

Actividad bactericida de extractos acuosos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown contra *Helicobacter pylori*

Antibacterial activity of aqueous extracts of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown against *Helicobacter pylori*

Sandra C. Henao R., MSc,¹ Julián David Martínez M., MD,² Natalia L. Pacheco G.,³ Juan Camilo Marín L., MenC, PhD.⁴

¹ Profesora Asociada, Departamento de Microbiología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia

² Profesor Asociado, Departamento de Medicina, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia

³ Estudiante de Bacteriología, Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá, Colombia

⁴ Profesor Asistente, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia

Fecha recibido: 08-11-10
Fecha aceptado: 06-04-11

Resumen

Lippia alba (Mill) N.E. Brown es una planta medicinal conocida en Colombia como “prontoalivio” y que se emplea para el tratamiento de múltiples dolencias gastrointestinales. El aceite esencial, los extractos acuosos y alcohólicos obtenidos de la planta han mostrado poder antibacteriano, antiviral, antiparasitario y antimicótico.

En el presente estudio, se determinó el efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de las hojas de *Lippia alba* contra tres aislados de *Helicobacter pylori*.

Se requieren estudios adicionales que permitan establecer el potencial uso clínico del extracto acuoso en combinación con los tratamientos antibióticos.

Palabras clave

Helicobacter pylori, *Lippia alba*, inhibición, actividad bactericida.

Abstract

Lippia alba (Mill) N.E. Brown is a medicinal plant known in Colombia as “prontoalivio” (= fast relief). It is used for the treatment of multiple gastro-intestinal ailments. The essential oil, the aqueous and alcoholic extracts obtained from the plant have demonstrated antibacterial, antiviral, anti-parasitic and antimycotic power.

In the current *in vitro* study of the aqueous extracts from *Lippia alba* leaves against three isolated *Helicobacter pylori* cultures, it was determined that there was an antibacterial effect.

There are needed additional studies that allow to establish the potential clinical use of the aqueous extracts in combination with the antibiotic treatment.

Key words

Helicobacter pylori, *Lippia alba*, inhibition, antibacterial activity.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori coloniza y permanece en la mucosa gástrica humana desencadenando una importante respuesta inflamatoria. La infección se adquiere principalmente en la infancia, persiste por años o por toda la vida y la presencia de la bacteria en la mucosa gástrica se asocia con diferentes tipos de gastritis crónica, con úlceras pépticas y tumores malignos como linfomas de tipo MALT (de su sigla en inglés Mucosal Associated

Lymphoid Tissue) y adenocarcinomas (1). En varios estudios, se ha asociado a enfermedades extradigestivas como la enfermedad coronaria, el fenómeno de Raynaud y enfermedades inmunitarias (2). Desde 1994, la Agencia Internacional para la investigación del Cáncer de la Organización Mundial de la Salud, lo ha incluido entre los agentes cancerígenos de tipo 1. Se estima que más del 60% de la población mundial está infectada por *H pylori*, convirtiéndose en la infección bacteriana crónica más común de los humanos (3, 4).

En Colombia se han reportado prevalencias de la infección en niños y adultos sometidos a endoscopia digestiva alta del 61% y 70%, respectivamente (5, 6).

En la actualidad se recomienda para el tratamiento de erradicación de la bacteria, la utilización por 10 ó más días de medicamentos inhibidores de la bomba de protones (omeprazol, lansoprazol, etc.) y dos antibióticos como la amoxicilina y la claritromicina; sin embargo, aproximadamente el 20% de los tratamientos fracasa en erradicar la bacteria, debido principalmente a la resistencia bacteriana a los antibióticos y a la falta de adherencia de los pacientes a los esquemas terapéuticos (7, 8).

En Colombia, se ha determinado la resistencia al metronidazol en más del 80% de las cepas de *H. pylori* estudiadas, por lo que no se recomienda el uso de este medicamento con fines terapéuticos en nuestro país (9). También se reporta un aumento en las cifras de resistencia primaria a la claritromicina en todo el mundo; los informes internacionales muestran prevalencias de resistencia para este fármaco que van desde el 1% al 58% de los aislados de *H. pylori*. En Colombia, se ha determinado una resistencia del 15% de los aislados bacterianos (8, 10-12).

La utilización de plantas o de sus extractos para la curación de diversas infecciones es una práctica antigua, conocida por múltiples culturas y de amplia utilización en la actualidad (13-17).

La gran frecuencia de síntomas digestivos (dispepsia, dolor abdominal, alteraciones del hábito intestinal, etc.) y de enfermedades reconocidas (reflujo gastroesofágico, gastritis, úlceras pépticas, enfermedad diarreica, etc.) en la población humana, hace que la utilización de plantas sea la primera medida terapéutica que se realiza, por su fácil disponibilidad, bajos costos económicos y efectividad (18-21).

La alta prevalencia de enfermedades asociadas a la infección por *H. pylori*, la creciente resistencia del microorganismo a los antibióticos, con el subsecuente fracaso terapéutico, el aumento de los costos económicos de los tratamientos; ha motivado a que desde hace varios años, se intenten opciones de tratamiento con plantas tradicionales de varias regiones del mundo (22-33).

Lippia alba (Mill.) N.E.Br. ex Britt & Wils. (*Verbenaceae*), conocida en Colombia como "prontoalivio", es un arbusto originario del bosque seco tropical y subtropical americano, que crece en ambientes donde la intensidad lumínica pueda ser alta. La distribución natural de esta planta aromática es amplia; desde el sur de los Estados Unidos, toda Centro América y América del Sur hasta el norte de Argentina. Tradicionalmente, se emplean infusiones de las hojas y las flores como sedante, digestivo, febrífugo, carminativo, espasmolítico, emenagogo, antidiarreico, dolores en general y en diversas afecciones estomacales (34-37).

Estudios realizados del aceite esencial de hojas de *Lippia alba*, cultivada en diferentes regiones de Colombia, muestran la existencia de tres quimiotipos en los departamentos de Cundinamarca, Tolima, Boyacá, Valle del Cauca, Santander, Antioquia, Quindío y Cesar; se encuentra el quimiotipo A caracterizado por su alto contenido de carvona (41%) y limoneno (36%) también denominado quimiotipo III (38).

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antibacteriana del extracto acuoso de *Lippia alba* contra *H. pylori* (prontoalivio) planta de uso tradicional en toda América Latina para el manejo de la dispepsia, el dolor abdominal y cuadros diarreicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Planta: *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. ex Britt. & Wils. (*Verbenaceae*) fue recolectada en septiembre de 2009 en la finca Las Alicia's (N 05° 52' 41" O 73° 40' 33"); temperatura 20°C, 86% HR, PAR 338 $\mu\text{moles/m}^2\text{seg}$ en la vereda Peñitas, Puente Nacional, Santander; registro Herbario Nacional COL 511011 (J. L. Fernández-2005).

Preparación de los extractos

Lippia alba: Para la obtención del extracto liofilizado, se tomaron 50 g de hojas de *L. alba* secas y molidas. Posteriormente se tomó una parte de la planta por diez volúmenes de agua. Para la maceración inicial se tomaron 1 parte de la planta y 3 partes de agua caliente (90 °C). La mezcla obtenida fue macerada con mortero y pistilo y se dejó en reposo durante quince (15) minutos; después se colocó la solución en un baño María y se dejó en agitación constante, a una temperatura por debajo de 90°C durante 5 minutos. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró por embudo por el método Buchner y el extracto obtenido fue liofilizado obteniéndose 2.419 g de *Lippia alba* (39).

Aislados bacterianos de *H. pylori*: Se evaluaron dos aislados de *H. pylori* procedentes del cepario del Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia obtenidos de pacientes con diagnóstico de úlcera gástrica y gastritis crónica erosiva y la cepa de referencia NCTC 11637. Estas muestras estaban preservadas a -70°C en caldo BHI (MERCK) más 20% de glicerol. Estos aislados se recuperaron en agar Wilkins Chalgren, suplementado con suero de caballo al 7% (DIFCO), Vitox (OXOID SR0091), y suplemento antibiótico para *H. pylori* (OXOID SR0147), los cultivos fueron colocados en incubadora de CO₂ en condiciones de microaerofilia, humedad y temperatura adecuadas para su

crecimiento, las bacterias fueron identificadas por la coloración de Gram y las reacciones de ureasa, catalasa y oxidasa.

Evaluación de los extractos acuosos

Preparación de la bacteria: Se preparó un inóculo de cada una de cepas bacterianas en agua destilada estéril, se homogenizaron en agitador Vórtex por 30 segundos, la suspensión fue calibrada nefelométricamente con la escala Mac Farland (10^8 UFC).

Preparación de los extractos acuosos: Con el liofilizado obtenido de *Lippia alba* se realizaron diluciones en agua destilada estéril, las concentraciones finales fueron de 100, 50, 25, 5, 0,5 y 0,25 mg/ml del extracto de la planta.

Determinación bactericida del extracto: La actividad bactericida de los extractos acuosos fue determinada por la técnica descrita previamente por O'Mahony y colaboradores (27). Cada una de las concentraciones del extracto de *L. alba* (100, 50, 25, 5, 0,5 y 0,25 mg/ml) se pusieron en contacto con los tres inóculos bacterianos, cepa NCTC 11637, los aislados M8 procedentes de una paciente con úlcera gástrica y el M10 procedentes de un paciente con gastritis erosiva durante un periodo de 20 minutos. De cada uno de los ensayos se sembraron 150 ml en cajas de Petri con Agar Wilkins-Chalgren (Becton-Dickinson) enriquecido con suero de caballo al 7% y Vitox (OXOID), y fueron llevados a incubación en condiciones de microaerofilia. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado. La efectividad bactericida de los extractos acuosos contra los diferentes aislados de *H. pylori* se evaluó observando la inhibición del crecimiento bacteriano comparándolo con el control de viabilidad de cada uno de los ensayos y los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano (27, 40, 41).

RESULTADOS

El extracto acuoso de *L. alba* fue evaluado a diferentes concentraciones para establecer si presentaba inhibición del crecimiento *H. pylori* y determinar la concentración mínima bactericida del extracto en un periodo de exposición de 20 minutos. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 1, donde se observan las diferentes concentraciones a las que fue probado el extracto acuoso, el tiempo y los porcentajes de inhibición del crecimiento de los aislados obtenidos de pacientes con patologías gástricas y de la cepa de referencia NCTC 11637.

En la tabla 1 se aprecia que el extracto acuoso de *Lippia alba* presenta una inhibición completa del crecimiento bacteriano a los 20 minutos con las tres cepas analizadas; se encontró una concentración mínima bactericida (CMB) de 0,5 mg/ml y se observó que entre mayor es el tiempo de

exposición del inóculo bacteriano al extracto acuoso mayor será la actividad bactericida. Este extracto posee un alto efecto inhibitorio en la crecimiento de *H. pylori*.

Tabla 1. Actividad bactericida de extractos acuosos de *Lippia alba* contra *Helicobacter pylori*.

Extracto acuoso <i>Lippia alba</i> Concentración	Aislados <i>Helicobacter pylori</i>		
	NCTC 11637	M 8	M 10
100 mg/ml	Inhibición 100%	Inhibición 100%	Inhibición 100%
50 mg/ml	Inhibición 100%	Inhibición 100%	Inhibición 100%
25 mg/ml	Inhibición 100%	Inhibición 100%	Inhibición 100%
5 mg/ml	Inhibición 100%	Inhibición 100%	Inhibición 100%
0,5 mg/ml	Inhibición 100%	Inhibición 100%	Inhibición 100%
0,25 mg/ml	Inhibición 0%	Inhibición 0%	Inhibición 0%

DISCUSIÓN

Al considerar factores como la alta prevalencia de enfermedades gastroduodenales benignas y malignas asociadas a la infección por *Helicobacter pylori*, la falta de adherencia a los tratamientos, los efectos indeseados de la terapia combinada, la creciente resistencia del microorganismo a los antibióticos y los subsiguientes fracasos terapéuticos que conllevan al aumento creciente en los costos económicos, es necesario plantear la búsqueda de opciones terapéuticas nuevas y seguras que permitan mejorar las tasas de erradicación de la bacteria. En países en vías de desarrollo, especialmente en poblaciones rurales y marginales de los centros urbanos, la utilización de preparados (infusiones, decocciones, etc.) a partir de plantas es la primera opción terapéutica debido a su disponibilidad, bajos costos y efectividad, surgiendo así como una alternativa terapéutica viable.

En Colombia es ampliamente reconocido el uso tradicional de plantas medicinales para el tratamiento de diferentes dolencias gastrointestinales (35). Entre otros antecedentes, se tiene que el estudio realizado con los extractos acuosos de diferentes especies vegetales de amplio uso culinario y medicinal en Asia (*Cúrcuma longa*, *Borago officinalis*, *Capsicum annum*, *Zingiber officinale*, *Origanum vulgare*, *Nigella sativa* y *Cuminum cyminum*) reporta un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de siete cepas de *H. pylori* (27). Adicionalmente, Castillo-Juárez y cols, estudiaron la actividad antibacteriana in vitro de 53 plantas medicinales que se emplean tradicionalmente en México, y utilizando la técnica de dilución en agar sobre varias cepas de *H. pylori* encontraron que los mayores efectos inhibitorios se presentaron con los extractos acuosos de *Artemisia ludovi-*

ciana subsp. mexicana, *Cuphea aequipetala*, *Ludwigia repens* y *Mentha piperita* (42).

El objetivo de este trabajo fue evaluar si el extracto acuoso de *Lippia alba*, planta de amplia distribución en Colombia, de fácil adquisición y bajo costo económico, posee propiedades inhibitorias sobre el crecimiento de aislados de *H. pylori*. Los principales usos tradicionales reportados para esta planta están relacionados con problemas gastrointestinales, respiratorios, cardiovasculares y en desórdenes del sueño o ansiedad. Además, diversas publicaciones han evaluado las propiedades antiviral, antifúngica, antiprotzoaria, neurosedante, analgésica, antiinflamatoria, antioxidante y cardiovascular de extractos obtenidos de *L. alba* (37, 48-50).

El aceite esencial demostró actividad antibacteriana en especial contra gérmenes grampositivos, con valores de las concentraciones inhibitorias mínimas entre 0,3 y 0,63 mg/mlw. Los extractos alcohólicos (etanólico y metanólico) de las raíces de *Lippia alba* mostraron actividad bactericida contra las cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P, ATCC 6538), *Klebsiella pneumonia* (ATCC 10031) (44). Los aceites esenciales de *Lippia alba* mostraron actividad inhibitoria del crecimiento de las cepas de *C. albicans* (ATCC 14053), *S. aureus* (ATCC 6538) y *E. coli* (ATCC 25992) (45). Los extractos clorofórmicos, acetónicos, etanólicos de la raíz de *Lippia alba* mostraron actividad antimicrobiana in vitro (por la técnica de disco de papel) contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Candida albicans*, *Monilia sitophila*. El extracto etanólico de *Lippia alba* sirve como antibacteriano (inhibe crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus*) y antimicótico (*Aspergillus Níger*) (43-47).

Los aceites esenciales de la *Lippia alba*, citral y carvona mostraron actividad antimicótica contra *Aspergillus fumigatus* y *Candida krusei* (48). Además, recientemente se ha demostrado efecto inhibitorio sobre virus patógenos humanos de alta prevalencia en América latina como son el virus de la fiebre amarilla y virus del dengue (49, 50).

Al momento de la elaboración del manuscrito no se encontraron referencias relacionadas con la utilización de extractos acuosos de esta especie vegetal como bactericida contra *H. pylori*. Quizás el único acercamiento para establecer la actividad antiulcerogénica, más no anti-*H. pylori*, fue el trabajo experimental desarrollado por Pascual y colaboradores, donde se informó que la infusión de *Lippia alba* a una dosis de 12,5 g de planta seca/kg de peso mostró un efecto protector ante la agresión por indometacina a dosis de 50 mg/kg p.o durante cinco días y ningún efecto lesivo en la mucosa gástrica de ratas Wistar (51). Este hallazgo, aunado con los resultados obtenidos en este estudio donde se observó inhibición del crecimiento de tres aislados de *H. pylori* (una cepa de referencia y dos aislados de pacientes)

por parte del extracto acuoso de *L. alba* a una concentración mínima bactericida de 0,5 mg/ml, en un tiempo de contacto no mayor de 20 minutos, plantean la potencial utilidad terapéutica de la planta en personas con diferentes formas de gastritis y con úlceras pépticas aprovechando el efecto gastroprotector e inhibidor de la planta sobre *H. pylori*.

Es importante resaltar que el empleo de *L. alba* en infusión representa una ventaja logística sobre los procesos empleados para la obtención de los preparados de *L. alba* comúnmente reportados como antibacterianos (aceite esencial y extracto alcohólico), ya que estos requieren de una infraestructura específica y de la participación de personal calificado, condiciones no siempre disponibles para las poblaciones más vulnerables económicamente.

En conclusión, reportamos por primera vez el efecto inhibitorio in vitro del extracto acuoso de *Lippia alba* sobre el crecimiento de *H. pylori*. Se requieren estudios adicionales que permitan establecer el potencial uso clínico del extracto acuoso, ya sea solo o en combinación con la terapia triple empleada actualmente. Algo similar a lo que se pretende realizar en un futuro con *L. alba* se ha publicado recientemente para otra especie. La investigación llevada a cabo fue un estudio clínico con *Nigella sativa* que demostró que la utilización de la planta a una dosis de 2 g/día en combinación con omeprazol 40 mg/día tiene una tasa de erradicación de *H. pylori* del 67% comparada con la terapia triconjugada (omeprazol, amoxicilina, claritromicina por 10 días) que mostró una tasa de erradicación del 82% (52).

El aumento en la prevalencia en la resistencia del *H. pylori* a los antibióticos, plantea la necesidad de encontrar nuevas y seguras modalidades terapéuticas para la erradicación de la infección y el tratamiento de diversas enfermedades gastroduodenales. El empleo en humanos de extractos vegetales solos o en combinación con antibióticos es una de esas potenciales alternativas terapéuticas que deben explorarse.

Agradecimientos

A Alicia Morales y Gonzalo Arteaga por suministrar la planta. Endocentro LTDA por la financiación parcial del estudio.

Conflictos de interés

Los autores declaran no poseer ningún conflicto de interés

REFERENCIAS

1. Makola D, Peura DA, Crowe SE. *Helicobacter pylori* infection and related gastrointestinal diseases. J Clin Gastroenterol 2007; 41: 548-558.

2. Gasbarrini A, Franceschi F, Armuzzi A. Extradigestives manifestations of *Helicobacter pylori* gastric infection. *Gut* 1999; 45: 19-112.
3. International Agency for Research on Cancer, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon, IARC 1994; 61: 177-200.
4. Cover TL, Blazer MJ. *Helicobacter pylori*, a paradigm for chronic mucosa inflammation: Pathogenesis and implication for eradication and prevention. *Adv Int Med* 1996; 41: 85-117.
5. Bedoya A, Arcos M, Sansón F, del Castillo G. *Helicobacter pylori* y cambios histológicos de la mucosa gástrica en menores de diez años. Pasto, 1999. *Rev Colomb Gastroenterol* 2002; 17: 36-42.
6. Martínez JD, Henao SC, Granados C. La Gastritis crónica atrofica y la edad. *Rev Colomb Gastroenterol* 2007; 22: 17-22.
7. Gerrits MM, van Vlier AH, Kuipers EJ, Kusters JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 699-709.
8. Ozcay F, Kocak N, Temizel IN, Demir OH, Ozen H, Yuce A et al. *Helicobacter pylori* infection in Turkish children: comparison of diagnosis test, evaluation of eradication rate, and change symptoms after eradication. *Helicobacter* 2004; 9: 242-248.
9. Henao SC, Otero W, Angel LA, Martínez JD. Resistencia primaria a Metronidazol en aislados de *Helicobacter pylori* en adultos de Bogotá, Colombia. *Rev Colomb Gastroenterol* 2009; 24(1): 10-15.
10. Van Doorn LJ, Schneeberger PM, Nouhan N, Plaisier AP, Quint WGV, de Boer AW. Importance of *Helicobacter pylori* vacA and cagA status for the efficacy antibiotic treatment. *Gut* 2000; 46: 321-326.
11. Mégraud F. *H pylori* Antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* 2004; 53: 1374-1384.
12. Henao SC, Quiroga A, Martínez JD, Otero W. Resistencia primaria a la claritromicina en aislados de *Helicobacter pylori*. *Rev Colomb Gastroenterol* 2009; 24(2): 110-114.
13. Murphy Cowan M. Plants Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* 1999; 12: 564-582.
14. Martin KW, Ernst E. Herbal Medicines for treatment of bacterial infections: a review of controlled clinical trial. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 51: 241-246.
15. Salvat A, Antonacci L, Fortunato RH, Suárez EY, Godoy HM. Antimicrobial activity of methanolic extracts of several plants species from northern Argentina. *Phytomedicine* 2004; 11: 230-234.
16. Meléndez PA, Carriles VA. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. *Phytomedicine* 2006; 13: 272-276.
17. Pino Benitez N, Stashenko E. Validación antibiótica de plantas medicinales de noroeste de Colombia contra *Staphylococcus aureus* Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas 2009; 8: 145-150.
18. Miller M, Mc Naughton WK, Zhang XJ, Thompson JH, Charbonnet R, Bobrowsky P, et al. Treatment of gastric ulcers and diarrhea with the Amazonian herbal medicine Sangre de grado. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G192-G200.
19. Wagner H. Multitarget Therapy- The future of treatment for more than just functional dyspepsia. *Phytomedicine* 2006; 13: 122-129.
20. Mello VJ, Gomes MT, Lemos FO, Delfino JL, Andrade SP; Lopes M et al. The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. *Phytomedicine* 2008; 15: 237-244.
21. Falcao HS, Mariath IR, Diniz MFFM, Batista LM, Barbosa-Filho JM. Plants of the American continent with antiulcer activity. *Phytomedicine* 2008; 15: 132-146.
22. You WCh, Zhang L, Gail MH, Ma JL, Chang YS, Blot W, et al. *Helicobacter pylori* infection, garlic intake and precancerous lesions in Chinese population low risk of gastric cancer. *International Journal of Epidemiology* 1998; 27: 941-944.
23. Nariman F, Eftekhari F, Habibi Z, Falsati T. Anti-*Helicobacter pylori* Activities of Six Iranian Plants. *Helicobacter* 2004; 9: 146-151.
24. Kamiji MM, de Oliveira R B. Non-antibiotic Therapies for *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 973-981.
25. Wang YC, Huang TL. Screening of anti *Helicobacter pylori* herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants. *Immunology and Medical Microbiology* 2005; 43: 295-300.
26. Lin YT, Kwon YI, Labbe RG, Shetty K. Inhibition of *Helicobacter pylori* and associated urease by Oregano and Cranberry Phytochemical Synergies. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71: 8558-8564.
27. O'Mahony R, Al-Khtheeri H, Weerasekera D, Fernando N, Vaira D, Holton J, Basset C. Bactericide and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2005; 11(47): 7499-7507.
28. Mahady GB, Bhamarapravati S, Adeniyi BA, Doyle B, Locklear T, Slover C, Pendland S. Traditional Thai Medicines inhibit *Helicobacter pylori* in vitro in vivo: Support for ethnomedical use. *Ethnobotany Research & Applications* 2006; 4: 159-165.
29. Shoaie Hasan AR, Ordouazadeh H, Ghaemi A, Amirmozafari N, Hamdi K, Nazari R. *In Vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* urease with non and semi fermented *Camellia Sinensis*. *Indian J of Medical Microbiology* 2009; 27: 30-34.
30. Claros M, Bilbao P, Damiani E, Gonzáles E, Estensoro M, Alvarez MT. Actividad anti-*Helicobacter pylori* de *Plantago major*, *Clinopodium bolivianum*, *Calendula officinalis* y *Piper angustifolium* por el método de difusión de disco. *BIOFARBO* 2007; XV: 37-42.
31. Cogo LL, Bastos C, Dallarmi M, Gomes O, Machado M, Lima M, et al. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants

- extracts traditionally used for treatment of gastrointestinal disorders. *Braz J of Microbiology* 2010; 41: 304-309.
32. Mahady GB, Pendland SL, Yun GS, Lu ZZ, Stoia A. Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and the gingerols inhibit the grow Cag A+ strains of *Helicobacter pylori*. *Anticancer Res* 2003; 23: 3699- 3702.
 33. Baldedrin A, Blunden G, Tanira M, Nemmar A. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research. *Food and Chemical Toxicology* 2008; 46: 409-420.
 34. Arnaldo L. Bandoni. Editor. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. CYTED, Ciencia y tecnología para el desarrollo. 2ª edición. 2003. p. 85.
 35. Vademécum colombiano de plantas medicinales. www.invima.gov.co.
 36. Toscano-Gonzalez JY. Uso tradicional de las plantas medicinales en la vereda San Isidro, municipio de San José de Pare-Boyacá: Un estudio preliminar usando técnicas cuantitativas. *Acta Biológica Colombiana* 2006; 11: 137-146.
 37. Hennebelle T, Sahpaz S, Joseph H, Bailleul F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology* 2007.
 38. Durán DC, Monsalve LA, Martínez JR, Stashenko E. Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de *Lippia alba* provenientes de diferentes regiones de Colombia, y efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite. *Scientia et Técnica* 2007; 33: 435-438.
 39. List PH, Schmidt PC. *Phytopharmaceutical Technology*. CRC Press. Boca Raton, Florida USA 1989. p. 15.
 40. 40-Stamatis G, Kyriazopoulos P, Golegou S, Basayiannis A, Skaltsas S, Skaltsa. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 88: 175-179.
 41. 41-Zaidi S, Yamada K, Kadowaki M, Usmanhani K, Sugiyama T. Bactericidal activity of medicinal plants, employed for the treatment of gastrointestinal ailments, against *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopathology* 2009; 121: 286-291.
 42. 42-Castillo-Juárez I, González V, Jaime-Aguilar H, Martínez G, Linares G, Bye R, Romero I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *J of Ethnopharmacology* 2009; 122: 402-405.
 43. Pino Alea JA, Ortega Luís A, Rosado Pérez A, Rodríguez Jorge M, Baluja R. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown. *Rev Cubana Farm* 1996; 30: 29-35.
 44. Sena Filho JG, Melo J, Saraiva AM, Goncalves A, Psiottano MNC, Xavier H. Antimicrobial activity and phytochemical profile from roots of *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2006; 16: 506-509.
 45. Vera JR, Pastrana PF, Fernández K, Viña A. Actividad antimicrobiana in Vitro de volátiles y no volátiles de *Lippia alba* y extracto acuoso de *Justicia Pectoralis* cultivadas en diferentes pisos térmicos del departamento del Tolima. *Scientia et Técnica* 2007; 33: 345-348.
 46. Aguiar J, Costa M, Nascimento S, Sena K. Actividad antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown (Verbenaceae) *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2008; 18: 433-440.
 47. Ara N, Nur MH, Amran MS, Wahid MII, Ahmed M. *In vitro* Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Leaves and Flowers Extracts from *Lippia alba* Pak. *J Biol Sci* 2009; 12: 87-90.
 48. Mesa-Arango AC, Montiel-Ramos J, Zapata B, Duran C, Betancur-Galvis L, Stashenko E. Citral and carvone chemotypes from essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Men Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 878-884.
 49. Meneses R, Ocazonez R, Martínez JR, Stashenko E. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombian on yellow fever virus replication *in vitro* *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2009; 8: 8-14.
 50. Ocazonez R, Meneses R, Torres F, Stashenko E. Virucidal activity of Colombian *Lippia* essential oils on dengue virus replication *in vitro*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105: 304-309.
 51. Pascual ME, Slowing K, Carretero ME, Villar A. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown (Verbenaceae) *IL Farmaco* 2001; 56: 501-504.
 52. Salem EM, Yar T, Bamosa AO, Al-Quorain A, Yasawy MI, Aisulaiman RM, et al Comparative Study of *Nigella sativa* and Triple Therapy in eradication of *Helicobacter pylori* in Patients with Non-ulcer Dyspepsia. *Saudi J Gastroenterol* 2010; 16: 207-214.