). El procesamiento para la obtención del extracto metanólico se describe en la Tabla I.

**Tabla I.** Etapas del procesamiento de *A. ludoviciana* para la obtención de los extractos metanólicos

Etapa	Procedimiento
Lavado	Se enjuagó el material vegetal al chorro de agua corriente, hasta eliminar cualquier residuo ajeno al material vegetativo.
Extracción	La obtención del extracto metanólico a partir de la planta, se realizó agregando a matraces Erlenmeyer, trozos o partes de la planta y posteriormente se agregó metanol absoluto hasta cubrir. Estos matraces se cubrieron con papel plástico transparente y se mantuvieron en agitación constante durante 7 días, en condiciones a temperatura ambiente.
Filtración	Después de los 7 días, se filtró lo contenido en cada matraz, por medio de papel

	filtro Whatman No 1.
Concentración del extracto	El solvente (metanol) se destiló con ayuda de un rotavapor Buchi, a 64°C (temperatura de ebullición del metanol). Se obtuvo el extracto concentrado, el cual se colocó en un vaso de precipitado Pyrex® y enseguida se colocó en la estufa a una temperatura de 37°C, para su completo secado, posteriormente el extracto se raspó, se almacenó en un frasco ámbar y se conservó en las mismas condiciones de temperatura.

**a) Preparación de la solución madre o solución stock del extracto metanólico.**

Se disolviendo una cantidad conocida del extracto metanólico obtenido, en cierto volumen de metanol hasta saturación, y a partir de esta solución madre, se realizaron los cálculos necesarios para obtener la concentración deseada en cada experimento. Una vez preparada la solución madre, se esterilizó por filtración empleando filtros Millipore de 0.22 µm. Enseguida se tomó una alícuota y se colocó en medio de cultivo Brucella, se incubó a 37°C por 24 h y una vez obtenida la prueba de esterilidad positiva, se procedió a su utilización.

**e) Perfil fitoquímico de los extractos metanólicos**

Al extracto metanólico se le realizó un análisis fitoquímico de acuerdo con Domínguez, 1973; con la finalidad de identificar sus componentes químicos. Las pruebas se realizaron en placas de cerámica de 9 y 12 pozos, tomando alícuotas provenientes de la solución madre del extracto.

***Helicobacter pylori***

Mantenimiento del cultivo: La cepa de *H. pylori* (ATCC 43504) se obtuvo del cepario del Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Genética; conservada y mantenida en refrigeración. Para su uso, se requirió su activación en el medio de cultivo caldo Brucella, incubado por 24 h a 37°C, repitiendo este procedimiento durante tres días.

Cinética de crecimiento: Se prepararon 27 tubos que contenían caldo Brucella con un volumen de 3 mL y un inóculo de 200 µL de bacterias, se incubaron a 37° C y se determinó la absorbancia a 635 nm de cada uno de los tubos, cada hora, en un espectrofotómetro (Spectronic LR45227) por un periodo de 12 h. Se midieron además como control negativo, 3 tubos que contenían únicamente caldo Brucella. Al final, se tomaron las absorbancias, se obtuvo promedio de las 3 lecturas y se graficó para obtener la curva de crecimiento.

**Bioensayos**

**Actividad tóxica de los extractos metanólicos sobre *A. salina***

Se preparó el agua de mar artificial, en la que se incubarán los huevecillos, añadiendo sal de mar en una concentración de 40 g/L a un frasco con agua bidestilada, cuyo pH fue ajustado a 7.8. A dicha agua se le añadió una cantidad de 6 mg de levadura de cerveza, la cual funcionó como alimento para los huevecillos. En ella se incubaron 0.1 g de huevecillos de *A. salina* colocados en un recipiente de plástico dividido por una pared intermedia con un espacio en la parte baja de 2 mm; se mantuvieron en condiciones de oscuridad y oxigenación, mediante una pequeña bomba. Uno de los compartimentos se mantuvo bajo luz con una lámpara de 20 Watts, ya que al ser atraídos por la luz, los nauplios pudieron moverse al otro lado de la caja.

A las 24 h, los nauplios fueron transferidos a otro recipiente y se mantuvieron en condiciones de oxigenación y temperatura de 22 a 29° C durante 24 h más. Luego, en una microplaca de 96 pozos, fueron adicionados 100 µL de la suspensión de nauplios por pozo (aproximadamente 10 nauplios) más 100 µL de las diluciones del extracto vegetales a probar. Las concentraciones a evaluar estuvieron en un rango de 120 a 1000 µg/mL. Como control positivo de toxicidad se utilizó dicromato de potasio a una concentración de 400 ppm, y como control negativo se usó agua de mar. A las 24 h después de haber aplicado el extracto vegetal, se realizó el conteo de nauplios vivos por dosis, esto con ayuda de un microscopio estereoscópico.

### **Evaluación de la actividad biológica de extractos metanólicos sobre *H. pylori***

Técnica de absorbancia en microplaca con adición de MTT: Se contó con una microplaca de 96 pozos para el bioensayo y se realizó cada extracto por triplicado en una misma corrida, y además se llevaron a cabo tres eventos independientes, a manera de validación. En cada pozo se adicionaron 50  $\mu$ L de caldo Brucella. Al primer pozo se le agregaron 50  $\mu$ L de un cultivo de *H. pylori*, en su fase de crecimiento exponencial o logarítmica, la cual fue previamente incubada a 37° C, durante aproximadamente 4 h; por último se adicionaron en este primer pozo, 50  $\mu$ L provenientes de una solución madre (saturada) de cada extracto. Se homogeneizó lo contenido en cada pozo con la misma puntilla y posteriormente se tomaron 50  $\mu$ L de cada primer pozo y se transfirieron al segundo pozo, los cuales contenían 50  $\mu$ L de caldo Brucella. Luego, se hizo lo mismo para el tercer pozo, y así sucesivamente, hasta tener 8 diluciones. En los últimos pozos se tomaron y eliminaron 50  $\mu$ L de la mezcla, con el fin de tener el mismo volumen final (100  $\mu$ L).

Las placas utilizadas se dejaron incubar por otras 4 h a 37° C. Al salir de incubación se le agregó a cada pozo 15  $\mu$ L del reactivo MTT (en una concentración de 5 mg/mL), para distinción de células viables y células muertas; se dejaron incubar las placas durante 15 min en las mismas condiciones de temperatura, y transcurrido el tiempo, se añadió finalmente el DMSO, 80  $\mu$ L a cada pozo. Por último, cada microplaca se sometió a medición de absorbancia, con ayuda de un espectrofotómetro lector de microplacas, y se leyó a 570 nm, cuidando de que no les diera la luz, después de haber añadido el DMSO.

Se empleó como control positivo de inhibición la droga ceftriaxona, a una concentración de 7.81  $\mu$ g/mL, como control de disolvente se utilizó metanol, realizando también una curva para determinar algún efecto de inhibición en el cultivo de *H. pylori*., y de igual manera se corrió una prueba utilizando únicamente los extractos vegetales, a modo de control de color (por la presencia de pigmentos que pudieran influir en la medición).

Método turbidimétrico y recuento bacteriano en placa: Se dispuso para cada tratamiento, 16 tubos de 13x100 mm, 4 para cada dosis evaluada (0.1, 1, 4 y 7 mg/mL), es decir cada concentración se probó por cuatuplicado. Cada tubo contenía 3 mL de caldo Brucella y a éstos se les agregó el extracto en el volumen adecuado. Enseguida se inocularon con 200  $\mu$ L de un cultivo celular de *H. pylori*, en fase exponencial, se tomó la lectura de absorbancia mediante un espectrofotómetro, a 635 nm, y posteriormente, se incubaron durante 6 h a 37° C. Al final del tiempo, se midió nuevamente la absorbancia, graficando dichas lecturas.

Después de realizar el análisis de datos y de seleccionar la dosis con mayor inhibición, se procedió a tomar uno de los tubos correspondientes, y a llevar a cabo diluciones seriadas, desde 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-15</sup>, en tubos con 9 mL de solución salina (0.85%). A partir de las últimas 8 diluciones se realizó el plaqueo, transfiriendo a cajas Petri, un mililitro de cada tubo, y enseguida se vació de 12 a 15 mL de agar Brucella en dichas cajas y se homogeneizaron suavemente haciendo movimientos circulares a manera de ochos; al solidificar el agar, se dejaron incubar las placas a 37° C por 18 h. Transcurrido el tiempo, se contaron las colonias observadas en las placas, características de *H. pylori* en agar Brucella, y se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC/mL).

### **Determinación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos con actividad anti-*H. pylori***

Para determinar la capacidad antioxidante del extracto, se llevó a cabo el método de DPPH. Los solventes utilizados durante el ensayo fueron grado analítico: el 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) marca SIGMA y el ácido ascórbico utilizado para realizar la curva de calibración fue marca CTR. Primeramente, se realizó una curva de calibración con el ácido ascórbico, para la cual se preparó una solución stock a una concentración de 1 mg/mL, posteriormente se tomaron alícuotas para obtener curva con rango de 10 a 120  $\mu$ g/mL. La concentración de la solución de DPPH a utilizar se estandarizó a 40 ppm cuya absorbancia fue de 1.000.

Para determinar la capacidad antioxidante de los extractos, se preparó una solución madre a una concentración de 2 mg/mL, y a partir de ésta, se llevaron a cabo diluciones (20, 40, 80, 100 y 200). De cada dilución, se tomaron 100  $\mu$ L y se colocaron en una celda de plástico para espectrofotómetro que contenía 1.9 mL de DPPH a 40 ppm (cada concentración fue probada por triplicado), las celdas fueron conservadas en obscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente, y una vez transcurrido el periodo de incubación, se llevó a cabo la medición de las

absorbancias en un espectrofotómetro a 519 nm. Los resultados se expresaron como % de inhibición, utilizando la fórmula siguiente, y finalmente se obtuvo la Concentración Media Inhibitoria (IC<sub>50</sub>).

$$\% \text{ de Actividad Antioxidante} = (\text{Abs. inicial} - \text{Abs. final}) / (\text{Abs. inicial}) * 100$$

Donde:

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

Abs. Inicial = absorbancia a 519 nm de la solución de DPPH antes de estar en contacto con el extracto evaluado (control)

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

### Análisis estadísticos

- **Toxicidad de los extractos vegetales sobre *A. salina*:** De los ensayos de toxicidad de los extractos vegetales, los resultados obtenidos (por triplicado) se analizaron mediante un análisis PROBIT, para obtener la Dosis Letal media (LD<sub>50</sub>), con ayuda del Paquete Estadístico SPSS.
- **Actividad biológica de los extractos vegetales sobre *H. pylori*:** De los datos obtenidos de la absorbancia (por triplicado), y del conteo de UFC (por duplicado) se generó un promedio para cada uno y se comparó con los obtenidos por los datos del control, esto mediante un análisis de varianza con una P < 0.05, empleando una prueba de Dunnet, de dos colas, con ayuda del Paquete Estadístico SPSS.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Determinación de grupos funcionales

Se realizó la extracción metanólica de *A. ludoviciana* (parte aérea) y posteriormente se les realizaron pruebas fitoquímicas para identificar grupos funcionales (Tabla II). Se observó la presencia de todos los grupos funcionales investigados a excepción de los grupos aromáticos.

**Tabla II.** Grupos fitoquímicos presentes en el extracto metanólico de *A. ludoviciana*

Prueba fitoquímica	Grupo funcional	Extracto metanólico de <i>A. ludoviciana</i>
Dragendorff	Alcaloides	+
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Formaldehído	Aromaticidad	-
Molish	Carbohidratos	+
2,4 Dinidrofenilhidracina	Carbonilo	+
Cumarinas	Cumarinas	+
Salkowski	Esteroles y triterpenos	+
H <sub>2</sub> SO <sub>2</sub>	Flavonoides	+
KMnO <sub>4</sub>	Insaturaciones	+
Lactonas	Lactonas	+
FeCl <sub>3</sub>	Oxhidrilos fenólicos	+
Bicarbonato de sodio	Saponinas	+
Baljet	Sesquiterpenlactonas	+

### Determinación de la actividad tóxica del extracto metanólico de *A. ludoviciana* sobre *Artemia salina*

Con el propósito de determinar la DL<sub>50</sub> (Dosis Letal Media) del extracto metanólico de *A. ludoviciana*, se realizaron ensayos para evaluar su toxicidad sobre el organismo *A. salina*. Se utilizaron microplacas de 96 pozos y se adicionaron 100 µL del extracto, partiendo de una solución stock de 1 mg/mL. Estas concentraciones iban desde 60 hasta 500 µg/mL. Como control positivo para esta prueba, se utilizó dicromato de potasio a una concentración de

400 ppm, y como control negativo, agua de mar. Una vez adicionado el extracto a cada pozo con nauplios, se realizó el conteo por dosis (por triplicado) tanto de vivos como de nauplios muertos, transcurridas 24 h. En la Tabla III, se observa que el extracto analizado presentó actividad biológica sobre dicho organismo. El extracto de *A. ludoviciana*, presentó una DL<sub>50</sub> de 321.28 µg/mL mostraron menor actividad a las mismas dosis, resultando ser moderadamente tóxicos, según la clasificación.

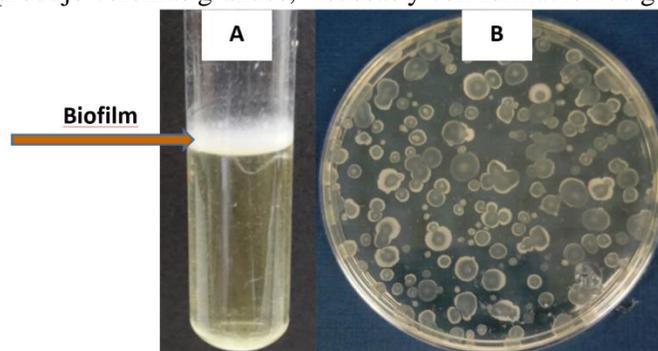
**Tabla III.** Determinación DL<sub>50</sub> del extracto metanólico de *A. ludoviciana* sobre *A. salina*

Especie	Parte evaluada	DL <sub>50</sub> [µg/mL]	Categoría de toxicidad	
			Rango [µg/mL]	Clasificación
<i>A. ludoviciana</i>	Parte aérea	321.28	100-1000	Moderadamente tóxico

### *Helicobacter pylori*

#### A) Caracterización macroscópica

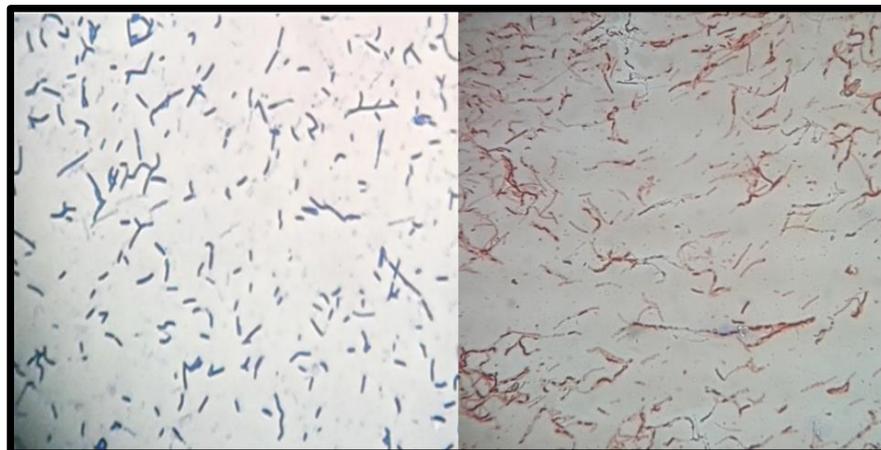
Una vez obtenida la cepa ATCC43504 de *H. pylori* se procedió a realizar la activación y resiembra en medio de cultivo Brucella para su mantenimiento. En caldo Brucella, incubada a 37° C y aerobiosis, produjo biofilm en la parte superior del medio (Figura 1A), volviéndose muy notorio y denso a partir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



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

#### B) Caracterización microscópica

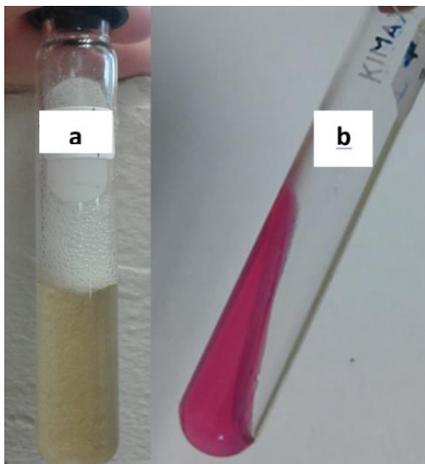
Enseguida se realizó tinción simple y tinción de Gram para poder observar al microscopio óptico la morfología típica del cultivo (Figura 2). Se puede distinguir claramente la morfología bacilo-helicoidal de la bacteria, además se comprueba su identificación como gram negativa, tal y como se describe en el Manual de Bergey (1984) al mencionar las características morfológicas de *H. pylori*.



**Figura 2. Observación de *H. pylori* en microscopio óptico (400X).** Tinción simple (izquierda) y tinción de Gram (derecha).

**C) Caracterización bioquímica**

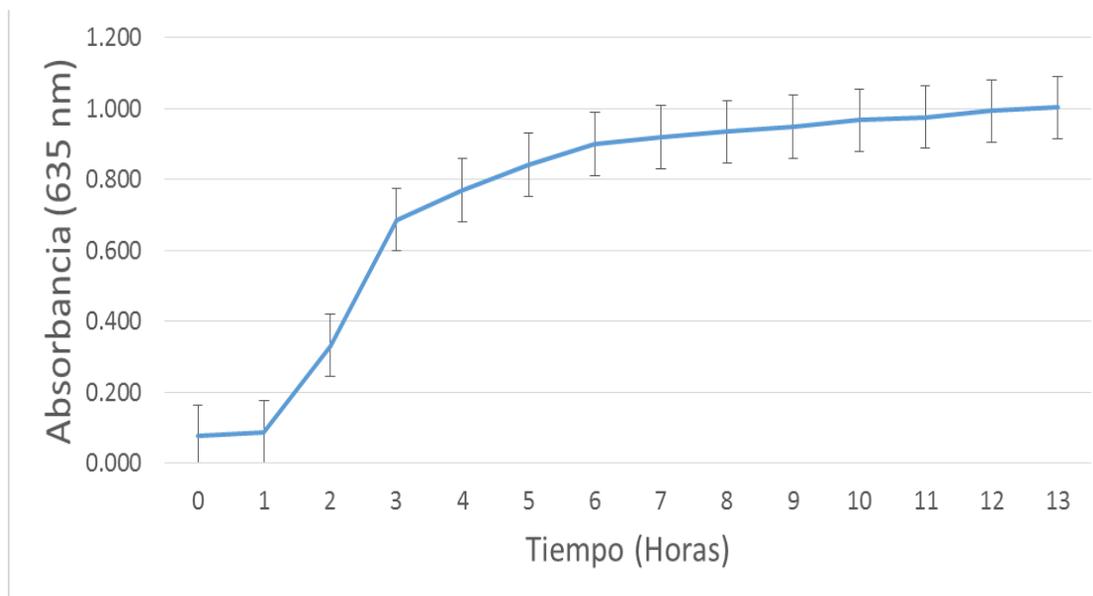
El Manual de Bergey también señala como características bioquímicas de *H. pylori* el ser catalasa y ureasa positivas. Tales pruebas bioquímicas se llevaron a cabo en este trabajo. Para la prueba de la catalasa, se añadieron varias gotas de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) a un tubo con cultivo de *H. pylori* en caldo Brucella. La aparición de burbujas de  $O_2$  indicó la positividad de la prueba (Figura 2). Para la prueba de la ureasa, se preparó agar urea en dos tubos, en uno de ellos se sembró por picadura una asada proveniente de un cultivo puro de *H. pylori*, y el segundo tubo se dejó como control negativo. Los tubos se incubaron a  $37^\circ C$ , y se hicieron observaciones a las 24, 48 y 72 horas. El cambio en la coloración del medio, de amarillo a rosa, nos indicó la presencia de la enzima ureasa (Figura 3).



**Figura 3. Pruebas bioquímicas para *H. pylori*.** Se realizaron dos pruebas bioquímicas características para *H. pylori*: a) Prueba de la catalasa (+) y b) Prueba de la ureasa (+)

**D) Cinética de crecimiento**

En la Figura 4 se muestra la cinética de crecimiento de *H. pylori*; durante la primera hora de incubación se observa un ligero crecimiento, correspondiente a una fase de adaptación, y posteriormente se aprecia una fase exponencial o logarítmica, la cual continúa hasta la sexta hora después de incubación. El crecimiento de la bacteria se monitoreó durante 13 horas. Cada punto graficado corresponde a tres eventos independientes por triplicado.



**Figura 4. Cinética de crecimiento de *H. pylori*.** En esta figura se muestra primeramente una fase de adaptación celular, seguida de una intensa fase exponencial, la cual da inicio en la hora 1 y empieza a decrecer aproximadamente a la hora 6. A continuación se aprecia una fase estacionaria hasta terminar dicha cinética.

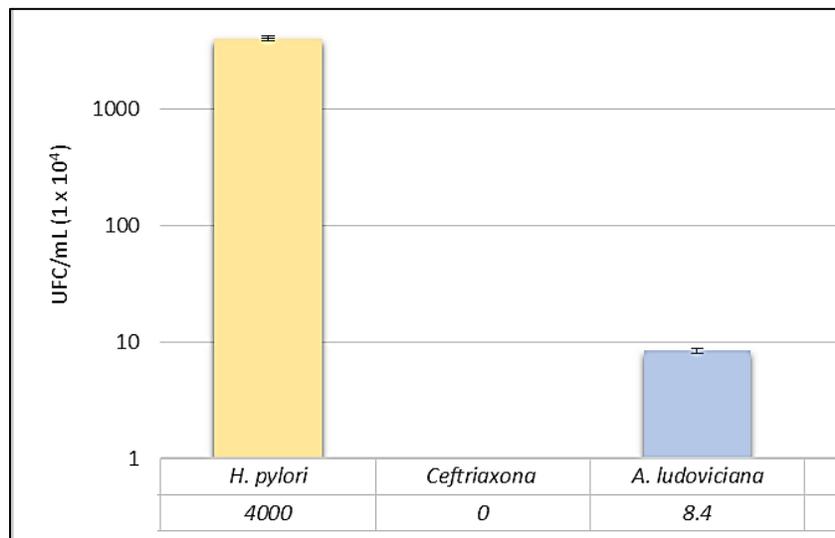
**Actividad biológica del extracto metanólico de *A. ludoviciana* sobre *H. pylori***

**A) Determinación de la  $CI_{50}$ .** Este valor se determinó Mediante la Técnica del MTT, para lo cual se evaluaron ocho concentraciones del extracto metanólico de *A. ludoviciana* sobre *H. pylori*, mediante la determinación de viabilidad celular con el reactivo MTT, en donde se obtuvo un valor de 1.949 mg/mL, este valor se obtuvo a partir del programa SPSS versión 20.0 (Tabla IV).

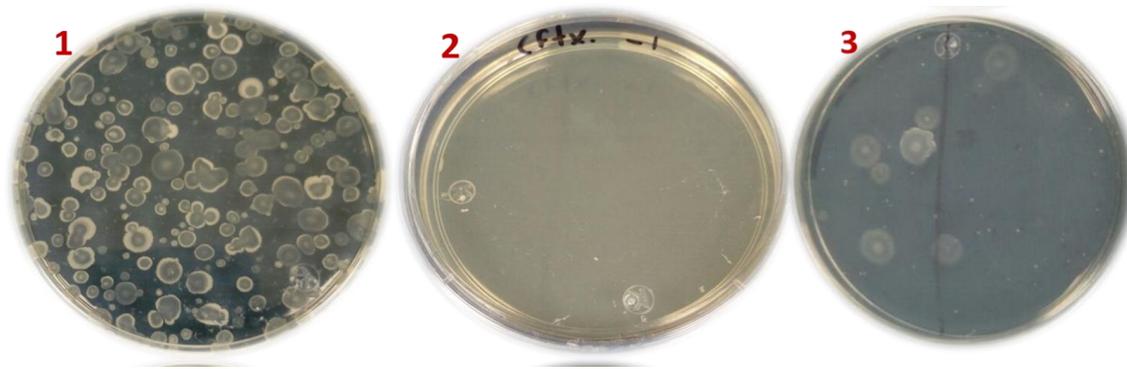
**Tabla IV.** Determinación de la inhibición porcentual de *H. pylori* por acción del extracto metanólicos de *A. ludoviciana*, así como determinación de la Concentración Media Inhibitoria ( $CI_{50}$ )

Extracto metanólico	Dosis (mg/mL)	% Viabilidad	% Inhibición	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>A. ludoviciana</i>	10	25.77	74.23	1.949
	5	41.21	58.79	
	2.5	75.34	24.66	
	1.25	82.17	17.83	
	0.625	83.62	16.38	
	0.3125	79.1	20.9	
	0.156	84.47	15.53	
	0.078	79.35	20.65	

**B) Método turbidimétrico y recuento bacteriano en placa:** Después de haber obtenido las absorbancias de los tratamientos y de graficar los datos por el método de microdilución con MTT, se llevó a cabo el recuento bacteriano en placa y así determinar las unidades formadoras de colonias (UFC/mL). En la Figura 5, se muestran los resultados de las UFC/mL de *H. pylori* en cultivo normal, así como de *H. pylori*, en presencia del extracto metanólico de *A. ludoviciana* a la dosis de 0.1mg/mL y en la Figura 6 se observa la determinación de UFC/mL correspondiente a los tratamientos mencionados en la Figura 5.



**Figura 5.** Comparación de las UFC/mL de *H. pylori* obtenidas en presencia de la ceftriaxona y el extracto metanólico de *A. ludoviciana*.



**Figura 6.** Aspecto general de las colonias de *H. pylori* caracterizada por la presencia de un cumulo central y bordeado de un halo o biofilm cubriendo a la colonia (1). Cultivo de *H. pylori* en presencia de ceftriaxona, en la placa se observa inhibición total (2), aspecto del cultivo de *H. pylori* en presencia del extracto metanólico de *A. ludoviciana* (3).

**Evaluación de la actividad antioxidante del extracto metanólico con mayor actividad anti-*H. pylori***

Se determinó la capacidad antioxidante del extracto metanólico de *A. ludoviciana* mediante el método del DPPH (Tablas V). Dicha actividad se expresa como el porcentaje de la actividad antioxidante, lo cual indica el porcentaje de inhibición del radical DPPH neutralizado por cada extracto a determinadas concentraciones, y también se obtuvieron los valores de la concentración antioxidante media ( $CA_{50}$ ), mediante un análisis Probit utilizando el paquete estadístico SPSS, los resultados obtenidos muestran que *A. ludoviciana* presenta capacidad antioxidante, ya que se requiere una concentración de 0.086  $\mu\text{g/mL}$  del extracto metanólico de *A. ludoviciana* para reducir el 50% del DPPH.

**Tabla V.** Determinación de la actividad antioxidante de *A. ludoviciana*

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Promedio de absorbancia	Desviación estándar	Actividad antioxidante[%]	Concentración antioxidante media ( $CA_{50}$ )
DPPH	1.106	0.001	-	<b>0.086</b> $\mu\text{g/mL}$
Metanol	0.04	0.021	-	
DPPH+Metanol	0.827	0.003	-	
0.02	0.866	0.017	2.41	
0.40	0.679	0.013	23.41	
0.08*	0.356	0.019	59.90	
0.10	0.228	0.017	74.33	
<b>0.20</b>	0.121	0.015	<b>86.32</b>	

La elección de la planta estudiada en este trabajo se deriva de que es una especie vegetal que se encuentran distribuidas en la región, principalmente en los estados del norte de México, Nuevo León y zonas aledañas. Además se conoce en la Medicina Tradicional el uso de ciertas especies a modo de té o infusiones para contrarrestar algunos malestares estomacales.

Las diferentes partes de una planta están desigualmente provistas de principios activos. Las que llegan a tener una aplicación en la medicina, se denominan drogas vegetales. La hoja, asiento de todas las síntesis químicas vegetales, es la parte más empleada, ya que produce una gran cantidad de heterósidos, compuestos que se emplean como medicamentos, y además de producir la mayor parte de los alcaloides. El tallo es sólo una vía de tránsito entre las raíces y las hojas, pero puede contener principios activos; en especial la corteza y la albura, parte del tallo situada entre el corazón y la corteza, tienen, a veces, virtudes terapéuticas. El tallo termina en una yema, donde se localizan las expectativas de crecimiento de la planta. Algunas yemas son antisépticas, siendo utilizadas para eliminar ciertos microorganismos. La raíz extrae el agua con sales minerales del suelo y la bombea hacia las hojas. Por lo tanto,

acumulan a menudo azúcares, vitaminas e incluso alcaloides. La flor es encargada de transmitir el mensaje hereditario, sin embargo, puede tener presente algunos principios activos, por lo que puede llegar a ser apreciada en fitoterapia. Los pétalos coloreados son ricos en pigmentos, de los cuales se conoce actividad antioxidante. Por último, la semilla o grano es un depósito de reserva de alimentos para la futura planta, por lo cual está provista de proteínas, glúcidos y lípidos (Castillo *et al.*, 2009).

Alonso *et al.* 2008; realizaron un estudio fitoquímico a numerosas especies de esta misma familia (Asteraceae), colectadas en algunas zonas de México, y encontraron que los metabolitos predominantes en la mayoría son flavonoides, saponinas, taninos, sesquiterpenos, glucoalcoholes, aceites esenciales, alcaloides estéricos, compuestos terpénicos, lactonas, glucósidos y ácidos fenólicos, por citar algunos de los más representativos. Esto también concuerda con nuestro trabajo, en el cual se encontró que *A. ludoviciana*, miembro de esta familia, posee saponinas, lactonas, alcaloides, azúcares, flavonoides, triterpenos y sesquiterpenlactonas, resultando ausentes los grupos aromáticos (Ver Tabla II), y demostrando que esta amplia variedad de compuestos químicos con acciones fisiológicas importantes le confieren a la planta sus propiedades medicinales para el tratamiento de enfermedades relacionadas al tracto digestivo principalmente, así como en cuestiones alimentarias.

Respecto a la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos, Castillo *et al.*, 2009; determinaron una CMI de 250 µg/mL correspondiente a un extracto metanólico de *A. ludoviciana* subs. mexicana evaluada contra *H. pylori*. Así mismo se evaluó el extracto metanólico de *Artemisia absinthium* obteniendo el mismo comportamiento inhibitorio contra *H. pylori*.

En cuanto al estudio para determinar la actividad antioxidante de los extractos metanólicos con mayor actividad anti-*H. pylori*, se puede mencionar que la capacidad antioxidante del extracto metanólico de *A. ludoviciana* fue determinada en base a la actividad del radical libre DPPH. El poder antioxidante de un extracto se puede expresar en función del porcentaje de DPPH que se reduce durante la reacción (Villanueva *et al.* 2010). Estudios realizados por López en 2008, demuestran una débil actividad para reducir el radical DPPH por parte de un aceite esencial extraído de diversas especies del género *Artemisia*. Específicamente hablando de *A. ludoviciana*, se encontró un porcentaje de captación del radical de aproximadamente 10% y una actividad antioxidante de alrededor del 20%. Por su parte, Kordali *et al.*, 2005; evaluaron el aceite esencial de *Artemisia dracuncululus* y determinaron de igual manera, porcentajes bajos de captación del radical DPPH, no mayores a 20%, en concentraciones que iban desde 100, 200, 400 y 1000 µg/mL.

El compuesto activo de *A. ludoviciana* es la santonina, descrito como sustancia neutra, cristizable, incolora, amarga y acre que produce el ácido santónico como vermífugo. Por otra parte también se han reportado diversos trabajos en donde se muestra la actividad antihelmíntica de extractos alcohólicos de *A. ludoviciana*, así como actividad hipoglucémica y antimalaria atribuyendo dicha actividad a la fracción correspondiente a triterpenos y alcaloides. Así como actividad anti-inflamatoria adjudicada a los sesquiterpenlactonas (Bora y Sharma 2011).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede considerar la continuidad del presente trabajo realizando el fraccionamiento del extracto metanólico de *A. ludoviciana* y determinar la o las moléculas con actividad anti *H. pylori*, y realizar otro tipo de evaluaciones citotóxicas, ya sea directamente sobre modelos animales o bien sobre linfocitos.

### CONCLUSIÓN

El extracto metanólico de *A. ludoviciana* inhibe el cultivo *in vitro* de *H. pylori*, y posee alta capacidad antioxidante y baja toxicidad sobre *A. salina*.

### BIBLIOGRAFÍA

Alonso, T. M. G., Ibarra, M. C. M. y Martínez, D. S. M. (2008). Estudio fitoquímico de plantas medicinales propias del estado de Querétaro. Memorias del verano de la ciencia. Disponible en: <http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias>. Fecha de consulta: 12 de agosto de 2017

- Bora KS, Sharma A. (2011). The genus *Artemisia*: A comprehensive review. *Pharmacology and Biology*. 49, 101–109.
- Castillo-Juárez I, González V, Jaime-Aguilar H, Martínez G, Linares G, Bye R, Romero I. (2009). Anti *Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*. 122, 402-405.
- Domingo D, y López M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*. 16(4), 385-393.
- Domínguez X. A. 1973. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Ed. Limusa. México.
- Fauci A. (1998). New and reemerging diseases: The importance of biomedical Research. *Emerging Infectious Diseases*. 4(3), 374-378.
- Gepts, P. y Papa, R. (2002). Evolution during domestication. En: *Encyclopedia of Life Sciences*. Macmillan Publishers Ltd. 1-7.
- Graham DY, Adam E, Reddy GT, Agarwal JP, Evans DJ, Malaty HM. (1991). Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in India Comparison of developing and developed countries. *Digestive Diseases and Sciences*. 36, 1084-1088.
- Graham DY, Malaty HM, Evans DG, Evans DJ Jr, Klein PD, Adam E. 1991. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. Effect of age, race, and socioeconomic status. *Gastroenterology*. 100(6),1495-1501.
- Kordali S, Recep Kotan, Ahmet Mavi, Ahmet Cakir, Arzu Ala, and Ali Yildirim. (2005). Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracuncululus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracuncululus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(24), 9452–9458.
- Lind T, Megraud F, Unge P, Bayerdorffer E, O'morain C, Spiller R. (1999). The MACH2 study: role of omeprazol in eradication of *H. pylori* with one week triple therapies. *Gastroenterology*. 116, 248-253.
- Majalca C, Rivera J, Ochoa S, Giono S. (2001). Transporte, aislamiento, identificación y conservación de cepas de *Helicobacter pylori*. *Bioquímica*. 26(4):105-110.
- Mitscher, L.A. (1975). Antimicrobial agents from higher plants. *Recent Advances in Phytochemistry*. 9, 243-282.
- Palacios, Espinosa, Francisco, Wendy Escobedo Hinojosa e Irma Romero. (2011). Panorama actual del estudio de las plantas con actividad anti-*Helicobacter pylori*. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 14(1), 51-61.
- Schultes, R.E. The kingdom of plants. (1978). En: Thomson, W. A. E. (Ed). *Medicines from the Earth*. McGraw-Hill Book Co., New York, p. 208.
- Segal I, Ally R, Mitchell H. (2001). *Helicobacter pylori*: an african perspective. *Quarterly Journal of Medicine*. 94, 561-565.
- Sierra F, Forero FJ, Rey M. (2014). Extract in alloxan-induced diabetic rats and its use in diabetes mellitus: a brief qualitative phytochemical and acute toxicity test on the extract. *African Journal of Traditional, complimentary and Applied Microbiology*. 6 (3), 255 –261.
- Villanueva-Tiburcio J E, Condenzo-Hoyos LA, Asquiere ER. (2010). Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubi* (H. B. K.) McVaugh). *Ciência e Tecnologie Alimentos*. 30, 151-160.
- Zahra Hosseinejad, Sodaif Darvish Moghadam, Farzaneh Ebrahimi, Mohammad Abdollahi, Mohammad Javad Zahedi, Mahdieh Nazari, Mehdi Hayatbakhsh, Saeed Adeli y Fariba Sharififar. (2011). *In vitro* screening of selected Iranian medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *International Journal of Green Pharmacy*. 5(4), 282-285.