

Actividad antioxidante, tóxica y antimicrobiana de *Rosmarinus officinalis*, *Ruta graveolens* y *Juglans regia* contra *Helicobacter pylori*

Antioxidant, toxic and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis*, *Ruta graveolens* and *Juglans regia* against *Helicobacter pylori*

Juanita Deniss Perales-Flores^{1*}, María Julia Verde-Star¹, José Ezequiel Viveros Valdéz¹, María Porfiria Barrón-González¹, Ruth Amelia Garza-Padrón¹, Víctor E. Aguirre-Arzola², Ramón Gerardo Rodríguez¹

¹ Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Biología Celular y Genética, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. 66455.

² Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Laboratorio de Ciencias Naturales, Facultad de Agronomía, Francisco I. Madero S/N, Hacienda el Canadá, Col 17, Cd. Gral. Escobedo, N.L. CP 66050.

RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, con alta prevalencia a nivel mundial, la infección causa úlceras gástricas, duodenales y cáncer, se considera uno de los principales problemas de salud pública en México. El trabajo evalúa *in vitro* la actividad antioxidante, tóxica, antibacteriana y la capacidad de inhibir la biopelícula formada por *H. pylori* del extracto metanólico *Juglans regia* (EMJR) y los extractos etanólicos crudos de las especies *Rosmarinus officinalis* (EERO) y *Ruta graveolens* (EERG) colectadas en el estado de Nuevo León, México. Mediante tamizaje fitoquímico se determinó cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios. La capacidad antioxidante por el método de DPPH, mostró que el EMJR fue el más activo con una CI_{50} de 2.759 $\mu\text{g/mL}$. Los EERG y EERO desarrollaron halos de inhibición de 11 y 16 mm y una CMI de 0.136 y 0.51 mg/mL respectivamente, solo el EERO inhibe la formación de la biopelícula en un 83.7 %. Los ensayos de toxicidad sobre *Artemia salina* mostraron toxicidad de débil a moderada. Los resultados demuestran el potencial uso de los extractos estudiados como fuentes alternativas en la búsqueda de nuevos tratamientos contra *H. pylori*.

Palabras clave: Romero, Ruda, *Helicobacter pylori*, antibacteriano, citotoxicidad.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a Gram negative bacteria with a high prevalence worldwide, causing gastric and duodenal ulcers and cancer, it is one of the main public health problems in Mexico. This work evaluates the *in vitro* antioxidant, toxic, antibacterial activity, and the ability to inhibit the biofilm formed by *H. pylori*, of the methanolic extract *Juglans regia* (EMJR) and crude ethanolic extracts of the species *Rosmarinus officinalis* (EERO) and *Ruta graveolens* (EERG) collected in the state of Nuevo León, Mexico. Through phytochemical screening, the presence of secondary metabolites was qualitatively determined. The antioxidant capacity by the DPPH method showed that EMJR was the most active with an IC_{50} of 2.759 $\mu\text{g/mL}$. The EERG and EERO developed inhibition halos of 11 and 16 mm and a MIC of 0.136 and 0.51 mg/mL respectively, only the EERO inhibits biofilm formation

by 83.7%. Toxicity tests on *Artemia salina* showed weak to moderate toxicity. The results show the potential use of the studied extracts as alternative sources in the search for new treatments against *H. pylori*.

Keywords: Rosemary, Ruda, *Helicobacter pylori*, antibacterial, cytotoxicity.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori, es una bacteria Gram negativa, microaerofílica de forma curva, espiral o fusiforme, con dimensiones de 2 a 4 μm de longitud y 0.5 a 1 μm de ancho, presenta de 4 a 6 flagelos unipolares de 3 μm de largo, de lento crecimiento cuyo reservorio principal es el estómago humano (Palacios *et al.*, 2011). Las infecciones que causa son problema de salud pública (Ayala *et al.*, 2014). Se estima que más del 80 % de la población mundial se encuentra afectada por la infección, la cual propicia el desarrollo de úlceras pépticas, gastritis crónica y estrés oxidativo desencadenando inflamación y cáncer de estómago. Dentro de los factores de recurrencia y virulencia desarrollados por la bacteria se ha determinado que la capacidad de formar biopelículas contribuye al desarrollo de infecciones crónicas y resistencia al tratamiento convencional (Hathroubi *et al.*, 2018) el cual consta de una terapia triple en la que se incluyen un inhibidor de la bomba de protones, amoxicilina y claritromicina (World Gastroenterology Organisation (WGO)), recientemente la Organización Mundial de la Salud incluyó en la publicación en su primera lista de «patógenos prioritarios» resistentes a los antibióticos a *H. pylori*, situándola en el tercer lugar de la lista de elevada prioridad, debido al desarrollo de resistencia a claritromicina (Salehi *et al.*, 2018). El alto costo del tratamiento convencional aunado a los efectos secundarios y los mecanismos de resistencia generados por la bacteria (World Gastroenterology Organisation (WGO)) hacen que la búsqueda de tratamientos alternativos siga activa. La medicina tradicional es una actividad que ha evolucionado con el paso del tiempo hasta llegar a la medicina actual, en México existe una gran diversidad de plantas que se utilizan en la medicina tradicional como tratamiento para diversas enfermedades, dentro de los que destacan *Ruta graveolens* (Nombre común – Ruda) que tiene la capacidad

de ser un potente antiinflamatorio debido a la presencia de compuestos bioactivos como flavonoides; así mismo es probablemente el remedio más importante en la medicina tradicional para ser utilizado para la inducción del aborto (Colucci-D'Amato y Cimaglia, 2020). *Rosmarinus officinalis* (Romero) es una especie utilizada en la medicina tradicional como antiespasmódico, en cólico renal, tiene actividad antimicrobiana, hepatoprotectiva y anti carcinogénica debido a los compuestos fenólicos presentes tales como ácido rosmarínico, carnosol, ácido carnósico (Karadağ *et al.*, 2019). Otra especie de gran interés es *Juglans regia* (Nogal), su fruto (la nuez) es reconocido como uno de los más importantes a nivel mundial debido a su alto contenido nutrimental y abundante concentración de compuestos bioactivos como esteroides, fibra dietética y polifenoles que entre otras actividades han demostrado capacidad antibacteriana, antiviral, anticáncer, antiinflamatoria (Zhang *et al.*, 2020). Los extractos de las plantas en estudio pudieran poseer actividad relacionada con la infección causada por *H. pylori*. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar los extractos de *Juglans regia*, *Rosmarinus officinalis* y *Ruta graveolens* para conocer su capacidad antibacteriana, anti-biopelícula, antioxidante y tóxica como un paso preliminar para su uso como fuente de nuevos compuestos con propiedades contra *H. pylori*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las partes aéreas *Ruta graveolens* y *Rosmarinus officinalis* fueron colectadas en Iturbide, Nuevo León, México. Las cáscaras de nuez (*Juglans regia*) fueron donadas por la empresa Alanuez ubicada en Linares Nuevo León, México, como producto de deshecho. Las muestras fueron secadas a 60 °C / 48 h en un horno de secado Yamato DX402C.

Obtención de los extractos

Los extractos EERG y EERO fueron obtenidos por maceración asistida con ultrasonido (BRANSON 3800) a 40 KHz por 60 min a temperatura ambiente a una relación de 1:12.5 sólido: líquido. Se siguió el mismo procedimiento para las cáscaras de nuez, utilizando metanol, el solvente se eliminó en estufa de secado a 60 °C / 24 h. Finalmente, los extractos se conservaron a 4 °C en viales ámbar hasta su uso.

Tamizaje fitoquímico de los extractos

Los extractos se sometieron a una serie de pruebas químicas coloridas para determinar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios como: insaturaciones (KMnO_4), carbonilo, grupos aromáticos, oxidrilos fenólicos (taninos vegetales), esteroides y triterpenos, carbohidratos, cumarinas, lactonas, sesquiterpenlactonas, alcaloides, flavonoides y saponinas, de acuerdo con Verde-Star *et al.* (2016).

Actividad antioxidante con DPPH

La capacidad antioxidante de los extractos se determinó por el método de DPPH la absorbancia se midió a 519 nm

en un espectrofotómetro (Jenway 6320D) (Gutiérrez *et al.*, 2008) utilizando ácido ascórbico como control positivo. Se realizaron diluciones seriadas de los extractos y cada concentración se evaluó por triplicado, se aplicó análisis estadístico Probit para determinar concentración inhibitoria media (CI_{50}).

Material biológico

La cepa de *Helicobacter pylori* ATCC 43504, fue obtenida del laboratorio de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL; y conservada a 4 °C en caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC, de OXOID).

Efecto bactericida por difusión en disco (Kirby-Bauer)

Para determinar el efecto bactericida se utilizó el método de difusión en disco (Hudzicki, 2009) con algunas modificaciones. El cultivo de *H. pylori* se realizó en caldo ICC, por 18 h / 37 °C posteriormente el inóculo se estandarizó usando el método de suspensión de colonias hasta alcanzar una turbidez comparable con el tubo de 0.5 de la escala de McFarland, para dar una concentración resultante de 1.5×10^8 UFC/mL, los discos se impregnaron con los extractos a 10 µg/mL utilizando como control negativo etanol y como control positivo gentamicina (cada tratamiento fue realizado por triplicado). Las cajas Petri se incubaron a 40 °C / 24 h. Terminado el periodo de incubación, se midieron y se registraron los halos de inhibición producidos por cada tratamiento.

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para la determinación de la CMI se utilizó el método de micro dilución (CLSI, 2008) con algunas modificaciones para el cual se utilizaron placas de 96 pozos con 50 µL de caldo ICC estéril y 50 µL de la solución del extracto (10 µg/mL), se homogeneizaron y realizaron diluciones seriadas, por triplicado, utilizando gentamicina como control positivo (50 µL, 0.3 µg / mL), 50 µL de inóculo como control negativo y 100 µL de caldo ICC como control de crecimiento. La lectura se realizó en un lector de microplacas (EL311, Bio-Tek Instruments) a 570 nm.

Inhibición de la formación de biopelícula

La inhibición de la formación de la biopelícula se midió utilizando el método de tinción con cristal violeta (Shao *et al.*, 2019) los extractos fueron probados a concentraciones de 0.5, 1 y 3 mg/mL realizando cada tratamiento por triplicado, utilizando gentamicina (0.2 mg/mL) como control positivo y etanol como control negativo.

Actividad tóxica sobre *Artemia salina*

La toxicidad de todos los extractos fue evaluada utilizando el ensayo de letalidad sobre nauplios de *A. salina* según lo señalado por Meyer y colaboradores (1982); Se realizó un barrido de la actividad de los extractos probando a concentraciones desde 60 hasta 500 ppm, usando como control positivo $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y como control negativo agua de mar, todos los ensayos se realizaron por triplicado. Las dosis letales medias (DL_{50}) fueron obtenidas utilizando el análisis estadístico Probit.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención y tamizaje fitoquímico de los extractos

El proceso de maceración es una de las técnicas convencionales para la extracción de compuestos bioactivos ampliamente utilizada debido a que es una técnica económica y sencilla (Tambun *et al.*, 2021). El rendimiento más alto se obtuvo de *J. regia* (47.43 %), seguido de *R. graveolens* (3.19 %) y finalmente *R. officinalis* con 0.1 %. (ver Tabla 1). El rendimiento de la extracción es un parámetro que puede verse afectado por factores como: la madurez, temporada de colecta, las características del material vegetal utilizado, técnica y tiempo de extracción, así como el tipo de solvente utilizado, generan diferencias en la efectividad del método de extracción (Adam *et al.*, 2019; Ashraf *et al.*, 2018). El tamizaje fitoquímico es uno de las técnicas más útiles, rápidas y sencillas para la determinación de principios activos relacionados con diversas actividades biológicas y proporciona bases para el aislamiento específico de compuestos de interés (Shaikh y Patil, 2020). Posterior a la obtención, los extractos se sometieron a una serie de pruebas químicas colorimétricas, las cuales, de manera cualitativa, señalan la presencia de diversos grupos funcionales. Esta técnica no es determinante para probar la presencia o ausencia de los metabolitos secundarios analizados, sino que su utilidad radica en la rapidez con que genera información para la toma de decisiones sobre la efectividad de la extracción, así como sobre las posibilidades de éxito en las actividades a analizar. Los resultados de los extractos en estudio se muestran en la Tabla 2. Los metabolitos encontrados en los extractos concuerdan con lo reportado por Kabubii *et al.* (2015), quien para el tamizaje de *R. officinalis* reporta la presencia de terpenos, taninos, azúcares, saponinas y flavonoides. De los metabolitos comúnmente encontrados en *R. graveolens* según Jinous (2012) se encuentran: cumarinas, alcaloides, terpenoides, flavonoides, saponinas, taninos y glucósidos, los resultados discrepando en su mayoría con lo encontrado en el presente estudio, sólo concuerdan en la presencia de terpenoides y saponinas, la variabilidad en la presencia de los fitoquímicos está relacionada con factores abióticos como la temperatura, salinidad, estacionalidad, ritmo circadiano, altitud, luz, estrés, deficiencia de nutrientes entre otros (Verma and Shukla, 2015). Para el EMJR los metabolitos encontrados concuerdan con lo descrito por Jahanban-Esfahlan y colaboradores (2019) que mencionan que los principales metabolitos de diversas partes de *J. regia* son flavonoides y compuestos fenólicos. La presencia de metabolitos secundarios como flavonoides y

Tabla 1. Identificación y rendimiento de extractos.

Table 1. Identification and yield of extracts.

Nombre científico	Nombre común	Parte utilizada	Rendimiento porcentual	Clave del extracto
<i>Ruta graveolens</i>	Ruda	Parte aérea (hoja y tallo)	3.19 %	EERG
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero	Parte aérea (hoja y tallo)	0.1 %	EERO
<i>Juglans regia</i>	Nogal	Cáscara del fruto (nuez)	47.43 %	EMJR

Tabla 2. Evaluación de compuestos fitoquímicos presentes en los extractos evaluados.

(+) Presencia, (-) Ausencia.

Table 2. Evaluation of phytochemical compounds present in evaluated extracts.

(+) Presence, (-) Absence.

PRUEBA	EXTRACTO		
	EMJR	EERO	EERG
KMnO ₄	+	+	+
Carbonilo	+	+	-
Oxidrilos fenólicos	+	+	+
Esteroles y triterpenos (salkowski)	-	+	+
Carbohidratos (molish)	+	+	+
Cumarinas	+	+	-
Lactonas	-	-	-
Flavonoides (H ₂ SO ₄)	+	-	-
Sesquiterpenlactonas	+	-	-
Alcaloides dragendorff	-	-	-
Saponinas (bicarbonato de sodio)	-	-	+
Saponinas (salkowski)	+	+	-
Aromaticidad	+	+	+
Flavonoides (shinoda)	+	-	-

chalconas se ha relacionado con la inhibición, interrupción o disminución de factores de virulencia producidos por *H. pylori* (Bonifácio *et al.*, 2014). Así mismo se ha reportado que algunos flavonoides pueden ejercer actividad antimicrobiana directa *in vitro*, también las catequinas, tienen efecto en procesos generales como el daño a la membrana, la motilidad y la adhesión bacteriana (Palacios *et al.*, 2011).

Actividad antioxidante

Los extractos evaluados mostraron de buena a moderada actividad antioxidante, en la Tabla 3 se enlistan las CI_{50} obtenidas por cada especie. El EMJR demostró ser el extracto con mejor actividad, comparada con EERO y EERG, incluso mejor que la del ácido ascórbico utilizado como control en este ensayo, la IC_{50} obtenida para este extracto, es similar a la del extracto acuoso de *J. regia* obtenido por Aranda-Ventura José *et al.* (2017), así como comparable con la actividad del antioxidante sintético butilhidroxitolueno (BHT) reportada por Elansary y colaboradores (2020). Jahanban-Esfahlan y colaboradores (2019) estudiaron el potencial antioxidante de diversas partes de *J. regia* incluyendo cáscaras, reportando menor actividad que la encontrada en este estudio. De acuerdo con de la Cruz-Jiménez y colaboradores (2022), la IC_{50} obtenida para EERG muestra que no posee buena actividad en comparación con los extractos en estudio, otros autores reportan para extractos alcohólicos de *R. graveolens*

Tabla 3. Concentración media requerida para la inhibición del radical DPPH.

Table 3. Average concentration required for the DPPH radical inhibition.

EXTRACTO	CI_{50} (μ g/mL)
Ácido ascórbico	3.911
EMJR	2.759
EERO	31.653
EERU	237.843

IC₅₀ mayores que las encontradas en el estudio (Elansary *et al.*, 2020). Los extractos analizados mostraron actividad dosis dependiente como lo mencionan Oliveira y colaboradores (2008); factores como el tiempo entre recolección y extracción, reacciones entre el solvente de extracción y compuestos fenólicos e incluso factores nutrimentales y ecológicos *in situ* de la planta pueden ser causantes de la poca efectividad como agente antioxidante del extracto (Cao *et al.*, 2019; Srivastava *et al.*, 2021). Aportar compuestos con actividad antioxidante durante la infección de *H. pylori* es importante debido a que se producen sustancias reactivas al oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) causantes de inflamación y desencadenantes del desarrollo de cáncer gástrico (Butcher *et al.*, 2017), por lo que la destacada actividad mostrada por el EEJR es un indicativo indirecto de su de su efectividad contra *H. pylori*.

Actividad tóxica

Los resultados mostrados en la Tabla 4 corresponden a la actividad de los extractos en estudio, la clasificación de toxicidad se asigna de acuerdo con lo establecido por Nguta *et al.*, 2011 donde los extractos pueden clasificarse de acuerdo con su DL₅₀ en: No tóxicos (DL₅₀ ≥ a 1000 µg/mL), débilmente tóxicos (DL₅₀ de 500 a 1000 µg/mL), moderadamente tóxicos (DL₅₀ de 100 a 500 µg/mL) y fuertemente tóxicos (DL₅₀ ≤ 100 µg/mL). Para extractos hidroalcohólicos de *R. officinalis* se han reportado valores de DL₅₀ de 470 µg/mL (Kabubii *et al.*, 2015) y 230 µg/mL (Perales Martínez, 2019) clasificándolos como débilmente tóxicos, coincidiendo con lo obtenido para el EERO en estudio. Para el EMJR se encuentra que las DL₅₀ obtenidas en este estudio son menores a las reportadas por otros autores (Aranda-Ventura José *et al.*, 2017; Martínez-Báez Adbel Z. *et al.*, 2016), quienes reportan DL₅₀ ≥ 1000 µg/mL, clasificando sus extractos como no tóxico. Referente a las DL₅₀ del EERG se encuentran reportados resultados muy variados que van desde 5.39 µg/mL (Hamidi *et al.*, 2014) hasta 2,200 µg/mL (Mahboob *et al.*, 2015), las diferencias en las dosis reportadas en los diferentes extractos se relacionan con factores abióticos, métodos y solventes utilizados para la extracción que afectan de forma directa el tipo y cantidad de metabolitos presentes y repercuten de forma directa en la actividad que muestra el extracto.

Actividad antibacteriana

La prueba de evaluación bactericida de los extractos sobre *H. pylori* utilizando el método de difusión en disco demuestra la bacteria presenta sensibilidad moderada a los extractos EERO y EERG, siendo el EERG el extracto con mejor

Tabla 4. Actividad tóxica de los extractos sobre *A. salina* y su clasificación tóxica.

Table 4. Toxic activity of extracts on *A. salina* and its toxic classification.

EXTRACTO	DL ₅₀ (µg/mL)	CLASIFICACIÓN
EMJR	307.44	Moderada
EERG	296.105	Moderada
EERO	572.267	Débil
Dicromato	22	Muy tóxico

actividad seguido por el EERO, los resultados de los halos de inhibición se muestran en la Tabla 5. Salehi y colaboradores (2018) reportan para extractos polares de hojas de romero halos de inhibición con valores de 20 mm y CMI de entre 1.25 y 10 mg/mL; para el caso de extractos de ruda reporta zonas de inhibición de 10 mm y CMI de entre 1.25 y 10 mg/mL, Osman y colaboradores (2015) reportan para *R. graveolens* CMI menores a 2 mg/mL, valores similares a los obtenidos en el presente estudio. El porcentaje de inhibición ocasionado por los extractos puede verse limitado por las cuestiones de permeabilidad de la célula a compuestos de carácter polar como los que se encuentran en los extractos etanólicos probados, la naturaleza propia de la bacteria (Gram negativa), lo que limita su pase al interior de la célula y condiciona por lo tanto su actividad (Gutiérrez García, 2015).

Tabla 5. Resultados de los halos de inhibición, causadas por los extractos, utilizando el método de difusión en discos. Los resultados mostrados son la media ± la desviación estándar de 3 réplicas.

Table 5. Results of the inhibition halos, caused by extracts, using the disk diffusion method. The results showed the average ± standard deviation of 3 replicates.

Actividad antibacteriana de extractos		
Muestra	Actividad	Halo (mm)
EMJR	-	NA
EERG	++	12.7± 0.06
EERO	++	11.20±0
Gentamicina (C+)	++++	35.7± 0.12
Metanol/ Etanol (C-)	-	0

Actividad sobre la formación de biopelícula

Los extractos que presentaron actividad contra *H. pylori* fueron utilizados para determinar su actividad sobre la formación de biopelícula. Las pruebas realizadas con los EERO y EERG, mostraron que solo el primero posee actividad para inhibir la formación de la biopelícula, Song y colaboradores (2018) reportaron la actividad de *R. officinalis* contra la formación de la biopelícula de bacterias como *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* a dosis de 0.1 % v/v, teniendo una inhibición del 50 % de la biopelícula. Los valores porcentuales de inhibición obtenidos en el presente estudio, mostrados en la Tabla 6, son consistentes con los obtenidos por Tran Trung *et al.* (2020) quienes estudiaron el efecto de

Tabla 6. Evaluación de la inhibición porcentual de la formación de biopelícula causada por los extractos.

Table 6. Evaluation of the inhibition percentage of biofilm caused by the extracts.

Extracto	Concentración del tratamiento	Inhibición porcentual obtenida
EERO	0.5 mg/mL	35.85 %
	1 mg/mL	Sin Actividad
	3 mg/mL	83.79 %
EERU	0.5 mg/mL	
	1 mg/ mL	Sin Actividad
EMJR	3 mg/mL	
	0.5 mg/mL	
	1 mg/mL	Sin Actividad
	3 mg/mL	

la inhibición en la formación de biopelícula por cepas de *H. pylori* ATCC 43504, reportando porcentajes de inhibición del 39.5 % para la mircetina y entre 52.7 y 85.9 % para la naringenina. La diferencia en las concentraciones utilizadas para obtener el efecto inhibitorio similar, se deben a que el extracto probado en el presente estudio es un extracto crudo.

CONCLUSIÓN

De los extractos en estudio el EERG fue el extracto que mostró mejor actividad antimicrobiana, generando el halo de inhibición más extenso, así como la menor MIC, no mostró capacidad para inhibir la formación de la biopelícula, fue el extracto con menor actividad antioxidante y una actividad tóxica moderada. El EERO fue el único de los extractos que demostró la capacidad para inhibir la formación de la biopelícula, actividad tóxica débil y una mejor actividad antioxidante en comparación con el EERG. El EMJR fue el extracto que mostró la mayor actividad antioxidante entre extractos e incluso mayor que el ácido ascórbico utilizado como control, actividad tóxica moderada y nula actividad antibacteriana y sin capacidad para inhibir el crecimiento de la biopelícula. Los resultados obtenidos demuestran que los extractos analizados manifiestan actividad biológica contra *H. pylori* y podrían ser utilizados como fuente de compuestos en la búsqueda de alternativas para el tratamiento contra esta bacteria.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca escolar No. 514967 para el autor de correspondencia.

REFERENCIAS

- Adam, O.A.O., Abadi, R.S.M. y Ayoub, S.M.H. 2019. Effect of extraction method and solvents on yield and antioxidant activity of certain sudanese medicinal plant extracts. *The Journal of Phytopharmacology* 8 (5), 248-252. <https://doi.org/10.31254/phyto.2019.8507>.
- Aranda-Ventura, J., Villacrés Vallejo, J., García-de Sotero, D., Sotero Solís, V., Vásquez Torres, D., Monteiro Temmerman, Ú., González-Aspajo, G., Mego Bardales, R. y Vigo Alfaro, W. 2017. Toxicidad, actividad antioxidante in vitro e hipoglicemiantes in vitro e in vivo del extracto acuoso de *Juglans neotropica* Diels (nogal peruano). *Revista Peruana de Medicina Integrativa* [en línea]. 1(4). <https://doi.org/10.26722/rpmi.2016.14.37>.
- Ashraf, M.A., Iqbal, M., Rasheed, R., Hussain, I., Riaz, M., y Arif, M.S. 2018. Environmental stress and secondary metabolites in plants: An Overview, in: *Plant metabolites and regulation under environmental stress*. Elsevier, pp. 153-167. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812689-9.00008-X>.
- Ayala, G., Escobedo-Hinojosa, W.I., de La Cruz-Herrera, C.F., y Romero, I. 2014. Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. *World Journal of Gastroenterology* 20(6), 1450-1469. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i6.1450>.
- Bonifácio, B.V., dos Santos Ramos, M.A., da Silva, P.B., y Bauab, T.M. 2014. Antimicrobial activity of natural products against *Helicobacter pylori*: a review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 13(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s12941-014-0054-0>.
- Butcher, L. D., den Hartog, G., Ernst, P. B. y Crowe, S. E. 2017. Oxidative stress resulting from *Helicobacter pylori* infection contributes to gastric carcinogenesis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 3(3), 316-322. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.02.002>.
- Cao, Y., Fang, S., Fu, X., Shang, X., y Yang, W. 2019. Seasonal variation in phenolic compounds and antioxidant activity in leaves of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja. *Forests* 10(8), 624. <https://doi.org/10.3390/f10080624>.
- Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), author Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Eighteenth informational supplement. *M100-S18*. 2008;28(1):34-52.
- Colucci-D'Amato, L., y Cimaglia, G. 2020. *Ruta graveolens* as a potential source of neuroactive compounds to promote and restore neural functions. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 10(3), 309-314. <https://doi.org/10.1016/j.jtcm.2020.05.002>.
- De La Cruz-Jiménez, L., Hernández-Torres, M.A., Monroy-García, I.N., Rivas-Morales, C., Verde-Star, M.J., Gonzalez-Villasana, V. y Viveros-Valdez, E. 2022. Biological activities of seven medicinal plants used in Chiapas, Mexico. *Plants*. 11(14), 1790. <https://doi.org/10.3390/plants11141790>.
- Elansary, H.O., Szopa, A., Kubica, P., Ekiert, H., El-Ansary, D.O., Al-Mana, F.A. y Mahmoud, E.A. 2020. Polyphenol content and biological activities of *Ruta graveolens* L. and *Artemisia abrotanum* L. in Northern Saudi Arabia. *Processes*. 8(5), <https://doi.org/10.3390/PR8050531>.
- Gutiérrez Avella M.D., Ortiz García A.C., y Cisneros, A.M. 2008. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. *Simposio Metrología* 2008 1-5.
- Gutiérrez García, G. d. J. 2015. Evaluación de la actividad antimicrobiana de un extracto de tallo de *Yucca baccata* y su uso potencial como conservador en homogenizado de pollo. Tesis maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Disponible en: <https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/33/1/Gutiérrez%20García%20Guadalupe%20de%20Jesús.pdf>
- Hathroubi, S., Servetas, S.L., Windham, I., Merrell, D.S., y Ottemann, K.M., 2018. *Helicobacter pylori* biofilm formation and its potential role in pathogenesis. *Microbiol Mol Biol*. 82(2), 1-15. [https://doi.org/10.1128/MMBR.82\(2\).1-15](https://doi.org/10.1128/MMBR.82(2).1-15).
- Hudzicki J. 2009. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *American Society for Microbiology*. 1-23.
- Jahanban-Esfahlan, A., Ostadrahimi, A., Tabibiazar, M. y Amarowicz, R. 2019. A comparative review on the extraction, antioxidant content and antioxidant potential of different parts of walnut (*Juglans regia* L.) *Fruit and Tree Molecules*.24(11), 2133. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24112133>.
- Jinous A. 2012. Phytochemistry and pharmacological properties of *Ruta graveolens* L. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6(23). <https://doi.org/10.5897/jmpr12.040>.

- Kabubii, Z.N., Mbaria, J.M., y Mbaabu, P.M. 2015. Phytochemical composition and Brine Shrimp cytotoxicity effect of *Rosmarinus officinalis*. American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS) 11, 127-135.
- Karadağ, A.E., Demirci, B., Çaşkurlu, A., Demirci, F., Okur, M.E., Orak, D., Sipahi, H., y Başer, K.H.C. 2019. In vitro antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. flower extract fractions. South African Journal of Botany 125, 214-220. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.07.039>.
- Mahboob, A., Ghazala, S., Akram, M. y Ali, S.M. 2015. Investigation of citotoxic activity oh hidroalcoholic extracto of medicinal plants using *Artemia salina* (brine shrimp test). Latin American Applied Research - An international journal [en línea]. 45(4), 231-232.: <https://doi.org/10.52292/j.laar.2015.403>.
- Martínez-Báez A.Z., Oranday-Cárdena A., Verde-Star J., Arévalo-Niño K., Ibarra-Salas M. de J., González-González G.M., y Rodríguez-Garza R.G. 2016. Estudio preliminar sobre la actividad antioxidante y antibacteriana de los extractos metanólicos de *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans* y *Magnolia grandiflora*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 47, 36-44.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.A., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., y Mclaughlin, J.L. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. Planta Medica 45(05), 31-34.: <https://doi.org/https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>.
- Nguta, Mbaria, J.M., Gathumbi, J.M., Kabasa, P.K., y Kiama, J.D. 2011. Biological screening of Kenya medicinal plants using artemia salina (ARTEMIIDAE). Pharmacologyonline. 2. 458-478.
- Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L., y Pereira, J.A. 2008. Total phenols antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. Food and Chemical Toxicology 46(7), 2326-2331. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.03.017>
- Osman, S., Jamil, L., y Ramadan, M.A. 2015. Bioactivity Guided Study of Anti-helicobacter Activity of *Ruta graveolens*, Article in International Journal of Applied Research in Natural Products. 8(3), 1-5.
- Palacios Espinosa F., Escobedo Hinojosa W., Romero I. 2011. Panorama actual de estudio de las plantas con actividad anti- *Helicobacter pylori*. TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas 14(1), 51-61.
- Perales Martínez, Y. 2019. Evaluación in vitro de antisépticos de origen natural contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*. Tesis maestría, UANL.
- Hamidi, M.R., Jovanova, B. y Panovska, T.K. 2014. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. Macedonian Pharmaceutical Bulletin. 60(01), 9-18. <https://doi: 10.33320/maced.pharm.bull.2014.60.01.002>.
- Salehi, B., Id, F.S., Id, M.M., y Rajkovic, J. 2018. Phytochemicals in *Helicobacter pylori* Infections: What Are We Doing Now? International Journal of Molecular Sciences. 19(8), 2361. <https://doi.org/10.3390/ijms19082361>.
- Shaikh, J.R., y Patil, M. 2020. Qualitative tests for preliminary phytochemical screening: An overview. International Journal of Chemical Studies 8(2), 603-608. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i2i.8834>
- Shao, X., Xie, Y., Zhang, Y. y Deng, X. 2019. Biofilm Formation Assay in *Pseudomonas syringae*. BIO-PROTOCOL. 9(10). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3237>
- Song, X., Xia, Y., He, Z., y Zhang, H. 2018. A Review of Natural Products with Anti-Biofilm Activity. Current Organic Chemistry 22(8), 789-817. <https://doi.org/10.2174/1385272821666170620110041>
- Srivastava, A.K., Mishra, P., y Mishra, A.K. 2021. Effect of climate change on plant secondary metabolism: An ecological perspective, in: Evolutionary Diversity as a Source for Anticancer Molecules. Elsevier, pp. 47-76. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821710-8.00003-5>
- Tambun, R., Alexander, V., y Ginting, Y. 2021. Performance comparison of maceration method, soxhletation method, and microwave-assisted extraction in extracting active compounds from soursop leaves (*Annona muricata*): A review. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering 1122(1), 012095. <https://doi.org/10.1088/1757-899x/1122/1/012095>
- Tran Trung, H., Truong Thi Huynh, H., Nguyen Thi Thuy, L., Nguyen Van Minh, H., Thi Nguyen, M.N., y Luong Thi, M.N. 2020. Growth-inhibiting, bactericidal, antibiofilm, and urease inhibitory activities of *Hibiscus rosa sinensis* L. flower constituents toward antibiotic sensitive- And resistant-strains of *Helicobacter pylori*. ACS Omega 5(32), 20080-20089. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01640>
- Verde-Star, M.J., García-González, S., y Rivas-Morales, C. 2016. Metodología científica para el estudio de plantas medicinales, in: Investigación En Plantas de Importancia Médica. OmniaScience, pp. 1-40. <https://doi.org/10.3926/oms.315>.
- Verma, N. y Shukla, S. 2015. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2(4), 105-113. <https://doi.org/10.1016/J.JARMAP.2015.09.002>
- World Gastroenterology Organisation (WGO) [en línea]. (sin fecha). *World Gastroenterology Organisation (WGO)*. [Consultado el 4 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/helicobacter-pylori/helicobacter-pylori-spanish>.
- Zhang, Y.-G., Kan, H., Chen, S.-X., Thakur, K., Wang, S., Zhang, J.-G., Shang, Y.-F., Wei, Z.-J. 2020. Comparison of phenolic compounds extracted from *Diaphragma juglandis* fructus, walnut pellicle, and flowers of *Juglans regia* using methanol, ultrasonic wave, and enzyme assisted-extraction. Food Chemistry. 321, 126672. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126672>.