

Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a *Helicobacter pylori* y caracterización fitoquímica de fracciones y/o compuestos de *Passiflora quadrangularis*

David Felipe Zuñiga Peña

Director:

Geison Modesti Costa, PhD.
Departamento de Química
Pontificia Universidad Javeriana

Co-director:

Johan Sebastián Castañeda Ladino
Microbiólogo industrial
Pontificia Universidad Javeriana

Trabajo de grado

Programa de Microbiología Industrial

Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Departamento de Microbiología

Bogotá D.C., 2021

Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a *Helicobacter pylori* y caracterización fitoquímica de fracciones y/o compuestos de *Passiflora quadrangularis*

David Felipe Zuñiga Peña

Geison Modesti Costa
QF, MSc, PhD
Director

Johan Sebastián Castañeda
Microbiólogo Industrial
Co-Director

Claudia Liliana Cuervo
Bióloga, MSc, PhD
Evaluadora

Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a *Helicobacter pylori* y caracterización fitoquímica de fracciones y/o compuestos de *Passiflora quadrangularis*

David Felipe Zuñiga Peña

Alba Alicia Trespalacios
Bacteriologa, MSc, PhD
Decana
Facultad de Ciencias

Marcela Franco Correa
Microbiologa, MSc, PhD
Directora
Programa Microbiología Industrial

Advertencia

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1996

Agradecimientos

A mis papás, mi hermana y mi familia que me han apoyado y escuchado incondicionalmente en todo lo que he realizado a lo largo de mi vida y son los pilares de mi ser.

A mis amigos que me han escuchado, apoyado y brindado su mano cuando la he necesitado.

A las personas que he logrado conocer y que me han guiado y apoyado en todo este proceso, entre las que destaco a mis compañeros y compañeras del laboratorio de bacteriología especial y del laboratorio de fitoquímica, tales como Heidy Martínez, Laura Portela, Natalia Zamudio, Laura Rojas, Luis Carlos Chivata, Leonardo Villarreal, José Leonardo Guerrero, Ana Lucia Rangel y Andrea Hernández. Así como a Sebastián Bravo.

A mi cotutor Johan Sebastián Castañeda, quien me acompañó durante todo este tiempo, me guío e invirtió su tiempo en ayudarme en todo lo que estuvo en sus manos.

Al Dr. Geison Modesti Costa por sus conocimientos, paciencia, apoyo y guía en este difícil camino.

A la Dr. Claudia Liliana Cuervo por sus consejos, guía y corrección.

Tabla de contenidos

1. Resumen	1
2. Abstract	2
3. Introducción	3
4. Planteamiento del problema	4
5. Justificación	5
6. Marco teórico	6
6.1. <i>Helicobacter pylori</i>	6
6.2. Tratamientos frente a <i>Helicobacter pylori</i>	7
6.3. Fitoterapéuticos	8
6.4. Plantas del género <i>Passiflora</i>	9
6.5. <i>Passiflora quadrangularis</i> Linn	10
7. Objetivos	14
7.1. Objetivo general	14
7.2. Objetivo específico	14
8. Metodología	15
8.1. Material vegetal	15
8.2. Obtención de la fracción butanólica	15
8.3. Caracterización química de la fracción butanólica y/o compuestos provenientes de <i>P. quadrangularis</i>	15
8.3.1. Análisis por Cromatografía Líquida de Ultra Eficiencia acoplada a un Detector por Arreglo de Diodos (UPLC-DAD)	15
8.3.2. Análisis por Electroforesis Capilar equipada con un Detector por Arreglo de Diodos (CE-DAD)	16
8.4. Purificación de compuestos a partir de la fracción butanólica de <i>P. quadrangularis</i> Linn	16
8.5. Cultivo de <i>Helicobacter pylori</i>	17
8.6. Evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos de <i>P. quadrangularis</i> Linn frente a <i>H. pylori</i>	17
9. Resultados y discusión	19

9.1. Caracterización química de la fracción butanólica y/o compuestos provenientes de <i>Passiflora quadrangularis</i> Linn	19
9.2. Aislamiento de compuestos provenientes de la fracción butanólica de <i>P. Quadrangularis</i> Linn	25
9.2. Actividad antimicrobiana de compuestos obtenidos de la fracción butanólica de <i>P. quadrangularis</i> Linn	27
10. Conclusiones	30
11. Recomendaciones	31
12. Referencias	32

Índice de tablas

Tabla 1. Selección de fases móviles y estacionaria según tiempo de separación de las mismas.	25
Tabla 2. Actividad antimicrobiana de los compuestos aislados de la fracción butanólica de hojas de <i>P. quadrangularis</i> Linn	28

Índice de figuras

Figura 1. Esquemas terapéuticos de primera línea sobre <i>H. pylori</i>	7
Figura 2. Algunas especies del género <i>Passiflora</i>	10
Figura 3. <i>Passiflora quadrangularis</i> Linn	11
Figura 4. Flavonoides presentes en hojas de <i>P. quadrangularis</i> Linn	12
Figura 5. Quadrangulosido, saponina mayoritaria presente en hojas de <i>P. quadrangularis</i> Linn (R corresponde a gentiobiosa)	12
Figura 6. Cromatograma de UPLC de flavonoides de la fracción butanólica de hojas de <i>P. quadrangularis</i> Linn a 340nm.	20
Figura 7. Barrido espectral de la UPLC de flavonoides de la fracción butanólica de <i>P. quadrangularis</i> Linn para los picos 1(A), 2(B), 3(C), 4(D) y 5(E)	20
Figura 8. Estructura general de un flavonoide indicando la porción benzoílo y la porción cinamoílo	21
Figura 9. Cromatograma de HPLC de flavonoides del extracto acuoso de las hojas de <i>Passiflora quadrangularis</i> Linn a 340nm.	22
Figura 10. Electroferograma de CE de flavonoides de la fracción butanólica de hojas de <i>P. quadrangularis</i> Linn a 390nm.	22
Figura 11. Barrido espectral de la CE de flavonoides de la fracción butanólica de <i>P. quadrangularis</i> para el pico 1 con tiempo de migración 3,5min	23
Figura 12. Barrido espectral de la CE de flavonoides de la fracción butanólica de <i>P. quadrangularis</i> Linn para el pico 2 con tiempo de migración 3,7min	23
Figura 13. Cromatograma de UPLC de saponinas de la fracción butanólica de hojas de <i>P. quadrangularis</i> Linn a 205nm.	24
Figura 14. Cromatograma de HPLC de saponinas de extractos acuosos brutos de hojas de <i>P. alata</i> (A) y <i>P. quadrangularis</i> Linn (B) a 205nm (* corresponde a quadrangulosido).	25
Figura 15. Cromatografía en placa delgada para la selección de las fases del CPC (móvil y estacionaria).	26
Figura 16. Cromatografía en Capa Delgada para la visualización de perfiles cromatográficos específicos para saponinas (A) y saponinas (B), de las 11 subfracciones obtenidas de la fracción butanólica de hojas de <i>P. quadrangularis</i> Linn	27
Figura 17. Pruebas bioquímicas para la confirmación de <i>H. pylori</i> NCTC 11637 y NCTC 11638.	27

Resumen

Helicobacter pylori ha sido considerado un microorganismo de importancia clínica clasificado como carcinógeno de tipo I. Debido a su alta prevalencia a nivel mundial y su aumento en la resistencia frente a los antibióticos utilizados en el tratamiento convencional, se han estado investigado nuevas fuentes de moléculas activas frente a *Helicobacter pylori*, con miras a que puedan a futuro figurar como nuevas terapias para la erradicación del mismo, entre las cuales se encuentra el uso de plantas medicinales.

Se han determinado diferentes propiedades terapéuticas para *Passiflora quadrangularis* Linn, de las cuales se destaca la actividad antimicrobiana, la cual se ha determinado sobre microorganismos Gram positivos y Gram negativos, tal como *B. subtilis* y *E. coli*. De igual manera, se ha descrito en estudios previos del grupo, donde se evidencia actividad antimicrobiana sobre *H. pylori* de la fracción butanólica proveniente de hojas de esta especie, a una concentración de 250µg/mL.

Teniendo en cuenta lo anterior, este trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana sobre *Helicobacter pylori* de compuestos obtenidos de la fracción butanólica de hojas de *Passiflora quadrangularis* Linn. Adicionalmente, se identificaron los compuestos mayoritarios presentes en la fracción butanólica por medio de las técnicas de UPLC-DAD y CE-DAD, orientadas al análisis de flavonoides y saponinas.

De este modo, los flavonoides presentes en la fracción butanólica de *P. quadrangularis* Linn se identificaron como orientina-2''-O-glucosido, orientina-2''-O-xilosido, vitexina-2''-O-glucosido, vitexin-2''-O-xilosido y vitexina; asimismo, se identificó a quadrangulosido como la saponina mayoritaria de dicha fracción. Por otro lado, los compuestos evaluados en las subfracciones 6, 9, 10 y 11, con respecto a su actividad biológica, no mostraron actividad antimicrobiana a concentraciones menores a 200µg/mL, lo que sugiere que estos compuestos evaluados no corresponden a aquellos que le brindan dicha actividad a la planta o, por el contrario, que se trata de una actividad sinérgica ejercida con la mezcla de estos.

Abstract

Helicobacter pylori has been considered a clinically important microorganism classified as type I carcinogen. Due to its high prevalence worldwide and its increasing resistance against antibiotics used in conventional treatment, new sources of active molecules against *Helicobacter pylori* have been investigated, with a view to that in the future, they will appear as new therapies to its eradication, among which is the use of medicinal plants.

Different therapeutic properties have been determined to *Passiflora quadrangularis* Linn, of which the antimicrobial activity stands out, which has been determined against Gram positive and Gram negative microorganisms, such as *B. subtilis* and *E. coli*. Similarly, it has been described in previous studies of the group, where antimicrobial activity against *H. pylori* of the butanolic fraction from leaves of this species is evidenced, to a concentration of 250µg/mL.

Taking into account the above, this work aimed to evaluate the antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* of compounds obtained by CPC from the butanolic fraction of *Passiflora quadrangularis* Linn leaves. Additionally, the majority compounds present in the butanolic fraction were identified through the UPLC-DAD and CE-DAD techniques, oriented to the analysis of flavonoids and saponins.

Thus, the flavonoids present in the butanolic fraction of *P. quadrangularis* Linn were identified as orientin-2"-O-glucoside, orientin-2"-O-xyloside, vitexin-2"-O-glucoside, vitexin-2"-O-xyloside and vitexin; likewise, quadranguloside was identified as the majority saponin of this fraction. On the other hand, the compounds evaluated in sub-fractions 6, 9, 10 and 11, with respect to their biological activity, did not show antimicrobial activity at concentrations less than 200µg/mL, which suggests that these evaluated compounds do not correspond to those that provide this activity to the plant or, on other side, that it is a synergistic activity exerted with the mixture of these.

Introducción

Dentro de los microorganismos reportados por la OMS en el 2017 como patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos se encuentran en prioridad alta *Helicobacter pylori* [1], una bacteria Gram negativa que ha colonizado la mucosa gastrointestinal de aproximadamente el 50% de la población mundial, principalmente en países en vía de desarrollo o recientemente industrializados, tal como Colombia, en el cual se ha reportado una prevalencia del 69,1% [2-5]. Después de más de 20 años de emplear la triple terapia estándar como tratamiento de primera línea, está empezando a presentar tasas de eficacia inferiores al 80%, por tal razón se vio la necesidad de aplicar otros tratamientos, como la terapia cuádruple, la cual corresponde al esquema terapéutico recomendado actualmente en Colombia [6-8].

Sin embargo, con el paso del tiempo han aumentado los reportes de cepas de este microorganismo resistentes frente a los antimicrobianos empleados de manera convencional en sus diferentes tratamientos [9], razón por la cual la eficacia de estos esquemas también ha empezado a disminuir [7, 8, 9, 10, 11]. Debido a esto, se ha visto la necesidad de buscar otras alternativas terapéuticas para la erradicación de este microorganismo, como lo es el uso de compuestos provenientes de plantas medicinales, las cuales han demostrado tener un potencial terapéutico a lo largo de la historia para tratar diversas enfermedades.

Partiendo de ello, dentro del grupo de Investigación de Enfermedades Infecciosas en conjunto con el grupo de Investigación en Fitoquímica, pertenecientes a la Pontificia Universidad Javeriana, se comenzó a evaluar nuevas estrategias que puedan a futuro ser empleadas con el propósito de erradicar la infección por *H. pylori* y disminuir el riesgo de padecer cáncer gástrico a causa de este microorganismo, dentro de ellas entre las que se encuentra la evaluación de la actividad anti-*H. pylori* de compuestos provenientes de especies del género *Passiflora*, así como *P. quadrangularis* Linn.

Con base en lo anterior, en este trabajo se empleó la fracción butanólica activa de hojas de *Passiflora quadrangularis* Linn (“badea”), una especie del género *Passiflora* identificada por poseer diversas propiedades terapéuticas como la antimicrobiana [12, 13, 14], para continuar con los ensayos que se han estado realizando dentro del grupo sobre esta planta, evaluando así la actividad antimicrobiana frente a *H. pylori* de compuestos provenientes de esta fracción butanólica, por medio de la técnica de dilución en agar bajo las pautas brindadas por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) y utilizando las cepas de referencia de *H. pylori* NCTC 11637 y NCTC 11638 (National Collection of Type Cultures).

Planteamiento del problema

Helicobacter pylori presenta una alta prevalencia a nivel mundial, en especial en países en vía de desarrollo como Colombia donde se reporta una prevalencia de 69,1% [2-5], asociándose a su vez con diferentes enfermedades gastrointestinales, de las que resalta el adenocarcinoma gástrico por ocupar uno de los primeros puestos en mortalidad por cánceres a nivel mundial [3].

Con el pasar de los años, microorganismos como este están desarrollando mayor resistencia frente a los antibióticos empleados dentro de los tratamientos convencionales, disminuyendo a su vez la tasa de éxito de estos. De este modo, no solo se observa a nivel mundial una reducción en la tasa de éxito de los tratamientos que contienen claritromicina del 90% a menos del 80%, tal como la triple terapia, sino que también se ha visto afectada la tasa de efectividad de otros esquemas que emplean distintas combinaciones de antibióticos, como la terapia cuádruple y la concomitante [9].

En los últimos años la resistencia primaria y secundaria de *H. pylori* frente a claritromicina, levofloxacina y metronidazol ha aumentado en todo el mundo con tasas superiores al 15%, inclusive, se han reportado resistencias combinadas primarias de claritromicina y metronidazol y resistencia frente a tetraciclina y amoxicilina superior al 10% en todo el mundo [9]. Sumado a lo anterior, en una revisión sistemática realizada en latinoamerica se reportaron resistencias primarias frente a metronidazol, amoxicilina y levofloxacina, tetraciclina y resistencia dual de claritromicina y metronidazol del 53, 4, 15, 6 y 8%, respectivamente [15, 16], mientras que a nivel Colombia se han reportado, cepas resistentes a metronidazol, levofloxacina, claritromicina y amoxicilina en un 81,01%, 27%, 25% y 3,8%, respectivamente [16-19].

Así pues, la creciente aparición de cepas de *H. pylori* resistentes a los antibióticos empleados comúnmente en los diversos esquemas terapéuticos que se han desarrollado en las últimas décadas, además de su importancia a nivel clínico por las enfermedades a las cuales está asociado, por la alta prevalencia del mismo a nivel mundial, especialmente en países en vía de desarrollo como Colombia, y por la disminución de las tasas de éxito de estos esquemas en todo el mundo, han causado la necesidad de la búsqueda de potenciales alternativas terapéuticas para la erradicación de este microorganismo, tal como se puede apreciar en el llamado urgente que realizó la OMS en febrero del 2017 para la búsqueda de nuevos antibióticos frente a este y otros microorganismos [2, 9], siendo una de estas el uso de plantas medicinales, o compuestos provenientes de estas.

Justificación

Teniendo en cuenta que los tratamientos contra *H. pylori* han perdido eficacia, se han empezado a investigar diversas alternativas terapéuticas para la erradicación de este microorganismo, siendo el uso de compuestos provenientes de plantas medicinales un área con gran potencial para dicho fin, debido a las diversas propiedades terapéuticas que estos pueden poseer [3, 20].

El género *Passiflora* cuenta con alrededor de 576 especies las cuales han reportado diversas actividades, entre las que se destaca la actividad antimicrobiana [21]. En cuanto a *Passiflora quadrangularis* diferentes estudios han demostrado su actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, como *L. monocytogenes*, *B subtilis* y *S. aureus*, partiendo para ello de diferentes extractos (acuoso, metanólico y de acetona) provenientes del fruto y las hojas de esta especie [19, 20]. Adicional a esto, se ha determinado que los extractos hidroetanólico y la infusión acuosa de hojas de esta especie, así como la fracción butanólica poseen actividad antimicrobiana sobre *H. pylori* a concentraciones de 1000µg/mL para los extractos y de 250µg/mL para la fracción [14].

Con base en esto, en este trabajo se evaluaron algunos de los compuestos provenientes de dicha fracción, en pro de identificar y aislar aquellos compuestos responsables de dicha actividad antimicrobiana en esta fracción. De este modo, se busca brindar información relevante para la realización a futuro de otros experimentos *in vitro* e *in vivo*, con el propósito de avanzar en el desarrollo de una alternativa terapéutica segura y eficaz para la erradicación de *H. pylori*.

De este modo, en el presente proyecto se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es la actividad antimicrobiana frente a *Helicobacter pylori* de compuestos obtenidos a partir de la fracción butanólica de hojas de *Passiflora quadrangularis* Linn?

Marco teórico

Helicobacter pylori

Helicobacter pylori es un bacilo Gram negativo microaerófilo en forma de espiral, perteneciente a la familia *Helicobacteraceae*, flagelado, exigente nutricionalmente y con un tamaño de 2-4µm de largo y de 0,5-1µm de ancho, que ha infectado aproximadamente el 50% de la población mundial [4, 22], principalmente en países en vía de desarrollo, donde se encuentra una prevalencia que oscila entre el 60-90% de su población, debido al nivel de urbanización, nivel socioeconómico y saneamiento de estas comunidades [3, 23]. Por su parte, América del sur cuenta con una prevalencia del 69,4%, la cual corresponde a una de las prevalencias notificadas más altas en comparación con otras regiones del mundo como América del Norte y Europa Occidental, que cuentan con prevalencias de 37,1% y 34,3%, respectivamente [4]. En el caso de Colombia se encuentra una prevalencia del 69,1% [5].

La infección por *H. pylori* generalmente se adquiere durante la infancia y causa gastritis crónica en todos los pacientes colonizados, sin embargo, en estos pacientes también puede predisponer al desarrollo de úlceras pépticas (10%), linfoma MALT (0,1%) y hasta adenocarcinoma gástrico (1-3%), el cual ocupa uno de los primeros lugares dentro de la mortalidad por cánceres a nivel mundial, razón por la cual fue identificado como carcinógeno tipo 1 por la IARC y la OMS desde 1994 [2, 3, 23, 24].

Este microorganismo es capaz de colonizar la mucosa gastrointestinal al liberar proteasas que debilitan el revestimiento mucoso del epitelio gástrico, ureasas que transforman la urea presente en la luz gástrica en amonio y dióxido de carbono, con el fin de generar una capa que le permita protegerse del pH ácido del estómago [25]. Sumado a esto, posee proteínas específicas que le permiten adherirse a las membranas de las células epiteliales gástricas, lo cual puede generar una reacción inflamatoria en el organismo, conllevando a la migración de polimorfonucleares, linfocitos B y T, y otras células del sistema inmune, que termina en el desarrollo de neoplasias [3, 25].

Adicionalmente, cuenta con diferentes factores de virulencia que participan en la inducción de la inflamación y en la colonización de *H. pylori* en el sistema gastrointestinal, tales como CagA, VacA, PAI, OipA, BabA, entre otros. Algunos de estos factores pueden llegar a provocar citotoxicidad sobre las células epiteliales y/o aumentar la proliferación celular, generando a su vez diferentes lesiones gástricas y hasta cancerosas [2, 3]. Debido a todo esto, los diferentes tratamientos que se han venido utilizando y desarrollando en las últimas décadas se han centrado en la erradicación de este microorganismo, con el fin de prevenir el riesgo de desarrollar enfermedades gastroduodenales y cáncer gástrico.

Tratamientos frente a Helicobacter pylori

La triple terapia estándar ha sido empleada por más de 20 años como terapia de primera línea para el tratamiento de la infección causada por *H. pylori*, la cual está constituida por un inhibidor de la bomba de protones (como omeprazol) y dos antibióticos, principalmente amoxicilina, claritromicina, metronidazol o levofloxacina durante 10-14 días [6-8].

Sin embargo, la eficacia de la terapia triple que inicialmente era del 90%, de manera progresiva ha disminuido en la mayoría de los países, alcanzando cifras inferiores al 80%, que se pueden considerar inaceptables debido a que se encuentran por debajo de rango aceptable establecido para el tratamiento de una enfermedad infecciosa (90%) [7, 9] Por lo tanto, actualmente se recomienda la terapia cuádruple, que contiene un fármaco adicional compuesto por sales de bismuto; este esquema es además el recomendado como esquema terapéutico en Colombia [6, 8]. Sin embargo, pese a que la terapia cuádruple ha alcanzado tasas de éxito superiores al 90%, debido al mal uso de los antibióticos y a algunas limitaciones que presenta el bismuto, tal como la ausencia de actividad antimicrobiana frente a bacterias intracelulares y pericelulares, esta también ha comenzado a perder rápidamente su eficacia [7, 8, 10, 11].

Por tal razón, se hizo necesario contar con diversas opciones para tratamiento de primera línea, como los indicados en la Figura 1, donde se visualizan algunas terapias de primera línea sugeridas para Latinoamérica y Colombia [19]; además de contar con tratamientos de segunda o tercera línea, y de rescate o salvamento, en caso de que fracase el de primera línea, tales como lo son la terapia dual, la híbrida, la concomitante, entre otros; donde se emplean otros antibióticos, como lo son la rifabutina y la furazolidona [7, 16, 26].

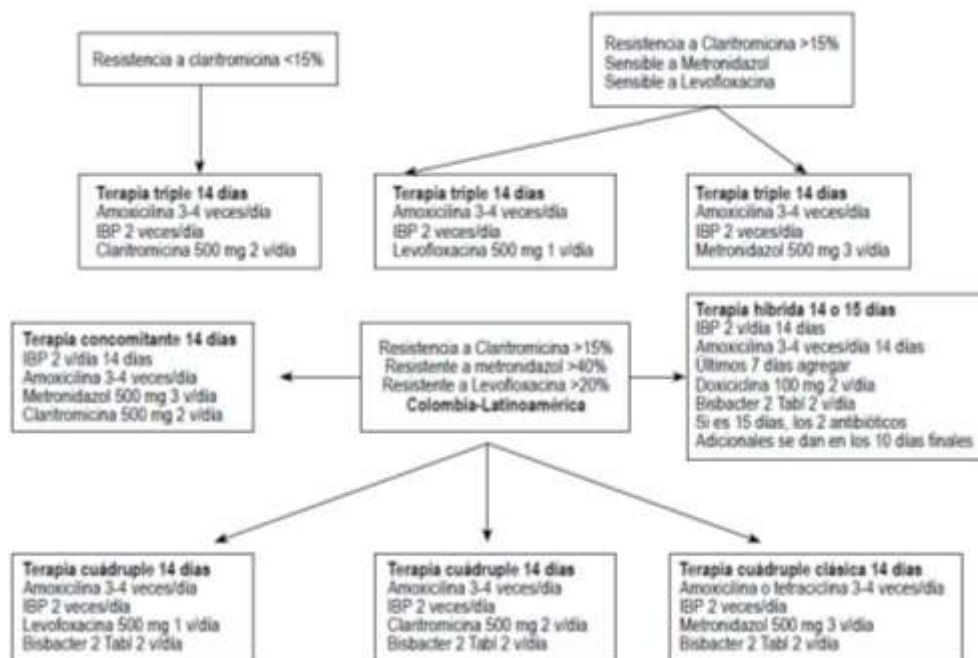


Figura 1. Esquemas terapéuticos de primera línea sobre *H. pylori*. Recuperado de [23].

Pese a esto, el aumento de cepas resistentes de *H. pylori* sigue incrementando, pues se han reportado resistencias frente a claritromicina, metronidazol y levofloxacina >15%, y de tetraciclina y amoxicilina >10%, en diferentes regiones del mundo, incluyendo las Américas [9]. En Colombia se puede observar una tasa de resistencia a claritromicina del 25%, a metronidazol del 81%, a levofloxacina del 27% y a amoxicilina del 3,8% [16-19]. Por esta razón, la Agencia Europea de Medicamentos ha clasificado a *Helicobacter pylori* dentro de las especies bacterianas inconstantemente sensibles, es decir, presenta resistencia frente a los principales antibióticos utilizados en el tratamiento convencional (claritromicina, metronidazol, amoxicilina, levofloxacina y tetraciclina) entre el 10-50% de los pacientes tratados [24].

De este modo, después de varios consensos, como el consejo V de Maastricht, se ha acordado que la eficacia mínima de un tratamiento exigida para tratar a un paciente colonizado por *H. pylori* es del 90%, y que cada región o país debería investigar esquemas de tratamiento seleccionando únicamente aquellos que presenten mayor eficacia a nivel local, basándose a su vez en los patrones locales de resistencia a estos antimicrobianos [8, 18]. Asimismo, la OMS en 2017 declaró a *H. pylori* resistente a claritromicina como una bacteria de prioridad alta por ser una amenaza para la salud humana, y, de igual manera, impulsó la investigación y desarrollo de nuevas estrategias para la erradicación de este y otros microorganismos [1, 21].

Así pues, se han evaluado y explorado nuevas alternativas terapéuticas como la implementación de probióticos, el desarrollo de vacunas o el uso de plantas medicinales y compuestos derivados de estas, que buscan una eficacia terapéutica superior y una reducción de posibles efectos adversos, tanto para prevenir, como para erradicar la infección [26, 28].

Fitoterapéuticos

Desde la antigüedad las plantas han jugado un rol fundamental en diferentes aspectos de las comunidades humanas, desde la alimentación y la ornamentación, hasta en la medicina de estas. Como bien se sabe, las plantas han demostrado poseer una gran variedad de propiedades terapéuticas que han sido explotadas poco a poco en la medicina tradicional por nuestros ancestros, gracias a los conocimientos empíricos que fueron adquiriendo de las mismas al emplearlas a diario en sus remedios caseros para tratar diferentes enfermedades, de ahí que sean ampliamente estudiadas para el desarrollo de tratamientos para diversas patologías humanas [6, 28]. Estas propiedades son brindadas por una gama de diversas moléculas bioactivas, tales como flavonoides, saponinas, ácidos fenólicos y taninos [13, 29].

Además de esto, han jugado un importante papel en el desarrollo de gran cantidad de medicamentos que se conocen y se utilizan hoy en día, como la morfina y la aspirina, de modo tal que se considera que cerca del 50% de los medicamentos modernos provienen de productos naturales, más aún por la actual necesidad de descubrir nuevas moléculas o compuestos que proporcionen la actividad terapéutica requerida para tratar patologías como las enfermedades infecciosas, cuyos agentes patógenos se han vuelto resistentes con el tiempo contra los antimicrobianos comúnmente usados frente a estos, tal como es el caso de *H. pylori* [13, 30].

Dentro de las propiedades que poseen las plantas se ha vuelto de gran interés su estudio para enfermedades infecciosas por los metabolitos con potencial actividad antimicrobiana que estas puedan poseer [29]; por esta razón, los productos naturales se consideran un amplio campo para el descubrimiento de posibles tratamientos para la infección causada por *H. pylori*, más aún, teniendo en cuenta que se ha demostrado que una gran variedad de estos poseen actividad anti-*H. pylori* por medio de diversos mecanismos [2]. En el estudio de Asha y colaboradores [31] empleó el método de dilución en agar, con el propósito de determinar la actividad antimicrobiana sobre dos cepas de referencia y una cepa clínica de *H. pylori* del extracto comercial GutGard proveniente de *Glycyrrhiza glabra* y de algunos compuestos puros de dicho extracto, tal como Glabridina, los cuales obtuvieron concentraciones mínimas inhibitorias de 100 y 12,5 µg/mL, respectivamente. Cabe aclarar que se ha determinado que la actividad anti-

H. pylori de estas plantas es inducida por varios de los compuestos que las conforman, tales como flavonoides, saponinas, alcaloides y terpenos [2].

Otro ejemplo claro de ello corresponde al extracto metanólico de bulbos de *Allium acalonicum* Linn, el cual presentó actividad inhibitoria sobre cepas clínicas y de referencia de *H. pylori* a concentraciones entre 100-200mg/mL, utilizando para ello la técnica de dilución en agar [32]. En este estudio se les atribuyó la actividad a los flavonoides, las saponinas, los aceites esenciales, entre otros; debido a diversos mecanismos de acción que poseen, por ejemplo, se considera que la acción de los flavonoides podría deberse a la inhibición de la DNA girasa a través de la membrana plasmática [32].

En el estudio de Mahady y colaboradores [33], evaluaron mediante el método de dilución en agar la actividad antimicrobiana frente a 15 cepas clínicas de *H. pylori* de extractos metanólicos provenientes de 24 especies de plantas, las cuales mostraron diferentes perfiles de actividades y, por ello, diferentes MIC que oscilaban de 12,5µg/mL a >100µg/mL. De estas especies, se puede destacar *Passiflora incarnata*, a partir de la cual se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 50µg/mL.

Adicionalmente, también se ha encontrado que algunas especies del género *Passiflora* poseen actividad antimicrobiana frente a *H. pylori*, tal como *Passiflora tripartita* y *Passiflora tarminiana*, cuyos extractos hidroetanólicos muestran actividad antimicrobiana *in vitro* sobre las cepas de referencia de *H. pylori* NCTC 11637 y NCTC 11638, a concentraciones superiores a los 1000µg/mL, utilizando el método de dilución en agar [34].

Plantas del género *Passiflora*

El género *Passiflora*, cuenta con alrededor de 576 especies, este género se caracteriza por abarcar en su mayoría enredaderas que trepan en zarcillos auxiliares con flores de diferentes colores (Figura 2), las cuales se encuentran distribuidas en zonas tropicales y subtropicales de Asia, África y América, tal como las zonas andinas ubicadas en América del Sur, de las cuales son originarias muchas de estas [9, 21, 35, 36]. Colombia por su parte es considerado uno de los países con mayor diversidad de pasifloras silvestres y cultivadas con 170 especies reportadas, 42 de ellas pertenecientes a este género específicamente, de las cuales *P. edulis*, *P. ligularis*, *P. quadrangularis*, *P. maliformis* y *P. mollissima* son las de mayor interés comercial debido al uso de sus frutos en la alimentación humana [19, 37, 38].



Figura 2. Algunas especies del género *Passiflora*. Recuperada de [39].

Las pasifloras se destacan por su uso en la alimentación y como plantas ornamentales debido principalmente a sus flores y hojas llamativas, sin embargo, también tiene importancia en el área farmacológica para el desarrollo de medicamentos como los de tipo ansiolítico y sedante, debido a las propiedades terapéuticas que poseen, entre las que se encuentra para especies de este género actividad sedante, espasmolítica, antiinflamatoria, antioxidante, antihelmíntica y antimicrobiana [19, 21, 34, 40]. Adicionalmente, cabe destacar que algunas especies del género *Passiflora*, según relato, son utilizados en la medicina tradicional para tratar problemas gastrointestinales [41].

Según la literatura se han descrito una gran variedad de compuestos dentro de la composición química de las especies del género *Passiflora*, de las cuales se destacan los flavonoides, especialmente los C-glicosilflavonoides, como orientina, vitexina y isovitexina [42, 43]. También se han identificado saponinas, antocianinas, alcaloides, glucósidos cianogénicos, otros ácidos fenólicos como el cumárico o el cafeico, entre otros, sin embargo, algunos de estos compuestos se encuentran restringidos a ciertas especies y en pequeñas proporciones dentro de estas plantas, tal como es el caso de los alcaloides y las saponinas [42-44].

Passiflora quadrangularis Linn

Dentro del género *Passiflora* se encuentra la especie *P. quadrangularis* Linn (también llamada badea), que corresponde a una planta de tipo enredadera herbácea, glabra, provista de pedúnculos con una flor en cada pedúnculo de tonalidad fucsia (Figura 3), originaria de Suramérica y que se puede encontrar en diversas regiones del territorio colombiano [20]. Además, también está provista de zarcillos en forma de espiral y un fruto globoso [20].



Figura 3. *Passiflora quadrangularis* Linn, A. Flor y B. Fruto inmaduro y flor.
Recuperada de [39].

En cuanto a sus usos *P. quadrangularis* Linn se ha empleado como sedante, para tratar úlceras, regular la digestión, aliviar contusiones e inflamaciones articulares, como cicatrizante de heridas y también en la preparación de diversos alimentos [20, 38]; adicionalmente, se ha empleado el té preparado a partir de sus hojas, con el propósito de controlar la hipertensión arterial y tratar la diabetes [12].

En el estudio de Sathyan y colaboradores [12] se determinó que el jugo del fruto de *P. quadrangularis* Linn posee actividad antioxidante y antimicrobiana sobre microorganismos como *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. putida* y *E. coli* a concentraciones mayores a 10 μ L por disco, evaluadas mediante el método de difusión en disco [12]. Adicional a esto, bajo el método de difusión en disco también se ha determinado que los extractos de éter de petróleo, acetona y metanol obtenidos de hojas de *P. quadrangularis* Linn han presentado actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas como *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus* y *L. monocytogenes*, y frente a bacterias Gram negativas como *P. aeruginosa*, *K. oxytoca* y *E. coli* [13]. Cabe aclarar que los métodos empleados en estos estudios no son los apropiados para la realización de pruebas de susceptibilidad de *H. pylori*, debido a que el método estándar recomendado por el CLSI para dicho fin corresponde al de dilución en agar [45].

Adicionalmente, en estudios previos del Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciones en asociación con el Grupo de Investigación en Fitoquímica, ambos de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, se evaluó y determinó la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones de esta especie frente a las cepas de referencia de *Helicobacter pylori* NCTC 11637 y NCTC 11638, las cuales presentaron CMI de 1000 μ g/mL para extractos hidroetanólicos de hojas de *P. quadrangularis* Linn, y CMI de 250 μ g/mL para su respectiva fracción butanólica, con la presencia destacada de flavonoides y saponinas en sus composiciones química. [14].

Se encontró que estudios previos, mediante técnicas analíticas como TLC, HPTLC y HPLC, han determinado que *Passiflora quadrangularis* Linn presenta dentro de su composición flavonoides tipo C-glicosilflavonoides (Figura 4), tal como orientina, orientina-2''-O-xilósido,

orientina-2''-O-glucósido, vitexina, vitexina-2-O-xilósido y vitexina-2''-O-glucósido, además de una gran variedad de saponinas, siendo el quadrangulósido la saponina mayoritaria (Figuras 5). [42, 43, 46, 47].

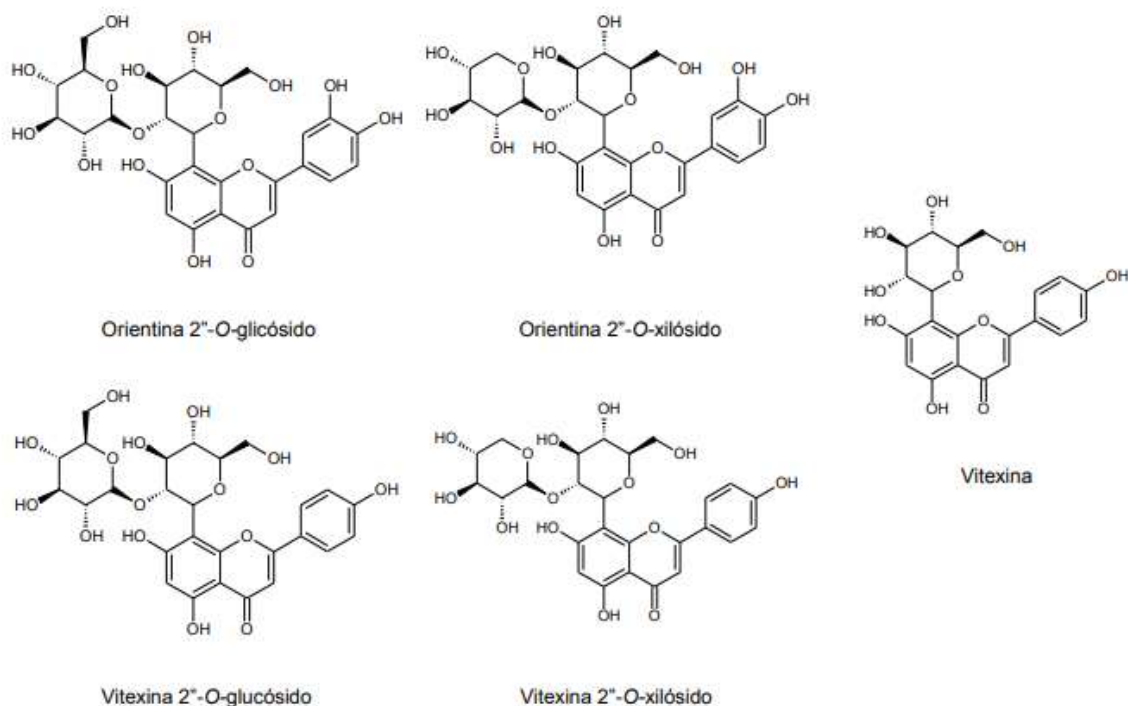


Figura 4. Flavonoides presentes en hojas de *P. quadrangularis* Linn. Recuperado de [36] y [48]

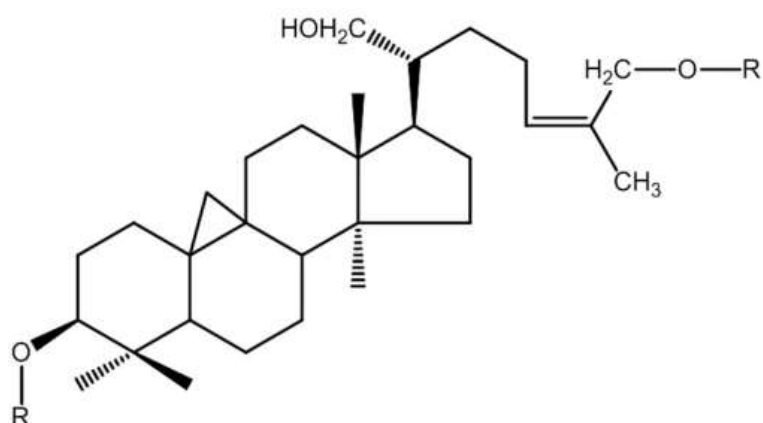


Figura 5. Quadrangulosido, saponina mayoritaria presente en hojas de *P. quadrangularis* Linn (R corresponde a gentiobiosa). Recuperado de [48].

Los flavonoides son compuestos bastante comunes en el reino vegetal, por tal motivo han sido aislados en gran medida de diversas plantas y se les ha atribuido diversas propiedades, entre las que encontramos actividad antiinflamatoria, antioxidante, hepatoprotectora, antiarrítmica, anticancerígena, antimicrobiana, inhibidora de múltiples enzimas, tales como las oxidorreductasas y cinasas, entre otras propiedades [36, 49]. En el caso de los C-glicosilflavonoides son bien conocidos por presentar actividad antitumoral, antiinflamatoria, antidiabética, hepatoprotectora y antimicrobiana [44]. Por otro lado, se ha demostrado de igual

manera que las saponinas presentan propiedades antiinflamatorias, hipocolesterolémicas, hemolíticas, antifúngicas, antiparasitaria y antitumorales menores [50].

Sumado a esto, se ha determinado que los flavonoides son capaces de proteger la mucosa gástrica contra diferentes agentes ulcerogénicos en diferentes mamíferos. Una razón para ello es la capacidad que poseen de inhibir la actividad de la bomba de protones H^+/K^+ -ATPasa o aumentar la PGE_2 y la secreción de mucosa [51]. De igual manera, también se han reportado efectos gastroprotectores y antiulcerosos para saponinas [52]. Por consiguiente, estos compuestos despiertan un gran interés para el presente estudio, teniendo en cuenta que las especies del género *Passiflora* poseen dentro de su composición una alta proporción de flavonoides y saponinas.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana frente a *Helicobacter pylori* de compuestos obtenidos a partir de la fracción butanólica de hojas de *Passiflora quadrangularis* Linn.

Objetivos específicos

- Caracterizar los compuestos mayoritarios de la fracción butanólica proveniente de hojas de la especie *Passiflora quadrangularis* Linn.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de compuestos derivados de la fracción butanólica de hojas de *Passiflora quadrangularis* Linn frente a *Helicobacter pylori*.

Metodología

1. Material vegetal

El material vegetal (hojas de *Passiflora quadrangularis* Linn) fue recolectado previamente en el municipio de Neiva (Longitud: 75° 12' 5.839; Latitud: 2° 52' 01,599) del departamento de Huila, Colombia. La identificación del material vegetal fue realizada por el profesor Carlos Albero Parra del Instituto Nacional de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia y se depositó una copia del espécimen en el Herbario de la Universidad Nacional, bajo el número COL589240. Esta investigación está autorizada por el Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y Productos Derivados N° 212 (RGE 0287-6), entre la Pontificia Universidad Javeriana y el Ministerio de medio Ambiente y Desarrollo Sostenible de la República de Colombia. Posteriormente, el material fue secado en una estufa de aire circulante a 35°C por 72 horas y molido con molino de cuchillos.

2. Obtención de la fracción butanólica

En primer lugar, se realizó un proceso extractivo a partir del material vegetal molido mediante maceración hidroetanólica al 50% (relación 1:15 planta-solvente) durante 72h. Posteriormente, el extracto fue filtrado y el etanol fue retirado de la muestra mediante rotaevaporación. El extracto fue entonces fraccionado por medio de partición líquido-líquido, utilizando butanol. Paso seguido, la fracción butanólica fue secada mediante rotaevaporación a una temperatura de 40°C [14]. Finalmente, la fracción obtenida se almacenó en frascos ámbar sellados a una temperatura de 4°C para su posterior uso.

3. Caracterización química de la fracción y/o compuestos provenientes de *P. quadrangularis* Linn

3.1. Análisis por Cromatografía Líquida de Ultra Eficiencia acoplada a un Detector por Arreglo de Diodos (UPLC-DAD)

El análisis del perfil cromatográfico de la fracción butanólica se realizó mediante Cromatografía Líquida de Ultra Eficiencia acoplada a un Detector por Arreglo de Diodos (UPLC-DAD) en un equipo UPLC Acquity H-Class Waters®, para la cual se utilizó una columna cromatográfica de fase reversa C18 Phenomenex® Kinetex (100x2,1mm;2,6µm) y una temperatura de 21±2°C. Los espectros UV-Vis fueron analizados entre 200-400nm [42]. Cabe resaltar que las muestras fueron previamente preparadas a una concentración de 3mg/mL en Metanol: Agua (relación 1:1) y filtradas por una membrana de 0,22µm [53].

Para el análisis de flavonoides se tuvieron en cuenta las siguientes condiciones: Como fase móvil se utilizó un gradiente de dos pasos de acetonitrilo (Solvente A) y ácido fórmico 0,5% en agua (Solvente B) de la siguiente manera: 15-35% de A (0-8min), seguido de 35% A (8-10min). Además, se utilizó un flujo de 0,25mL/min y un volumen de inyección de 3µL [42].

Adicionalmente, para el análisis de saponinas de *P. quadrangularis* Linn, se emplearon las condiciones cromatográficas de HPLC publicadas en el estudio de Costa y colaboradores [48], las cuales se convirtieron a condiciones de UPLC mediante el software Empower 3. Partiendo de ello, como fase móvil se utilizó un sistema de gradiente de acetonitrilo (Solvente A) y agua (Solvente B) de la siguiente forma: 29% de A (0-2,18min) y 29-35% de A (2,18-12,18min). Se empleó un volumen de inyección de 1,9µL, un flujo de 0,35mL/min y se realizó la detección a una longitud de onda de 205nm.

Finalmente, el análisis de los datos obtenidos se realizó con ayuda del software Empower 3, a partir del cual se obtuvieron los cromatogramas correspondientes al análisis de flavonoides y saponinas presentes en la fracción butanólica evaluada.

3.2. Análisis por Electroforesis Capilar equipada con un Detector por Arreglo de Diodos (CE-DAD)

La caracterización fitoquímica también se llevó a cabo mediante Electroforesis Capilar equipada con un Detector por Arreglo de Diodos (CE-DAD) en un equipo (Agilent Technologies 7100), para la cual se siguió la metodología descrita por Costa y colaboradores modificada [42]. Para dicho fin se utilizó un capilar de sílica fundido de 45cm de largo por 50 μ m de diámetro interno con una ventana de detección ampliada y un buffer de corrida (BGE) compuesto por tetraborato de sodio (TBS) (50 mmol/l; pH 9.5, ajustado con NaOH 1M) y metanol al 20%. Cabe resaltar que se realizó un acondicionamiento inicial del capilar con NaOH 1M (5min), NaOH 0,1M (5min), agua tipo 1 (5min) y buffer de corrida (10min). Además, entre análisis se realizó un preacondicionamiento con buffer de corrida durante 5 minutos.

La muestra fue introducida al equipo mediante una inyección hidrodinámica a una presión de 50mbar/10s. Para la separación se aplicó un voltaje de 25kV y una temperatura constante de 30°C durante los 10 minutos que duró el análisis de la muestra. Además, la detección se realizó a una longitud de onda de 390nm para el análisis de flavonoides. Las muestras fueron previamente preparadas en agua tipo 1 en una concentración final de 1mg/mL, y filtradas por una membrana de 0,22 μ m.

Finalmente, el análisis de los datos obtenidos se realizó con ayuda del software Agilent ChemStation, a partir del cual se obtuvo el electroferograma correspondiente al análisis de flavonoides presentes en la fracción butanólica evaluada.

4. Purificación de compuestos a partir de la fracción butanólica de *P. quadrangularis* Linn

En la búsqueda de compuestos a partir de la fracción butanólica activa sobre *Helicobacter pylori*, se utilizó la técnica de Cromatografía de Partición Centrífuga (CPC), con miras a la purificación de algunos de los compuestos mayoritarios, como los flavonoides. Para este fin, se siguió la metodología de Costa y colaboradores [48] y Gazola y colaboradores [53] con algunas modificaciones.

Se empleó un sistema de solventes en gradiente utilizando Acetato de Etilo:Butanol:Agua (relaciones 1:X:1, respectivamente), en los cuales variaba únicamente la proporción del butanol de la siguiente forma: Sistema A (1:0,2:1), Sistema B (1:0,4:1), Sistema C (1:0,6:1) y Sistema D (1:0,8:1); estas proporciones se seleccionaron posterior al análisis de la separación de los compuestos de interés en diferentes concentraciones de butanol, evaluando consigo los tiempos de separación de las fases superior e inferior (orgánica y acuosa).

De este modo, la fase inferior del sistema A se empleó como fase estacionaria del proceso, mientras que las fases superiores de cada uno de los sistemas se utilizaron como fase móvil, en un análisis de forma ascendente, a un flujo de 5mL/min y una velocidad de 1500rpm.

Para este proceso se disolvieron 0,7g de la fracción butanólica de *P. quadrangularis* Linn en 10mL de la fase móvil del sistema A y se inyectaron al equipo de CPC a través un inyector de 10mL, con el rotor previamente equilibrado con la fase móvil y estacionaria ($V_s = 250\text{mL}$ $S_F = 60\%$). Al finalizar el proceso se recolectaron un total de 50 subfracciones de 10mL cada una,

las cuales se agruparon en 11 según sus perfiles de flavonoides y saponinas obtenidos por TLC, y se secaron posteriormente mediante rotaevaporación.

5. Cultivo de *Helicobacter pylori*

Para los ensayos de actividad antimicrobiana se seleccionaron las cepas de referencia de *Helicobacter pylori* NCTC 11637 y NCTC 11638 (National Collection of Type Cultures, UK), brindadas por la colección de microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana, cuyos códigos son CMPUJ 122 y CMPUJ 123, respectivamente. Estas cepas cuentan con características de susceptibilidad frente a claritromicina, levofloxacina, metronidazol y amoxicilina.

Las cepas empleadas se reactivaron de viales conservados a -70°C en agar Brucella suplementado con 7% de sangre de caballo desfibrinada e IsoVitalex al 0,4% a 37°C en condiciones de microaerofilia (11% CO_2) durante 3 a 4 días, para que alcanzara la fase de crecimiento logarítmica necesaria para los posteriores ensayos de actividad antimicrobiana.

El crecimiento e identificación de este microorganismo se realizaron por morfología de colonia típica y mediante las pruebas bioquímicas de ureasa, empleando para ello urea con rojo fenol como indicador de pH, gracias a lo cual se determinó la capacidad de *H. pylori* de descomponer la urea en dióxido de carbono y amoníaco al virar el medio de naranja-amarillo a fucsia por el cambio en el pH; de catalasa, adicionando una gota de peróxido de hidrogeno que al entrar en contacto con el microorganismo va a generar burbujas, debido a la actividad catalasa de este microorganismo que descompone el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno; y de oxidasa, para la cual se emplearon tiras de oxidasa que al entrar en contacto con la enzima citocromo oxidasa de *H. pylori* vira su tonalidad a azul por la reducción del 1-naftol+dimetilparafenileno diamina o reactivo NaDi [54 y 55]. Para todas las pruebas bioquímicas, se obtuvo un resultado positivo característico de este microorganismo.

6. Evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos de *P. quadrangularis* Linn frente a *H. pylori*

La actividad antimicrobiana se evaluó frente a *H. pylori* utilizando el método de dilución en agar siguiendo las recomendaciones brindadas en el manual M45 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) [45]. Para ello, se prepararon las soluciones de prueba de cada una de las subfracciones evaluadas en solución de DMSO al 10% y se mezclaron con agar Mueller-Hinton II suplementado con 7% de sangre de caballo desfibrinada e IsoVitalex al 0,4% en cajas de Petri de 5mL, en una dilución 1/10, para obtener las concentraciones finales en el medio a evaluar, que correspondieron a 200, 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De este modo, la concentración final de DMSO en el medio de cultivo fue de 1%.

Como controles de la prueba se utilizaron dos controles de inhibición, siendo estos los antibióticos amoxicilina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y levofloxacina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), el control del vehículo en el cual se encontraban diluidos los compuestos evaluados (DMSO 1%), y 2 controles de crecimiento, donde se evaluó el crecimiento de *H. pylori* en el medio sin ningún tratamiento, tanto al principio como al final del procedimiento de siembra, con el fin de controlar que el crecimiento del microorganismo no fuese afectado por el oxígeno y también verificar la pureza en cada montaje.

Para la siembra se prepararon inóculos de cada una de las cepas de *H. pylori* evaluadas, ajustadas al estándar 2 de McFarland para alcanzar una concentración aproximada de $1 \times 10^8 \text{ UFC}/\text{mL}$. Posterior a esto, con ayuda de una micropipeta se inocularon por triplicado

sobre la superficie de cada medio por spot, 1uL de cada una de las suspensiones bacterianas preparadas, tras lo cual se incubaron a 37°C durante 72h en condiciones microaerofílicas. Finalmente, se realizó la lectura de los resultados y se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI), definida como la mínima concentración de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de su incubación. Cabe aclarar que pasadas estas 72h también se realizaron las pruebas bioquímicas (ureasa, oxidasa y catalasa) para confirmar la pureza de la prueba.

Resultados y discusión

1. Caracterización química de la fracción butanólica y/o compuestos provenientes de *Passiflora quadrangularis* Linn

Las plantas como cualquier otro organismo vivo poseen una gran diversidad de compuestos y metabolitos que al actuar en conjunto, o de manera individual, tienen diferentes funciones dentro de ellas, desde la defensa contra factores ambientales peligrosos y frente a diferentes patologías que pueden llegar a sufrir, hasta en la alimentación de las mismas; por esta razón, han sido aprovechadas por el ser humano desde la antigüedad en la alimentación como una fuente de nutrientes, pero así mismo en el tratamiento de diversas enfermedades como potenciales agentes terapéuticos.

De este modo, se ha descubierto que el efecto terapéutico específico de una planta puede ser brindado por uno de sus componentes o por la mezcla de varios de estos en fracciones y extractos. De este modo, en el caso de *P. quadrangularis* Linn se determinó en estudios previos dentro del grupo que tanto el extracto hidroetanólico como la fracción butanólica de hojas de esta especie presentan actividad antimicrobiana sobre *H. pylori* a concentraciones de 1000ppm y 250ppm, respectivamente [14]; posterior a esto se realizó un fraccionamiento de esta fracción butanólica por medio de cromatografía en columna por Sephadex LH-20, a partir de la cual se obtuvieron tres grupos de subfracciones de esta fracción butanólica (Grupo 1: Subfracciones de saponinas, Grupo 2: Subfracciones de saponinas y flavonoides, y Grupo 3: Subfracciones de flavonoides), donde se encontró actividad antimicrobiana sobre *H. pylori* a concentraciones de 250ppm, exclusivamente en aquellas subfracciones que presentaban mezclas de saponinas y flavonoides[14].

Por este motivo, en el presente estudio se trabajó con esta fracción butanólica activa con el propósito de identificar aquellos compuestos específicos que le brindan dicha actividad. Para ello, en primera instancia, se realizó la caracterización de esta fracción por medio de UPLC-DAD y CE-DAD, orientado al análisis de flavonoides, y por medio de UPLC-DAD orientado al análisis de saponinas. Cabe mencionar que estos dos grupos de metabolitos son considerados los compuestos mayoritarios presentes en algunas de las plantas pertenecientes al género *Passiflora*, tal como *Passiflora quadrangularis* Linn, además de ser algunos de los compuestos que les brindan gran cantidad de propiedades terapéuticas a estas plantas [44, 50].

Para el análisis de flavonoides mediante UPLC se observó en la Figura 6 que la fracción butanólica de *P. quadrangularis* Linn posee 5 picos representativos los cuales, gracias a los barridos espectrales de la Figura 7 y 8, fueron identificados como flavonoides con tiempos de retención de 2,2min, 2,7min, 3,1min, 3,5min y 3,7min, respectivamente; de los cuales se resaltan los compuestos 2, 3 y 4 (Figura 6). Se puede realizar esta confirmación debido a la presencia de dos regiones de mayor absorbancia (longitudes de onda) entre los rangos de 240-285nm y de 300-400nm en dichos barridos (Figura 7), siendo esto característico de los flavonoides por presentar dentro de su estructura general dos anillos aromáticos bencénicos (Porción benzoílo y porción cinamoílo) (Figura 8) capaces de absorber radiación ultravioleta, que les confieren a estas moléculas sus características espectrales [56]. Partiendo de ello, en vista de que la longitud de mayor absorbancia de los flavonoides se encuentra entre los 300-400nm, dentro de las condiciones empleadas para la técnica de UPLC-DAD se seleccionó la longitud de onda de 340nm para la detección de los mismo.

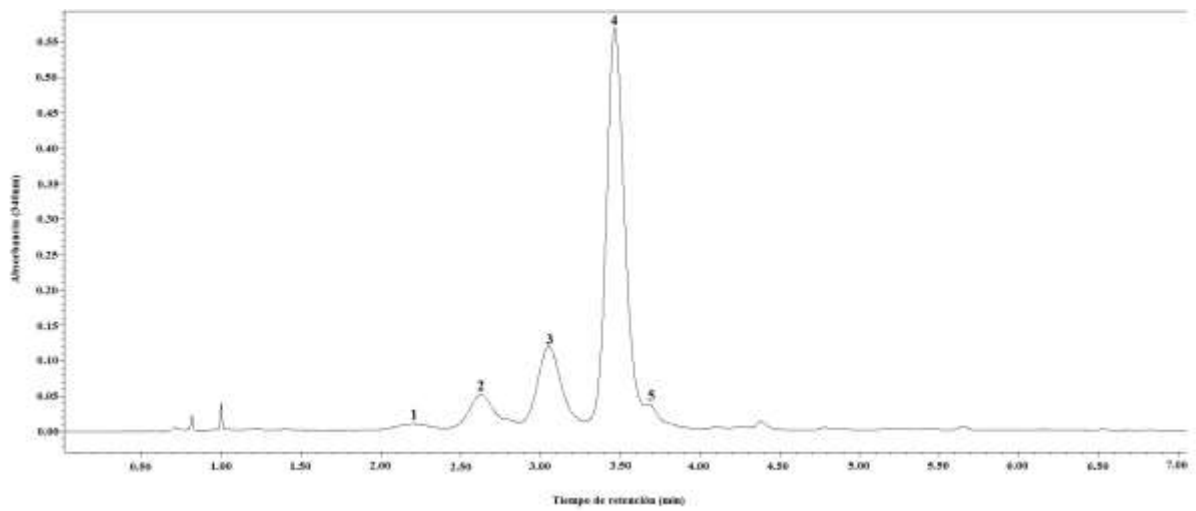


Figura 6. Cromatograma de UPLC de flavonoides de la fracción butanólica de hojas de *P. quadrangularis* Linn a 340nm.

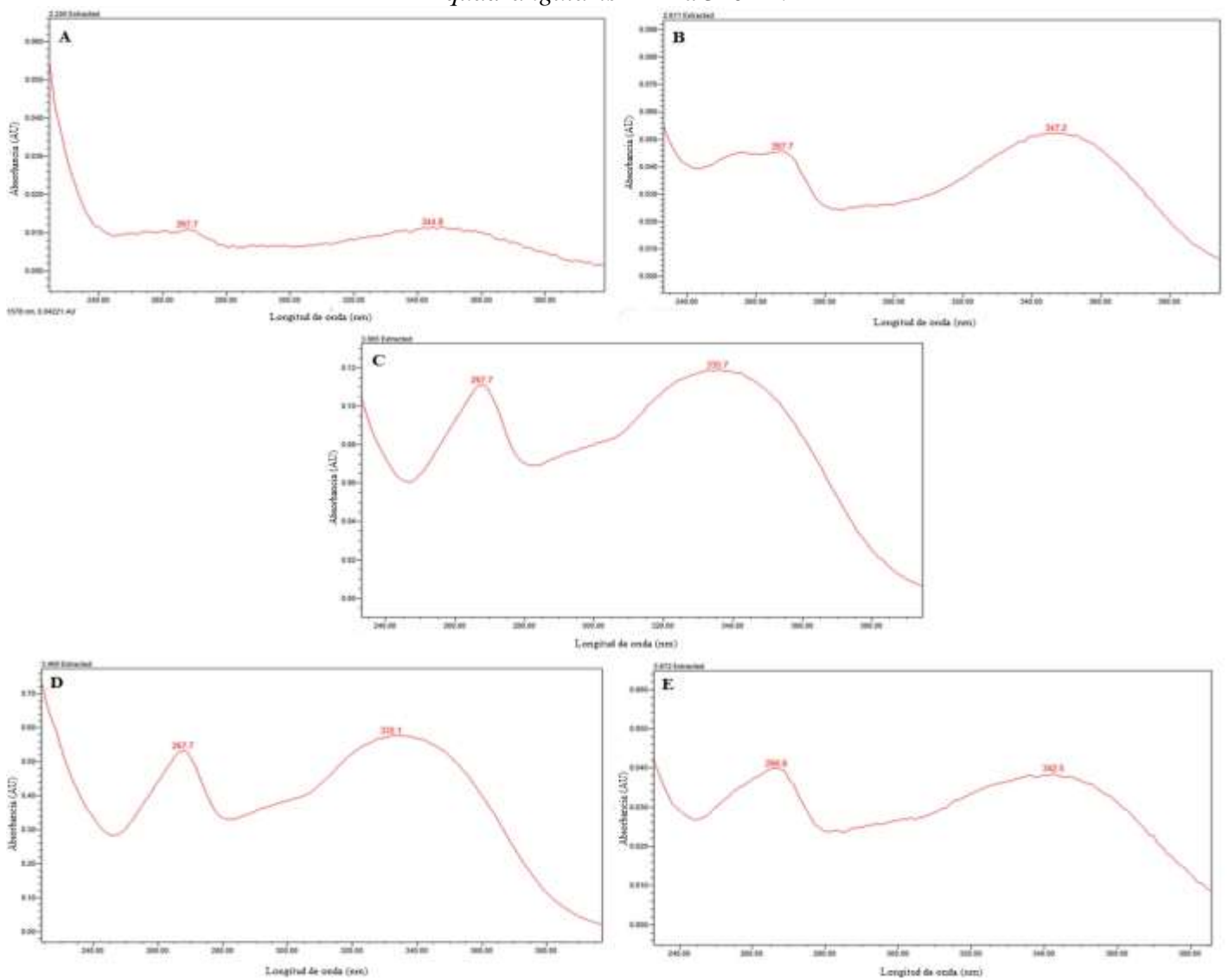


Figura 7. Barrido espectral de la UPLC de flavonoides de la fracción butanólica de *P. quadrangularis* Linn para los picos 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) y 5 (E).

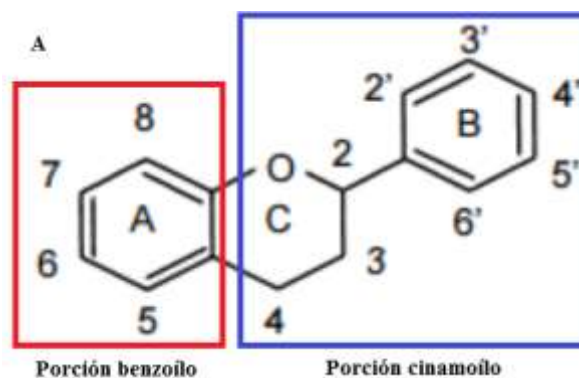


Figura 8. Estructura general de un flavonoide indicando la Porción benzoilo y la porción cinamoilo de esta molécula. Recuperado de [56]

Teniendo en cuenta estudios previos, tal como el de Costa y colaboradores [42], se puede determinar por comparación de los perfiles cromatográficos que los flavonoides presentes en la fracción butanólica de *P. quadrangularis* Linn (Figura 6) corresponden a orientina-2''-O-glucosido (Pico 1), orientina-2''-O-xilosido (Pico 2), vitexina-2''-O-glucosido (Pico 3), vitexina-2''-O-xilosido (Pico 4) y vitexina (Pico 5). Lo anterior se puede concluir debido a que las condiciones cromatográficas empleadas en ambos estudios son similares, razón por la cual el perfil cromatográfico obtenido en dicho estudio es parecido (Figura 9). Esta conclusión también concuerda con lo reportado en los estudios realizados por Miranda-Freire [40], Echeverry [46] y Costa y colaboradores [47], donde además se reporta que vitexina-2''-O-xilósido es el flavonoide que se encuentra en mayor proporción en las hojas de esta especie, al igual que como se pudo visualizar en la Figura 6.

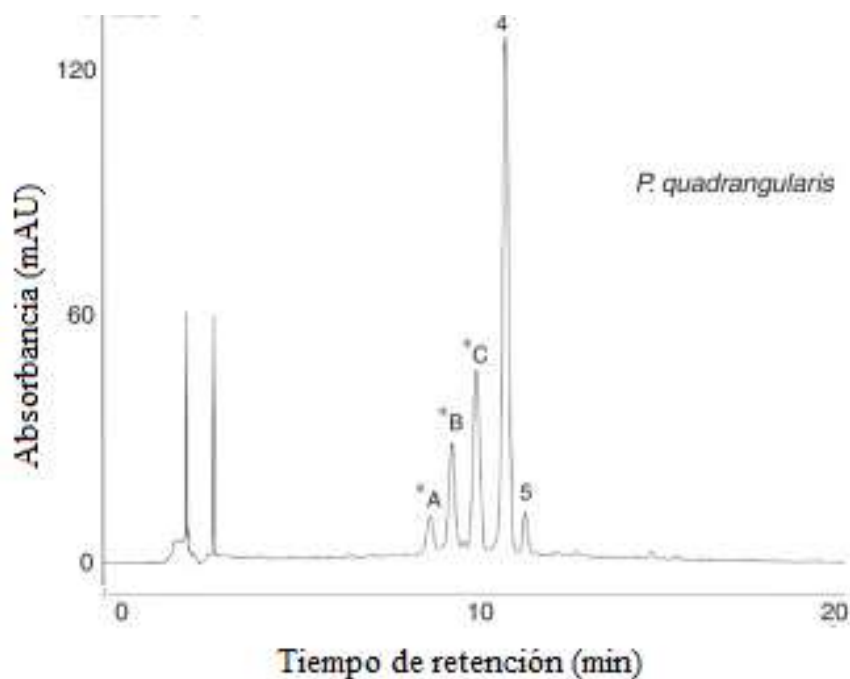


Figura 9. Cromatograma de HPLC de flavonoides del extracto acuoso de las hojas de *Passiflora quadrangularis* a 340nm. *A. orientin-2''-O-glucoside, *B. orientin-2''-O-xyloside, *C. vitexin-2''-O-glucoside. 4. vitexin-2''-O-xyloside, 5. vitexin. Recuperada de [42]

Debido a que la polaridad y masa de todos estos flavonoides son muy similares, los compuestos migran en tiempos semejantes, razón por la cual se hace más difícil la separación de los mismos, por ejemplo, en el estudio de Costa y colaboradores [42] los tiempos de retención de la vitexin-2''-O-xilosido y la vitexina son de 10,8min y 11,4min, respectivamente.

La electroforesis capilar bajo las condiciones empleadas, pese a que mostró un tiempo corto de análisis, determinó ser una técnica con menor resolución que la UPLC en cuanto al análisis de flavonoides, ya que en la Figura 10 solo se logran visualizar 2 picos de flavonoides, confirmados por los barridos electroforéticos de las Figuras 11 y 12, mientras que en el cromatograma de la Figura 6 se observan los 5 compuestos mayoritarios de flavonoides que posee la fracción butanólica de *P. quadrangularis* Linn. Dicha situación se debe a que estos 5 flavonoides presentes en esta muestra poseen cargas y masas similares entre sí, razón por la cual se mantuvieron agrupados por similitud durante toda la corrida electroforética formando así dos picos representativos, de modo tal que se deben evaluar a futuro nuevas condiciones para lograr una mejor separación de estos compuestos por medio de esta técnica.

Sin embargo, pese a que en el estudio de Costa y colaboradores [42] se emplearon condiciones electroforéticas similares, además del mismo buffer, se obtuvo en el estudio de estos autores un perfil electroforético de flavonoides con mejor simetría y resolución de picos, lo cual indica que la causa puede encontrarse en el tamaño del capilar empleado, en tanto que al emplearse un capilar más corto la muestra atravesó el mismo en menor tiempo y, por ende, fueron detectados antes de poder separarse adecuadamente los compuestos; así pues, también se recortaron los tiempos de migración, pues en este estudio los tiempos de migración de ambos picos oscilaron entre 3-4 minutos (3,5min y 3,7min para los picos 1 y 2, respectivamente), mientras que en el otro estudio oscilaron entre 8-9 minutos [42].

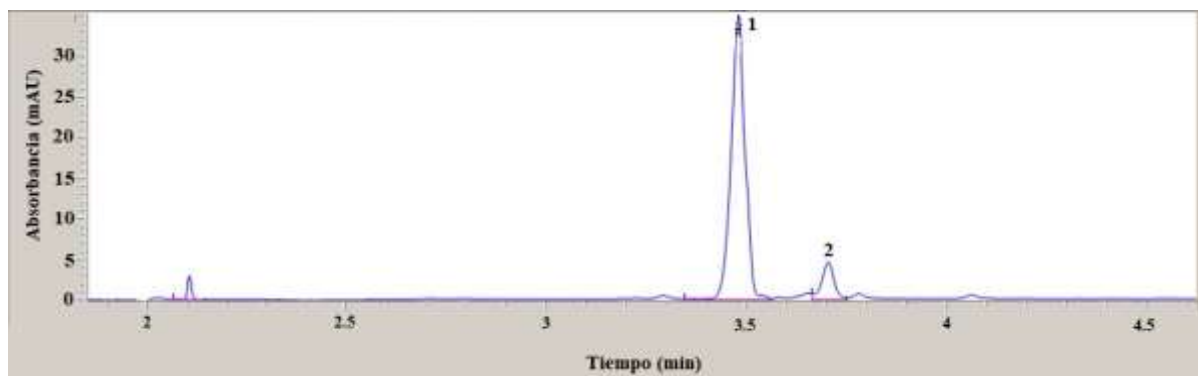


Figura 10. Electroferograma de CE de flavonoides de la fracción butanólica de hojas de *P. quadrangularis* Linn a 390nm.

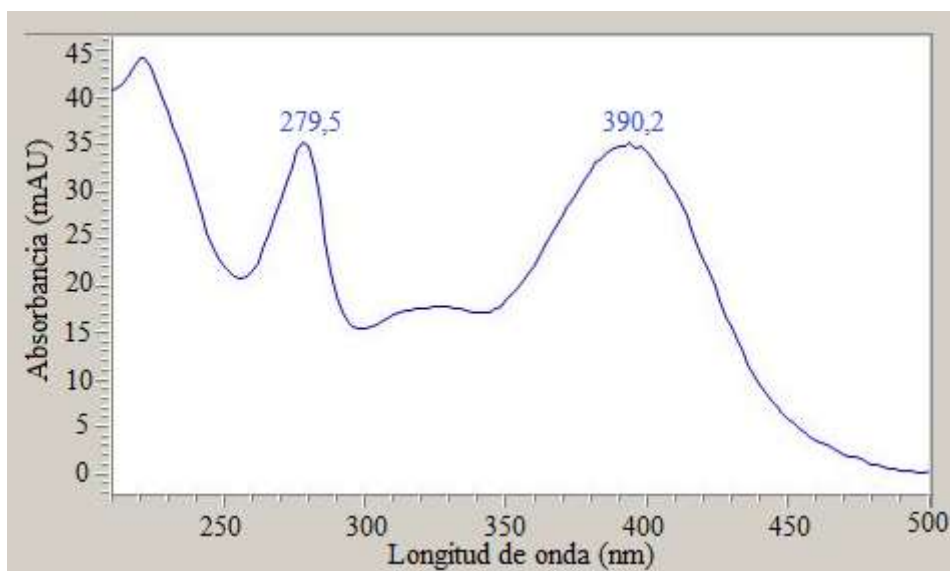


Figura 11. Barrido espectral de la CE de flavonoides de la fracción butanólica de *P. quadrangularis* Linn para el pico 1 con tiempo de migración 3,5min

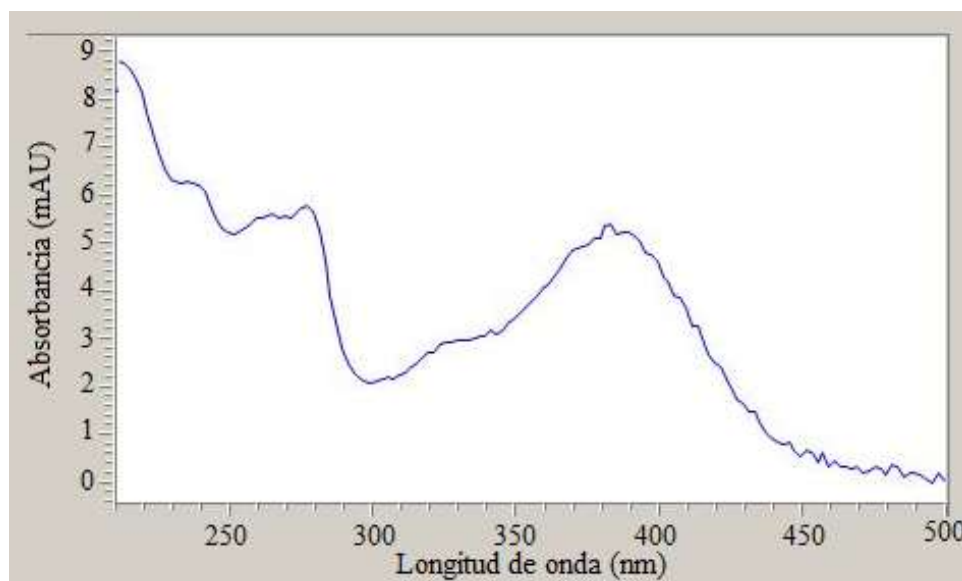


Figura 12. Barrido espectral de la CE de flavonoides de la fracción butanólica de *P. quadrangularis* Linn para pico 2 con tiempo de migración de 3,7min.

Cabe aclarar que la longitud de onda empleada para la detección de flavonoides varió de una técnica a otra, siendo de 330-350nm en UPLC y de 390nm en Electroforesis Capilar. Este hecho se debe al efecto batocrómico generado por la interacción entre el borato presente en el buffer y los flavonoides al encontrarse en pH alcalino, formando un complejo borato-flavonoides (pH 9,5) [42], en el cual se desplaza el máximo de absorción de estos compuestos a una longitud de onda mayor, pasando de 340nm a aproximadamente 390nm.

Por otra parte, mediante UPLC-DAD, bajo las condiciones empleadas, se buscó separar las saponinas presentes en la muestra de los flavonoides presentes en la misma, teniendo en cuenta que, debido a su similitud de polaridades, ambos grupos de compuestos químicos poseen tiempos de retención semejantes y, por ello, son difíciles de separar, además, debido a la falta de cromóforos en las saponinas, su detección mediante detectores que exciten bajo UV, tal como el Detector de Arreglo de Diodos, se hace compleja de realizar. Pese a esto, gracias a las

condiciones utilizadas se visualizó un compuesto mayoritario con tiempo de retención de 0,78min en la Figura 13 (Pico 1) que, gracias a la comparación con estudios previos [47], pudo ser identificado como quadrangulosido, el cual ya ha sido previamente reportado como la principal saponina presente tanto en *P. alata* como en *P. quadrangularis* Linn [40, 47].

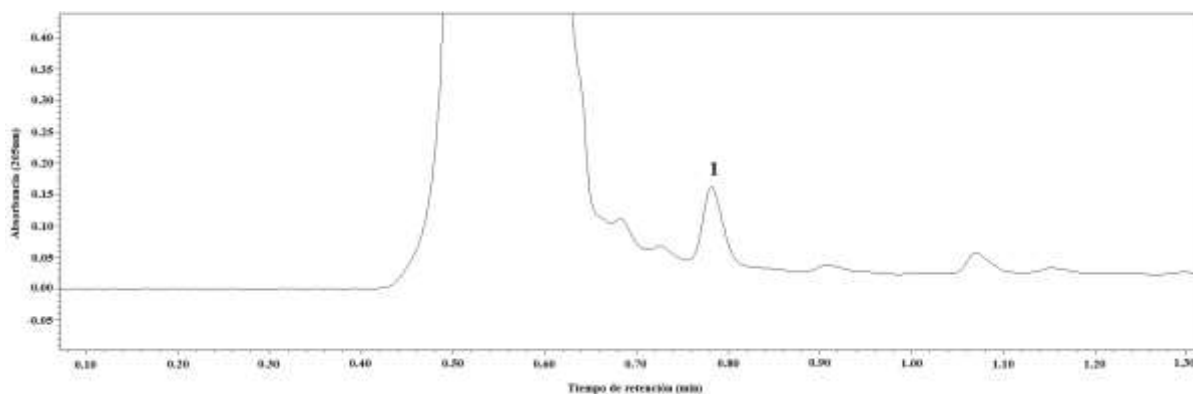


Figura 13. Cromatograma de UPLC de saponinas de la fracción butanólica de hojas de *P. quadrangularis* Linn a 205nm. 1. Quadrangulosido.

En el estudio de Costa y colaboradores [43], gracias al análisis de saponinas realizado por HPLC, se visualizaron varios picos en el cromatograma (Figura 14), de los cuales se resaltó un pico con tiempo de retención aproximado de 10min, el cual fue identificado también por estos autores como quadrangulosido, considerado la saponina mayoritaria de esta especie, tal como se había mencionado previamente. En vista de esto, y de la similitud entre ambos cromatogramas, además de la presencia de este pico como el mayoritario en ambos, se dio paso a la identificación del pico 1 de la Figura 13 como quadrangulosido. Adicionalmente, se debe tener en cuenta que los perfiles cromatográficos observados tanto en la Figura 13, como en la Figura 14, presentan diferentes constituyentes minoritarios en las muestras de *P. quadrangularis*, lo cual podría indicar la presencia de otras saponinas menores [47], tal como 22-hidroxi-isoquadrangulósido 9,19-ciclolanost-21, 24-epoxi-en-3 β 25,26-triol-3 β -O-gentiobiosido, la cual ha sido reportada en estudios previos dentro de la composición de esta especie [40]. Sin embargo, al ser compuestos difíciles de detectar por medio de los detectores empleados en estas técnicas, se requerirían de otras técnicas analíticas para poder inferir si estas saponinas se encuentran en menor proporción, o no, frente a otros compuestos como los flavonoides.

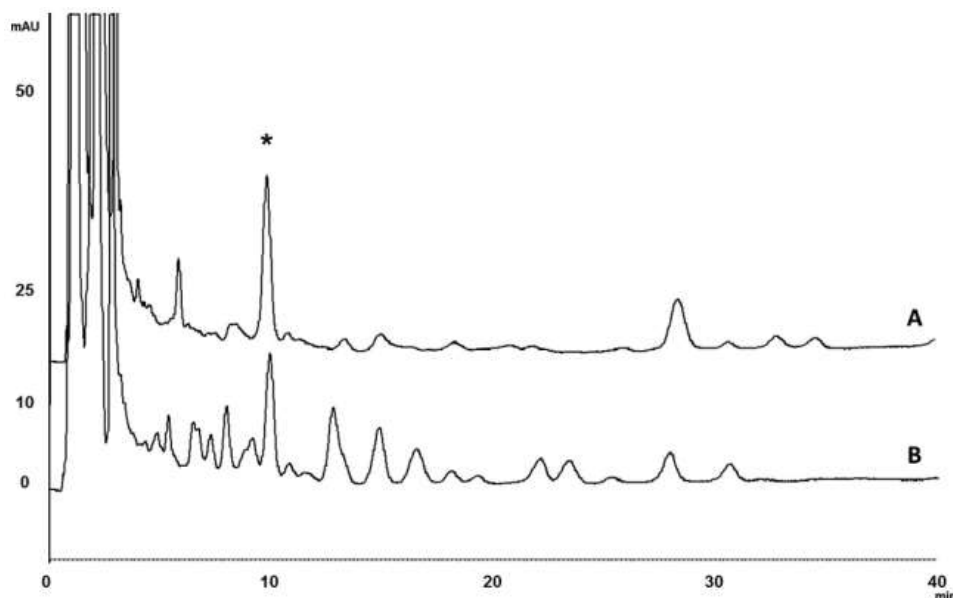


Figura 14. Cromatograma de HPLC de saponinas de extractos acuosos brutos de hojas de *P. alata* (A) y *P. quadrangularis* (B) a 205nm (* corresponde a quadrangulosido). Recuperado de [48]

2. Aislamiento de compuestos provenientes de la fracción butanólica de *P. quadrangularis* Linn

Previo al análisis por CPC se realizó la selección de las fases a utilizar, de modo que se evaluaron diferentes proporciones de butanol donde se buscaba identificar aquellas fases que presentaran una separación en el menor tiempo posible (Tabla 1), siendo el tiempo máximo permitido 90s, debido a que un tiempo de separación mayor podría afectar el análisis de CPC al no permitir la separación de los compuestos presentes en la misma; a su vez, también se tuvo en cuenta la interacción de los compuestos de interés con las fases evaluadas (Figura 15), de tal forma que se buscaba que, a medida que se aumentaba la proporción de butanol, los flavonoides se volvieran más afines a la fase superior y, por esta razón, los compuestos se iban separando a medida del tiempo de acuerdo a su afinidad con las dos fases. De este modo, las proporciones seleccionadas, las cuales además también están soportadas por la literatura, fueron las seleccionadas para el aislamiento de los principales flavonoides presentes en el extracto acuoso de *P. quadrangularis* Linn, dando como resultado una óptima separación de los mismos [53], que correspondieron a 0,2, 0,4, 0,6 y 0,8 y , además, mostraron tiempos de separación de fases dentro del rango esperado y una mayor interacción con la fase superior a medida que aumenta la proporción del butanol.

Tabla 1. Selección de fases móviles y estacionaria según tiempo de separación de las mismas.

Relaciones del butanol (1:X:1)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
Tiempo de separación de fases (segundos)	25	27	29	33	40	50	75	80

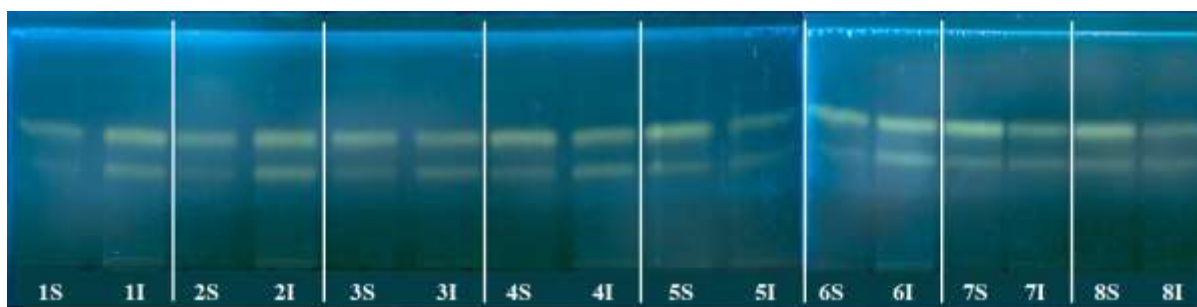


Figura 15. Cromatografía en placa delgada para la selección de las fases del CPC (móvil y estacionaria). Tener en cuenta que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 corresponden a las siguientes variaciones de la proporción del butanol con respecto a los otros dos solventes (1:X:1): 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 y 0.8, respectivamente. Además, S e I hacen referencia a la fase superior (Acetato de etilo y butanol) y a la fase inferior (agua), respectivamente.

Una vez seleccionado el sistema de gradiente a emplear, y realizada la separación por CPC, las subfracciones fueron analizadas por TLC, agrupadas de acuerdo a sus perfiles químicos por dicha técnica y secadas, obteniéndose 11 subfracciones con las siguientes masas: Subfracción I (3,5mg), subfracción II (5,6mg), subfracción III (0,5mg), subfracción IV (1,5mg), subfracción V (3,2mg), subfracción VI (62,1mg), subfracción VII (28,2mg), subfracción VIII (2,6mg), subfracción IX (10,4mg), subfracción X (7,5mg) y subfracción XI (49,9mg).

En la Figura 16 se puede visualizar los perfiles cromatográficos de saponinas (A) y de flavonoides (B) de las subfracciones (compuestos) obtenidos mediante el CPC a partir de la fracción butanólica, de modo tal que al determinar que el proceso de separación fue un éxito con respecto a la separación de los diferentes flavonoides presentes en la muestra, mientras que, en lo que respecta a las saponinas, las condiciones empleadas en este estudio para la CPC no son de gran ayuda para la separación de las mismas, esto debido a que la metodología empleada estaba enfocada a la separación de flavonoides, razón por la cual se requeriría de otras condiciones u otra técnica adicional, tal como cromatografía en columna por Sephadex LH-20, para lograr optimizar dicha separación.

Pese a lo anterior, en este estudio se optó por evaluar estas fracciones sin llegar a una purificación completa de los compuestos de las misma, en vista de que no se contaba con la masa necesaria de las subfracciones para realizar la separación por Sephadex y, finalmente, contar con la masa suficiente de los compuestos puros que se encontraban en estas subfracciones, para realizar los ensayos biológicos y fitoquímicos posteriores. Los resultados obtenidos en el estudio de Franco [14], permitieron de igual manera tomar esta decisión, en tanto que, tras realizar una cromatografía en columna por Sephadex LH-20 se perdió la actividad antimicrobiana sobre *H. pylori* al evaluar por separado mezclas de saponinas y flavonoides provenientes de la fracción butanólica activa de hojas de *Passiflora quadrangularis*, mientras que al evaluar las subfracciones donde se encontraban mezclas de estos dos grupos de compuestos se mantenía dicha actividad a una concentración de 250ppm.

De esta forma, ya que en la Figura 16B se observa que los principales flavonoides separados de la fracción butanólica se encuentran en las subfracciones 6-11, se seleccionaron las subfracciones 6, 9, 10 y 11 para evaluar su actividad antimicrobiana en los experimentos biológicos posteriores sobre *H. pylori*.

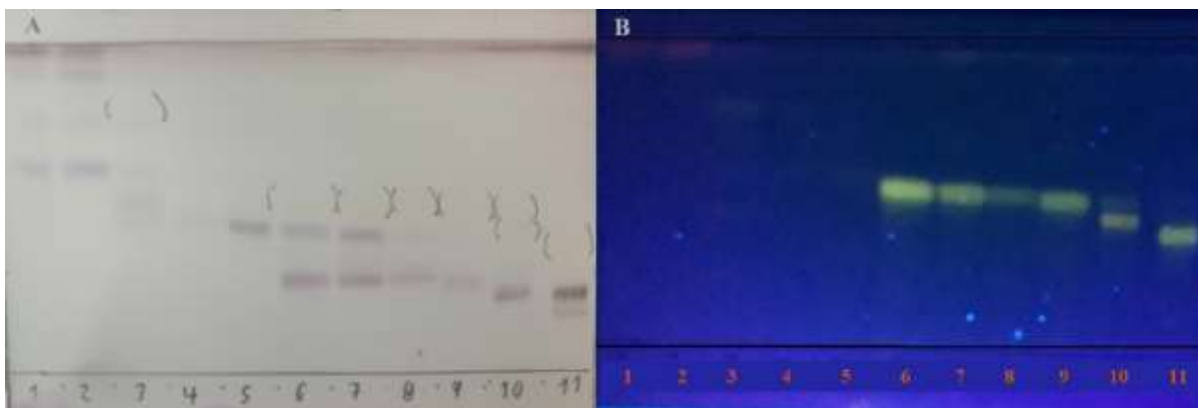


Figura 16. Cromatografía en Capa Delgada para la visualización de perfiles cromatográficos específicos para saponinas (A) y flavonoides (B), de las 11 subfracciones obtenidas a partir de la separación de la fracción butanólica de hojas de *P. quadrangularis* Linn. Esta cromatografía se realizó en sílica gel F_{254nm} como fase estacionaria, mientras que la fase móvil empleada fue Acetato de etilo: Ácido fórmico: Acetona: Agua (6:2:1:1). Revelador saponinas: Anisaldehído sulfúrico con calor/Luz visible y Revelador flavonoides: Reactivo natural/UV a 366nm.

3. Actividad antimicrobiana de compuestos obtenidos de la fracción butanólica de *P. quadrangularis* Linn

Previo a la evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos obtenidos de la fracción butanólica de hojas de *P. quadrangularis* Linn, y posterior a la realización de cada ensayo, se realizó la identificación de las cepas de referencia de *H. pylori* empleadas mediante las pruebas bioquímicas mencionadas con anterioridad (Ureasa, Catalasa y Oxidasa), cuyo resultado positivo se puede visualizar en la Figura 17.

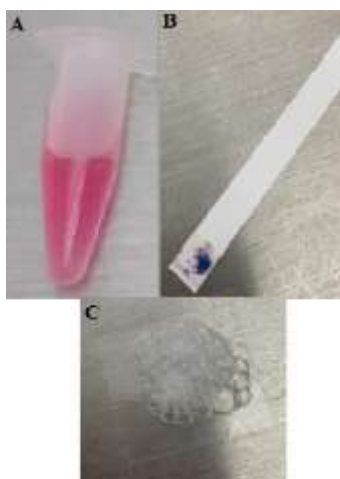


Figura 17. Pruebas bioquímicas para la confirmación de *H. pylori* NCTC 11637 y NCTC 11638. A. Ureasa, B. Oxidasa y C. Catalasa

Por otra parte, los resultados de actividad antimicrobiana obtenidos por medio del método de dilución en agar realizado bajo las recomendaciones del CLSI se indican en la tabla 2. Para cada uno de los compuestos evaluados no se encontró actividad frente a las cepas de referencia de *H. pylori*: NCTC 11637 y NCTC 11638 (CMI >200µg/mL)

Tabla 2. Actividad antimicrobiana de los compuestos aislados de la fracción butanólica de hojas de *P. quadrangularis* Linn

	Concentraciones evaluadas ($\mu\text{g/mL}$)	<i>H. pylori</i> NCTC 11637		<i>H. pylori</i> NCTC 11638	
		Actividad	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	Actividad	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
Subfracción 6	200	-	>200	-	>200
	100	-		-	
	50	-		-	
	25	-		-	
	12,5	-		-	
	6,25	-		-	
Subfracción 9	200	-	>200	-	>200
	100	-		-	
	50	-		-	
	25	-		-	
	12,5	-		-	
	6,25	-		-	
Subfracción 10	200	-	>200	-	>200
	100	-		-	
	50	-		-	
	25	-		-	
	12,5	-		-	
	6,25	-		-	
Subfracción 11	200	-	>200	-	>200
	100	-		-	
	50	-		-	
	25	-		-	
	12,5	-		-	
	6,25	-		-	
Antibióticos	Amoxicilina ($1\mu\text{g/mL}$)	+	< 1	+	< 1
	Levofloxacin ($1\mu\text{g/mL}$)	+	< 1	+	< 1

(+) Compuesto activo frente a *H. pylori*, (-) Compuesto sin actividad frente a *H. pylori*

Los anteriores resultados muestran que la actividad antimicrobiana para los compuestos evaluados no fue superior a la observada en estudios previos con la fracción butanólica de la que provienen, la cual presentó actividad antimicrobiana a concentraciones superiores a $250\mu\text{g/mL}$ sobre *H. pylori* [14], lo que sugiere diferentes situaciones:

En primer lugar, se esperaría que en estas subfracciones los compuestos se encuentren más concentrados que en la fracción de la que provienen y, por ende, que tales compuestos requieran de concentraciones menores para ejercer dicha actividad, tal como lo muestra Xie y colaboradores [57] en su estudio, donde se indica que las CMI de diferentes flavonoides sobre bacterias Gram negativas y Gram positivas como *B. subtilis* y *S. aureus* resistente a metilicina se encuentran en un rango de $2\text{-}200\mu\text{g/mL}$, o en el estudio de Zhang y colaboradores [58] donde evaluaron bajo el método de dilución en agar la actividad antimicrobiana sobre la cepa de referencia de *H. pylori* ATCC 43504 de los flavonoides quercetina, apigenina y (S)-sakuranetina, demostrando que dichos compuestos tienen CMI de 330.9 , 92.5 , y $87.3\mu\text{M}$, respectivamente. Sin embargo, en vista que a concentraciones inferiores a la CMI encontrada previamente para la fracción butanólica (250ppm) no se observa actividad antimicrobiana [14], puede que se requiera de mayores concentraciones de estos compuestos evaluados para llegar a producir la actividad deseada sobre las cepas empleadas de *H. pylori*, así como se muestra en el estudio de Adamczak y colaboradores [59], donde determinaron que la CMI de algunos flavonoides, como la vitexina y Vitexina-2"-O-ramnosido, frente a bacterias como *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* y *P. aeruginosa* se encuentra por encima de los $500\mu\text{g/mL}$.

En segundo lugar, de las 11 subfracciones agrupadas solo se evaluaron 4 de ellas, las cuales se consideraba poseían los 5 flavonoides representativos de dicha muestra mezclados con algunas saponinas que no se lograron aislar directamente mediante el CPC, sin embargo, es posible que la actividad antimicrobiana brindada por esa fracción butanólica sea causada por alguno o algunos de los compuestos presentes en las otras subfracciones no evaluadas, de modo tal que podría ser importante evaluar las mismas en estudios posteriores dentro del grupo.

Por último, puede que se requiera de la mezcla de estos compuestos obtenidos para que realmente se ejerza una actividad sobre *H. pylori*, tal como lo demuestra Franco [14] en su trabajo, donde tras realizar una separación por cromatografía por Sephadex LH-20 de las saponinas y los flavonoides presentes en la fracción butanólica de *Passiflora quadrangularis*, determinó que por separado ambos grupos de compuestos no presentaban actividad, mientras que en la subfracción donde se encontraba una mezcla de saponinas y flavonoides si se mantenía dicha actividad a concentraciones mayores a 250ppm, sino que requieran estar agrupados para poder dicha actividad sobre las cepas evaluadas de *H. pylori*.

Conclusiones

El análisis cromatográfico realizado sobre la fracción butanólica de hojas de *Passiflora quadrangularis* Linn permitió identificar los compuestos mayoritarios presentes en esta muestra correspondientes a orientina-2''-O-glucosido, orientina-2''-O-xilosido, vitexina-2''-O-glucosido, vitexin-2''-O-xilosido y vitexina, además de la presencia de la saponina quadrangulosido.

Por otra parte, los compuestos seleccionados de esta fracción butanólica, cuando son semipurificados, no presentaron actividad antimicrobiana sobre *H. pylori* a concentraciones inferiores a 200µg/mL, lo que indica que se requiere de una mayor concentración de los mismos para producir la actividad antimicrobiana deseada sobre *H. pylori*. o que, por otro lado, la actividad antimicrobiana de la fracción butanólica no sea brindada por ninguno de los compuestos evaluados, sino por los compuestos presentes en las otras subfracciones obtenidas en la purificación por CPC.

Recomendaciones

Realizar los ensayos de toxicidad de la fracción butanólica de *P. quadrangularis* Linn, en modelos celulares *in vitro* y en modelos *in vivo* murinos. Así como también la evaluación de la actividad anti *H. pylori* en modelos celulares *in vitro* e *in vivo* infectados con este microorganismo.

Por otro lado, se sugiere optimizar las condiciones de electroforesis capilar y UPLC orientada al análisis de saponinas, con el fin de determinar la mejor metodología que permita obtener una adecuada resolución de flavonoides, para el caso de la CE-DAD, y de saponinas para el caso de la UPLC-DAD.

Referencias

- [1] *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance: a WHO high priority? Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. [Internet]. 2017 [Citado 23 nov 2021]; 14(7): 383–384. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.57>.
- [2] Baker-Abou D. Plants against *Helicobacter pylori* to combat resistance: An ethnopharmacological review. Biotechnol. Rep. [Internet]. 2020 [Citado 1 nov 2021]; 26 (1): 1-15. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00470>
- [3] Conteduca V, Sansonno D, Lauletta G, Russi S, Ingravallo G, Dammacco F. *H. pylori* infection and gastric cancer: State of the art (Review). Int. J. Oncol. [Internet]. 2012 [Citado 1 nov 2021]; 42 (1): 5-18. Disponible en: <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1701>
- [4] Hooi JKY, Ying-Lai W, Khoo-Ng W, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, Malfertheiner P, Graham DY, Wong VWS, Wu JCY, Chan FKL, Sung JJY, Kaplan GG, Ng SC. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. Gastroenterology [Internet]. 2017 [Citado 1 nov 2021]; 153 (2): 420-429. Disponible en: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.022>
- [5] Bravo LE, Cortés A, Carrascal E, Jaramillo R, García LS, Bravo PE, Badel A, Bravo PA. *Helicobacter pylori*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. cm [Internet]. 2003 [Citado 1 nov 2021]; 34 (3): 124-131. Disponible en: <https://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/263>
- [6] Vidal-Bonifácio B, Dos Santos-Ramos MA, Bento-Da Silva P, Bauab TM. Antimicrobial activity of natural products against *Helicobacter pylori*: a review. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. [Internet]. 2014 [Citado 1 nov 2021]; 13(1): 54-63. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12941-014-0054-0>
- [7] Otero W, Trespalacios-Rangel AA, Otero L, Vallejo MT, Torres-Amaya M, Pardo R, Sabbagh L. Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Management of Adult Patients with *Helicobacter pylori* Infection. Rev. Col. Gastroenterol. [Internet]. 2015 [Citado 1 nov 2021]; 30 (1): 17-33. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572015000500004&lng=en.
- [8] Pellicano R. Which should be the first-line treatment for *Helicobacter pylori* in Colombia? A lesson from a recent study. Biomedica [Internet]. 2019 [Citado 1 nov 2021]; 39(4): 811-815. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572019000400811&lng=en.
- [9] Savoldi A, Carrara E, Graham DY, Conti M, Tacconelli E. Prevalence of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*: A Systematic Review and Meta-Analysis in World Health Q1 Organization Regions. Gastroenterology [Internet]. 2018 [Citado 1 nov 2021]; 155(5): 1372-1382. Disponible en: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.07.007>
- [10] Trespalacios AA, Otero-Regino W, Mercado-Reyes M. *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin and amoxicillin in Colombian patients. Rev. Col. Gastroenterol. [Internet]. 2010 [Citado 1 nov 2021]; 25(1): 31–38. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572010000100009&lng=en.

- [11] Graham DY, Lu H, Yamaoka Y. A Report Card to Grade *Helicobacter pylori* Therapy. *Helicobacter* [Internet]. 2007 [Citado 1 nov 2021]; 12(4): 275-278. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2007.00518.x>
- [12] Sathyan A, Vincent L, Krishna BA, Pradeepan V, Dileep AC. A Study on the Antioxidant and Anti-Microbial Properties of Juices of Four Varieties of Passion Fruit (*Passiflora edulis*, *Passiflora foetida*, *Passiflora edulis f. flavicarpa* and *Passiflora quadrangularis*). *IJAIR* [Internet]. 2019 [Citado 1 nov 2021]; 7(5): 473-483. Disponible en: https://www.ijair.org/administrator/components/com_jresearch/files/publications/IJAIR_2994_FINAL.pdf
- [13] Sidik-Bujang J, Devi-Ramaiya S, Harah-Zakaria M. Assessment of Total Phenolic, Antioxidant, and Antibacterial Activities of *Passiflora* Species. *Sci. World J.* [Internet]. 2014 [Citado 1 nov 2021]; 2014: 1-10. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2014/167309>
- [14] Franco-Rodríguez JD. Evaluación de extractos y fracciones de hojas de *Passiflora quadrangularis* frente a *Helicobacter pylori* [Tesis de pregrado]. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana; 2021.
- [15] Gómez M, Ruíz O, Hernández D, Albis R, Sabbagh L. Erradicación del *Helicobacter pylori*: encuesta realizada por la Asociación Colombiana de Gastroenterología. *Rev. Col. Gastroenterol.* [Internet]. 2015 [citado 1 nov 2021]; 30(1): 25-31. Disponible en: <https://doi.org/10.22516/25007440.19>
- [16] Trespalacios-Rangel AA, Otero W, Arévalo-Galvis A, Poutou-Piñales RA, Rimbara E, Graham DY. Surveillance of levofloxacin resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Bogotá-Colombia (2009-2014). *PLoS One* [Internet]. 2016 [Citado 1 nov 2021]; 11(7): 1–10. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160007>
- [17] Trespalacios A, Otero W, Caminos J, Mercado M, Ávila J, Rosero L, Arévalo A, Poutou R, Graham D. Phenotypic and genotypic analysis of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* from Bogotá D.C., Colombia. *J. Microbiol.* [Internet]. 2013 [Citado 1 nov 2021]; 51(4): 448–452. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s12275-013-2465-6>
- [18] Trespalacios A, Regino W, Mercado M. *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin and amoxicillin in Colombian patients. *Rev. Col. Gastroenterol.* [Internet]. 2010 [Citado 1 nov 2021]; 25(1): 31–38. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-99572010000100009
- [19] Otero W, Gómez M, Otero L, Trespalacios-Rangel A. *Helicobacter pylori*: ¿cómo se trata en el 2018?. *Rev. Gastroenterol. Perú* [Internet]. 2018 [Citado 1 nov 2021]; 38 (1): 54-63. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292018000100009
- [20] Cuervo-Matamoros PA. Diversidad y usos de pasifloras (Pasifloraceae) silvestres y cultivadas en el departamento del Casanare, Orinoquia Colombiana [Tesis de pregrado]. Bogotá D.C.: Universidad de la Salle; 2020.
- [21] Hadi-Hameed I, Calixto-Cotos MR, Yahya-Hadi M. Antimicrobial, Antioxidant, Hemolytic, Anti-anxiety, and Antihypertensive activity of *Passiflora* species. *Res. J.*

- Pharm. Technol. [Internet]. 2017 [Citado 1 nov 2021]; 10(11): 4079-4084. Disponible en: <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2017.00739.9>
- [22] Roldán IJ, Castaño R, Navas MC. Mutaciones del gen ARN ribosómico 23S de *Helicobacter pylori* asociadas con resistencia a claritromicina en pacientes atendidos en una unidad de endoscopia de Medellín, Colombia. Biomédica [Internet]. 2019 [Citado 1 nov 2021]; 39(2): 117-129. Disponible en: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i4.4377>
- [23] Porras C, Nodora J, Sexton R, Ferreccio C, Jimenez S, Dominguez RL, Cook P, Anderson G, Morgan DR, Baker LH, Greenberg ER, Herrero R. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in six Latin American countries (SWOG Trial S0701). Cancer Causes Control [Internet]. 2013 [Citado 1 nov 2021]; 24(2): 209–215. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10552-012-0117-5>
- [24] Malfertheiner P, Megraud F, O’Morain C, Gisbert J, Kuipers E, Axon A, Bazzoli F, Gasbarrini A, Atherton J, Graham D, Hunt R, Moayyedi P, Rokkas T, Rugge M, Selgrad M, Suerbaum S, Sugano K, El-Omar E. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. Gut [Internet]. 2016 [Citado 1 nov 2021]; 66 (1): 6–30. Disponible en: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312288>
- [25] Correa S, Cardona AF, Correa T, García HI, Estrada S. Prevalencia de *Helicobacter pylori* y características histopatológicas en biopsias gástricas de pacientes con síntomas dispépticos en un centro de referencia de Medellín. Rev. Colomb. Gastroenterol. [Internet]. 2016 [Citado 1 nov 2021]; 31(1): 9-15. Disponible en: <https://doi.org/10.22516/25007440.67>
- [26] Safavi M, Sabourian R, Foroumadi A. Treatment of *Helicobacter pylori* infection: Current and future insights. World J. Clin. Cases [Internet]. 2016 [Citado 1 nov 2021]; 4(1): 5-19. Disponible en: <https://doi.org/10.12998/wjcc.v4.i1.5>
- [27] Fasciana T, Di-Carlo P, Jouini A, Di-Giulio M. *Helicobacter pylori*: Infection and New Perspective for the Treatment. Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. [Internet]. 2019 [Citado 22 nov 2021]; 2019 (1): 1-3. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2019/9431369>
- [28] Guimarães-Amaral R, Floresta-Gomes SV, dos Santos-Luciano MC, do Ó-Pessoa C, Nalone-Andrade L, Severino P, Célio-Brandão G, Mendes-Bomfim L, Pereira-Soares MB, Pereira-Bezerra D, Maurício-David J, Andrade-Carvalho A. Cytotoxic potential of 14 *Passiflora* species against cancer cells. J. Med. Plants Res. [Internet]. 2019 [Citado 1 nov 2021]; 13(7): 157-166. Disponible en: <https://doi.org/10.5897/JMPR2019.6744>
- [29] O’Mahony R, Al-Khtheeri H, Weerasekera D, Fernando N, Vaira D, Holton J, Basset C. Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori*. World J. Gastroenterol. [Internet]. 2005 [Citado 1 nov 2021]; 11(47): 7499–7507. Disponible en: <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i47.7499>
- [30] Saranraj P, Sivasakthi S, Deepa MS. Phytochemistry of pharmacologically important medicinal plants – A Review. Int. J. Curr. Res. Chem. Pharm. Sci. [Internet]. 2016 [Citado 1 nov 2021]; 3 (11): 56-66. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.22192/ijrcrps.2016.03.11.009>
- [31] Asha MK, Debraj D, Prashanth D, Edwin JR, Srikanth HS, Muruganantham N, Dethe SM, Anirban B, Jaya B, Deepak M, Agarwal A. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of a flavonoid rich extract of *Glycyrrhiza glabra* and its probable mechanisms of action. J.

- Ethnopharmacol. [Internet]. 2013 [Citado 25 nov 2021]; 145 (2013): 581-586. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.11.033>
- [32] Lawal TO, Igbokwe CO, Adeniyi BA. Antimicrobial activities and the Bactericidal Kinetics of *Allium ascalonicum* Linn. (Whole plant) against standard and clinical strains of *Helicobacter pylori*: Support for Ethnomedical Use. J. Nat. Scienc. Res. [Internet]. 2014 [Citado 24 nov 2021]; 4 (8): 48-57. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/234654646.pdf>
- [33] Mahady GB, Pendland SL, Stoia A, Hanill FA, Fabricant Dietz BM, Chadwick LR. In Vitro Susceptibility of *Helicobacter pylori* to Botanical Extracts used Traditionally for the Treatment of Gastrointestinal Disorders. *Phytother. Res.* [Internet]. 2005 [Citado 24 nov 2021]; 19(11): 988-991. <https://doi.org/10.1002/ptr.1776>
- [34] Reyes-Sánchez JJ, Sáenz-Blanco AF. Propiedades Antimicrobianas de Extractos de Hojas de Especies de *Passiflora* frente a *Helicobacter pylori* [Tesis de pregrado]. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana; 2019.
- [35] Arianna-Gissella MZ, Cristina-Del Rocio VA. Composición química y actividad antioxidante de *Passiflora tarminiana* [Tesis de pregrado]. Guayaquil: Universidad de Guayaquil; 2021.
- [36] Deginani NB. Las especies argentinas del género *Passiflora* (passifloraceae). *Darwiniana* [Internet]. 2001 [Citado 1 nov 2021]; 39 (2): 43-129. Disponible en: <https://doi.org/10.14522/darwiniana.2014.391-2.198>
- [37] Posada P, Ocampo J, Santos LG. Estudio del comportamiento fisiológico de la semilla de tres especies cultivadas de *Passiflora* L. (Passifloraceae) como una contribución para la conservación *ex situ*. *Rev. Colomb. Cienc. Hortíc.* [Internet]. 2019 [Citado 1 nov 2021]; 8 (1): 9-19.
- [38] Carvajal LM, Turbay S, Álvarez LM, Rodríguez A, Alvarez M, Bonilla K, Restrepo S, Parra M. Functional and nutritional properties of six species of *Passiflora* (Passifloraceae) from the department of Huila, Colombia. *Caldasia* [Internet]. 2014 [Citado 1 nov 2021]; 36 (1): 1-15. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15446/caldasia.v36n1.21243>
- [39] Ocampo-Perez J, Merlín-Urbe Y. *Passiflora* de Colombia (*Passifloraceae*). Colombia [Internet]. 2014 [Citado 24 nov 2021]; 616(1): 1-7. Disponible en: <https://fieldguides.fieldmuseum.org/sites/default/files/rapid-color-guides-pdfs/616%20Passiflora%20de%20Colombia.pdf>
- [40] Miranda-Freire JM. Evaluación de la seguridad *in vitro* de los extractos de *Passiflora quadrangularis* y *Bidens andicola* (Ñachag) para su potencial aplicación en protectores solares [Tesis de pregrado]. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2019.
- [41] Hadi-Hameed I, Calixto-Cotos MR, Yahya-Hadi M. Antimicrobial, Antioxidant, Hemolytic, Anti-anxiety, and Antihypertensive activity of *Passiflora* species. *Research J. Pharm. and Tech.* [Internet]. 2017 [Citado 24 nov 2021]; 10(11): 4079-4084. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5958/0974-360X.2017.00739.9>
- [42] Costa GM, Gazola AC, Zucolotto SM, Castellanos L, Ramos FA, Reginatto FH, Schenkel EP. Chemical profiles of traditional preparations of four South American *Passiflora*

- species by chromatographic and capillary electrophoretic techniques. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2016, 26 (4): 451-458. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.02.005>
- [43] Figueiredo D, Colomeu TC, Gonzalez-Schumacher NS, Stivanin-Silva LG, Betim-Cazarin CB, Molina-Meletti LM, Romani-Fernandes LG, Prado MA, Zollner RL. Aqueous leaf extract of *Passiflora alata* Curtis promotes antioxidant and anti-inflammatory effects and consequently preservation of NOD mice beta cells (non-obese diabetic). *Int. Immunopharmacol.* [Internet]. 2016 [Citado 1 nov 2021]; 35: 127-136. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.03.031>
- [44] Castellanos L, Naranjo-Gaybor SJ, Forero AM, Morales G, Wilson XEG, Ramos FA, Choi YH. Metabolic fingerprinting of banana passion fruits and its correlation with quorum quenching activity. *Phytochemistry* [Internet]. 2020 [Citado 1 nov 2021]; 172: 1-13. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112272>
- [45] Hindler JA, Humphries RM, Richter SS, Jorgensen JH, Bernard K, Killian SB, Bodeis-Jones S, Kohner P, Castanheira M, Matuschek E, Citron DM, McDermott P, Couturier MR, Patel S, Fritsche TR. *M45 Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria* 3rd. Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, USA; 2015.
- [46] Sakalem ME, Negri G, Tabach R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. *Rev. Bras. Farmacogn.* [Internet]. 2012 [Citado 1 nov 2021]; 22 (6): 1219-1232. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000108>
- [47] Echeverry SM, Medina HI, Costa GM, Aragón DM. Optimization of flavonoid extraction from *Passiflora quadrangularis* leaves with sedative activity and evaluation of its stability under stress conditions. *Rev. Bras. Farmacogn.* [Internet]. 2018 [Citado 25 nov 2021]; 28(2018): 610-617. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.06.005>
- [48] Costa-Modesti G, Gazola AC, Madóglia FA, Zucolotto SM, Reginatto FH, Castellanos L, Ramos FA, Duque C, Schenkel EP. Vitexin derivatives as chemical markers in the differentiation of the closely related species *Passiflora alata curtis* and *Passiflora quadrangularis linn.* *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* [Internet]. 2013 [Citado 1 nov 2021]; 36 (12): 1697-1707. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/10826076.2012.695316>
- [49] Paredes-Salido F, Fernández AC. Polifenoles de aplicación en farmacia. Elsevier [Internet]. 2005 [Citado 1 nov 2021]. 24 (8): 85-94. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-polifenoles-aplicacion-farmacia-13078579>
- [50] Sparg SG, Light ME, Van-Staden J. Biological activities and distribution of plant saponins, *J. Ethnopharmacol.* [Internet]. 2004 [Citado 1 nov 2021]; 94(2): 219-243. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.05.016>
- [51] Souza-Gracioso J, Vilegas W, Hiruma-Lima CA, Souza-Brito ARM. Effects of Tea from *Turnera ulmifolia* L. on Mouse Gastric Mucosa Support the Turneraceae as a New Source of Antiulcerogenic Drugs. *Biol. Pharm. Bull.* [Internet]. 2002 [Citado 1 nov 2021]; 25 (4): 487-491. Disponible en: <https://doi.org/10.1248/bpb.25.487>

- [52] Wasicky A, Hernandez LS, Vetore-Neto A, Moreno PRH, Bacchi EM, Myiake-Kato ET, Yoshida M. Evaluation of gastroprotective activity of *Passiflora alata*. Rev. Bras. Farmacogn. [Internet]. 2015 [Citado 1 nov 2021]; 25 (4): 407-412. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.011>
- [53] Gazola AC, Costa GM, Zucolotto SM, Castellanos L, Ramos FA, Monteiro-De Limaf TC, Schenkel EP. The sedative activity of flavonoids from *Passiflora quadrangularis* is mediated through the GABAergic pathway. Biomed. Pharmacother. [Internet]. 2018 [Citado 1 nov 2021]; 100: 388-393. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.002>
- [54] MacFaddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica 3ra edición. Estados Unidos: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2003. p. 675.
- [55] Merck. Microbiología Bactident® Oxidasa para detección de la citocromooxidasa en microorganismos. Merck [Citado 25 nov 2021]. Disponible en: [file:///C:/Users/HP/Downloads/07-115-3-pb-113300-span-mk%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/HP/Downloads/07-115-3-pb-113300-span-mk%20(1).pdf)
- [56] Monedero-Pasiminio JM. Identificación y caracterización de flavonoides por espectrometría de masas en melazas residuales de un ingenio azucarero [Tesis de pregrado] Santiago de Cali: Universidad ICESI; 2015.
- [57] Xie Y, Yang W, Tang F, Chen X, Ren L. Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism. Curr. Med. Chem. [Internet]. 2015 [Citado 25 nov 2021]; 22 (1): 132-149. Disponible en: <https://doi.org/10.2174/0929867321666140916113443>
- [58] Zhang L, Kong Y, Wu D, Zhang H, Wu J, Chen J, Ding J, Hu L, Jiang H, Shen X. Three flavonoids targeting the β -hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase from *Helicobacter pylori*: Crystal structure characterization with enzymatic inhibition assay. Protein Sci. [Internet]. 2008 [Citado 25 nov 2021]; 17(11): 1971–1978. Disponible en: <https://doi.org/10.1110/ps.036186.108>
- [59] Adamczak A, Ożarowski M, Karpiński TM. Antibacterial Activity of Some Flavonoids and Organic Acids Widely Distributed in Plants. J. Clin. Med. [Internet]. 2019 [Citado 23 nov 2021]; 31;9(1):109-125. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/jcm9010109>.