UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Evaluación de la actividad anti-*Helicobacter pylori* de compuestos fenólicos de *Cyrtocarpa procera* Kunth

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Q.I. MIRIAM MERINO RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA

CODIRECTORA DE TESIS:

DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ

CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO MAYO DEL 2025

COMITÉ REVISOR DE TESIS:

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa- Director de tesis (CEIB-UAEM)

Dra. Irma Romero Álvarez- Codirectora (Facultad de Medicina-UNAM)

Dra. Erika Gómez Chang (Facultad de Medicina-UNAM)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB-UNAM)

Dr. Fernando Cuevas Remigio (CEIB-UAEM)

El presente proyecto de tesis de maestría se realizó en el Laboratorio de Investigación de Plantas Medicinales del el Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

RECONOCIMIENTOS Y AGRADECIMIENTOS

Para la realización del presente proyecto se contó con el apoyo de la beca de maestría No. 609126 otorgada por la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) para estudiantes nacionales de posgrado.

Investigación realizada gracias al apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), DGAPA de la UNAM, IN207622 y IN206625

Contenido

1. MARCO TEÓRICO 14
1.1 *Helicobacter pylori* 14
1.2 Vías de transmisión 15
1.3 Epidemiología 15
1.4 Patogenia de la infección por *H. pylori* 16
1.4.1 Colonización gástrica: factores contribuyentes 17
1.4.2 Daño gástrico: factores contribuyentes 19
1.5 Patologías relacionas con *Helicobacter pylori* 20
1.6 Tratamiento para la erradicación de *H. pylori* 21
1.6.1 Problemática actual de las terapias anti-*H. pylori*. 22
1.7 Las plantas, una base del sistema de la Medicina Tradicional 23
1.7.1 Plantas medicinales empleadas en el tratamiento de úlceras, gastritis y terapias anti-*H. pylori* 24
1.8 Taxonomia de *Cyrtocarpa procera* Kunth (Kew, 2024) 25
1.8.1 Generalidades de *Cyrtocarpa procera* Kunth 25
1.9 Uso medicinal de *Cytocarpa procera* Kunt 27
1.10 Antecedentes fitoquímicos de *Cyrtocarpa procera* 28
1.10.1 Antecedentes de las actividades biológicas de *Cyrtocarpa procera* 29
1.10.2 Antecedentes directos. Estudio preliminar del perfil químico de *Cyrtocarpa procera* 31
1.11 Flavonoides 33
1.11.1 Clasificación de flavonoides 34
1.11.2 Antocianinas, proantocianidinas o taninos condensados 35
1.11.3 Propiedades de las antocianinas 37
2. JUSTIFICACIÓN 38
3. HIPÓTESIS 39
4. OBJETIVO GENERAL 39
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 40
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL 41
7. METODOLOGÍA 42

7.1 Análisis del extracto metanólico Cp por Cromatografía en Capa Fina (CCF) 42
7.2 Cromatografía en columna abierta (CCA) 42
7.3 Fraccionamiento del extracto metanólico Cp de la corteza de *C. procera* por Cromatografía en Columna Abierta (CCA) 43
7.3.1 Fraccionamiento primario por CCA con Sephadex LH-20 43
7.3.2 Fraccionamiento secundario por Cromatografía en Columna Abierta (CCA) con sílica gel 60 43
7.3.3 Cromatografía en Capa Fina (CCA) con sílica gel 60. Raspado en placa de vidrio 44
7.4 Caracterización estructural de un compuesto aislado por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) 44
7.5 Cromatografía en Columna Abierta (CCA) con Resina AXD-2. Fracción fenólica. 45
7.6 Ensayo de actividad anti-*Helicobacter pylori* de extractos metanólicos y fracciones aisladas de *Cyrtocarpa procera*. 46
7.6.1 Preparación de medio Mueller Hinton Broth (MHB) 47
7.6.2 Cepa bacteriana y preparación del lugar de trabajo. 47
7.6.3 Determinación de concentración inhibitoria mínima (CMI) del extracto metanólico Cp, de las fracciones aisladas SBN y FF. 47
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 51
8.1 Análisis del extracto metanólico Cp por Cromatografía en Capa Fina (CCF) 51
8.2 Cromatografía en columna abierta 52
8.2.1 Fraccionamiento primario del extracto metanólico Cp de la corteza de *C. procera* por Cromatografía en Columna Abierta (CCA) con Sephadex LH-20 ... 53
8.2.2 Fraccionamiento secundario por CCA con sílica gel 60 (40-63 µm) de la reunión denominada fracción S45 del fraccionamiento primario. 57
8.6 Ensayo de actividad anti-*Helicobacter pylori* de extractos y fracciones aisladas de *Cyrtocarpa procera*. 61
8.3 Cromatografía preparativa en Capa Fina (CCF) con sílica gel 60. Raspado en placa de vidrio. 61
8.4 Caracterización estructural del compuesto SNB por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) 62
8.5 Cromatografía en Columna Abierta (CCA) con Resina Amberlite AXD-2. Fracción fenólica. 65

8.6.1 Compuestos y diluciones 68
8.6.2 CMI del metronidazol como antibiótico control positivo..... 69
8.6.3 CMI del extracto metanólico Cp 70
8.6.4 CMI de la fracción pura (SNB) 73
8.6.5 CMI de la fracción fenólica (FF) 74
9. CONCLUSIONES 76
10. PERSPECTIVAS 77
11. BIBLIOGRAFÍA..... 78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de la distribución geográfica de *Cyrtocarpa procera* en la República Mexicana. Las manchas rojas indican los estados donde se encuentra distribuida. Imagen CONABIO (https://enciclovida.mx/especies/171291-cyrtocarpa-procera). 26

Figura 2. Imágenes del árbol (A), hojas, fruto (B) y corteza (C) de *Cyrtocarpa procera.* Tomadas de la página digital de CONABIO (https://enciclovida.mx/especies/171291-cyrtocarpa-procera)..... 27

Figura 3. Estructura general de flavonoide con numeración y especificación de cada anillo. 34

Figura 4. Estructura general de antocianidinas. 35

Figura 5. Estructura básica de los taninos condensados. 36

Figura 6. Estructura de una antocianina. 36

Figura 7. Diagrama general de la estrategia experimental para el aislamiento de compuestos y evaluaciones farmacológicas a partir de la corteza de *C. procera*. 41

Figura 8. Diagrama general de la estrategia experimental para el ensayo de actividad anti-*H. pylori* de compuestos aislados a partir de la corteza de *C. procera*. 46

Figura 9. Representación de las diluciones seriadas aplicadas en placa de 24 pozos de las muestras de la corteza de *C. procera.* 49

Figura 10. Cromatografía en capa fina Fase Normal del extracto metanólico de *C. procera.* Revelada con vainillina 1% H_2SO_4 /Etanol a 120ºC……..*51*

Figura 11. Cromatografía en capa fina Fase Normal del fraccionamiento primario por Sephadex LH-20 del extracto metanólico de *C. procera* (Cp), en donde A) y C) se observó con luz natural B) y D) se revelaron con vainillina 1% H_2SO_4 /Etanol a 120ºC. C: Extracto metanólico de *C. procera*……..*56*

Figura 12. Columna montada con sílica gel 60, utilizada para la separación de compuestos del extracto metanólico de *C. procera.* La fase móvil empleada fue butanol:ácido fórmico:agua (40:10:15). ……57

Figura 13. Cromatografía en capa fina Fase Normal de las reuniones del fraccionamiento secundario con sílica gel 60 de la reunión S45 del extracto metanólico de *C. procera*, en donde A) y B) se observó con luz natural C) y D) se revelaron con vainillina 1% $H_2SO_4/Etanol$ a 120ºC. C: Extracto metanólico de *C. procera.* S: fracción S45……59

Figura 14. *Espectro de RMN de protón ¹H a 600 MHz disuelto en oxido de deuterio* $(\mathrm{D_2O})$*……..……..62*

Figura 15. *Espectro de RMN de protón ¹³C a 600 MHz disuelto en oxido de deuterio* (D_2O)*……*64

Figura 16. Columna con XAD-2 como fase estacionaria lista para eluir con metanol. 66

Figura 17. Placa cromatografica antes de revelar, a luz visible (izquierda). Placa observada en luz UV a 366 nm (derecha)..... 66

Figura 18. Muestras stock disueltas en DMSO: A). Extracto metanolico (Cp), B). Fracción fenolica (FF) y Fracción SNB) 69

Figura 19. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por metronidazol. 70

Figura 20. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por metronidazol comparado con Cp*. 70*

Figura 21. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por metronidazol comparado con SNB.. 73

Figura 22. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por metronidazol comparado con FF. 74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos identificados de extractos obtenidos de la corteza de Cyrtocarpa procera..... 28

Tabla 2. Actividad antibacteriana de diferentes extractos de Cyrtocarpa procera. 29

Tabla 3. Actividad gastroprotectora y resolutora de úlceras del extracto metanólico de Cyrtocarpa procera..... 30

Tabla 4. Otras actividades de extractos de C. procera..... 31

Tabla 6. Peso de las fracciones obtenidas del primer fraccionamiento por Sephadex LH-20 del extracto metanólico Cp de la corteza de C. procera. 54

Tabla 7. Peso de las fracciones obtenidas del segundo fraccionamiento (fracción S45) con sílica gel fase normal como fase estacionaria y BAW (40:10:15) como fase móvil de la reunión B. 58

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
HCl	Ácido clorhídrico
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
NH_4	Amonio
AINE´s	Antiinflamatorios no esteroideos
BAW	Butanol/ácido/agua
CA_{50}	Capacidad Antioxidante 50
^{13}C	Carbono 13
C_f	Concentración final
CF_{50}	Concentración fúngica 50
C_i	Concentración inicial
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
GC/MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CCF	Cromatografía en capa fina
CCA	Cromatografía en columna abierta
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HPLC/MS.	Cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas
δ	Desplazamiento químico
DO	Densidad óptica
DMSO	Dimetilsulfóxido
D_2O	Dióxido de deuterio
CO_2	Dióxido de carbono
Cp	Extracto metanólico
FF	Fracción fenólica
SNB	Fracción purificada

IBP	Inhibidores de la bomba de protones
IL-8	Interleucina-8
Kg	Kilogramo
m/z	Masa/carga
MHz	Mega Hertz
DEPTQ	Mejora sin distorsión por transferencia de polarización (carbonos cuaternarios)
MHB	Mueller Hinton Broth
Nm	Nanómetro
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
OMS	Organización Mundial de Salud
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
UNAM	Universidad Autónoma de México
$CO(NH_2)_2$	Urea

RESUMEN

Helicobacter pylori, una bacteria Gram-negativa que coloniza la mucosa gástrica, es el agente causal de diversas patologías gástricas como son la gastritis, úlceras pépticas, linfoma MALT y cáncer gástrico. La infección por la bacteria tiene una alta prevalencia global (~50%). Existen tratamientos para erradicar a la bacteria, sin embargo, la alta resistencia a los antibióticos empleados hace que las terapias disminuyan su eficiencia. Ante esta problemática, se ha explorado el potencial de *Cyrtocarpa procera*, una planta endémica de México, como una alternativa en el tratamiento de las enfermedades producidas por *H. pylori* y se ha reportado el extracto metanólico de la corteza (CpMet) que presenta diferentes actividades farmacológicas. No obstante, existen pocos reportes en la literatura acerca de su contenido fitoquímico y de las posibles moléculas responsables de las actividades biológicas descritas.

El objetivo de este estudio se centró en el aislamiento de antocianinas y taninos condensados, que son moléculas polares con reconocida actividad antibacteriana, a partir de un extracto denominado **Cp**, obtenido mediante el fraccionamiento secuencial (AcOEt, metanol, agua:metanol y agua ácida) del extracto metanólico primario de *Cyrtocarpa procera*. Se utilizaron cromatografías en capa fina, en columna abierta y raspado en placa de vidrio para obtener dos fracciones: una fenólica (FF, 33.5 mg) y una más pura (SNB, 17.2 mg). Aunque el análisis de Resonancia Magnética Nuclear (^{1}H y DEPTQ) de SNB no permitió su completa elucidación estructural debido a impurezas, se sugirió la presencia de glicósidos aromáticos sustituidos, posiblemente flavonoides, salicinas o arbutinas.

La evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) demostró que CP y la FF presentaron una actividad anti-*H. pylori* comparable a la del control positivo metronidazol (CMI = 250 µg/mL), uno de los antibióticos utilizados en la terapia de erradicación. Estos hallazgos, aunque preliminares, sugieren que *C. procera* podría representar una fuente de compuestos con potencial terapéutico contra *H. pylori*, sin embargo, se requiere de más investigación para confirmar su eficacia y desarrollar su aplicación clínica.

ABSTRACT

Helicobacter pylori, a Gram-negative bacterium colonizing the gastric mucosa, is the causative agent of various gastric pathologies, including gastritis, peptic ulcers, MALT lymphoma, and gastric cancer. Infection with this bacterium has a high global prevalence (~50%). Treatments exist to eradicate the bacterium; however, the high resistance to employed antibiotics reduces the efficacy of these therapies. Faced with this problem, the potential of *Cyrtocarpa procera*, a plant endemic to Mexico, has been explored as an alternative in the treatment of diseases caused by *H. pylori*. The methanolic extract of the bark (CpMet) has been reported to possess gastroprotective, anti-inflammatory, and antibacterial activities. Nevertheless, there are few reports in the literature regarding its phytochemical content and the possible molecules responsible for the described biological activities.

The objective of this study focused on the isolation of anthocyanins and condensed tannins, which are polar molecules with recognized antibacterial activity, from an extract designated **Cp**, obtained through sequential fractionation (AcOEt, methanol, water:methanol, and acidic water) of the primary methanolic extract of *Cyrtocarpa procera*. Thin-layer chromatography, open column chromatography, and preparative thin layer chromatography (scraping off the glass plate) were used to obtain two fractions: a phenolic fraction (FF, 33.5 mg) and a purer fraction (SNB, 17.2 mg). Although Nuclear Magnetic Resonance (^{1}H and DEPTQ) analysis of SNB did not allow for complete structural elucidation due to impurities, it suggested the presence of substituted aromatic glycosides, possibly flavonoids, salicins, or arbutins.

Evaluation of the minimum inhibitory concentration (MIC) demonstrated that CP and FF exhibited anti-*H. pylori* activity comparable to that of the positive control metronidazole (MIC = 250 µg/mL), one of the antibiotics used in eradication therapy. These findings, although preliminary, suggest that *C. procera* may represent a source of compounds with therapeutic potential against *H. pylori*; however, further research is required to confirm its efficacy and develop its clinical application.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 *Helicobacter pylori*

El descubrimiento en 1982 por los médicos australianos Barry Marshall y Robin Warren de bacterias capaces de colonizar, inflamar y lesionar la mucosa gástrica generó una considerable controversia en la medicina, en la bacteriología y, especialmente, en la gastroenterología. Estos investigadores lograron identificar y cultivar una bacteria con una notable capacidad de supervivencia en condiciones de muy baja oxigenación y capaz de tolerar un pH de 2 o menos (Marshall-Warren, 1984). Esta bacteria se adhiere fuertemente a la mucosa gástrica, convirtiéndose en un importante factor etiológico en el desarrollo de diversas patologías, incluyendo gastritis, úlceras pépticas, linfoma MALT, e incluso incrementando el riesgo de cáncer gástrico.

La bacteria responsable de estos cuadros clínicos fue clasificada en 1989 como *Helicobacter pylori* (Goodwin *et al*., 1989). Su adaptación al medio ácido del estómago se presenta por varios factores. En primer lugar, su morfología (bacilo espirilado Gram-negativo, 3-5 µm x 0.5 µm) y en su alta movilidad, proporcionada por 2 a 6 flagelos monopolares (Kusters *et al*., 2006). La presencia de flagelos, resguardados por una envoltura lipídica, facilita la penetración de la capa de moco y la adhesión selectiva a las células del antro gástrico (Amieva, 2008).

Para que sea capaz de crecer y sobrevivir en condiciones *in vitro* e *in vivo* la bacteria necesita una atmosfera microaerofílica con un porcentaje de O_2 entre 2 y 5 %, CO_2 en un porcentaje de entre 5 y 10 %, a una temperatura de 37 °C y una alta humedad.

Aunado a estas especificaciones también es necesario que se cultive la bacteria *in vitro* a un pH neutro, rico en nutrientes como la glucosa, extracto de levadura, triptona y peptona, además de suplementar el medio con sangre o suero fetal bovino.

Es importante mencionar que, al ser una bacteria de lento crecimiento, ésta puede tardar entre 3 y hasta 12 días en desarrollar colonias, las cuales en medio sólido son pequeñas y translúcidas (Kusters *et al.* 2006).

1.2 Vías de transmisión

La transmisión de *H. pylori* es un tema que no se conoce con mucha exactitud, siendo que las vías más mencionadas en la bibliografía las: gastro-oral, oral-oral y fecal-oral (Goodman-Correa, 2000; OMG, 2021).

Según la Organización Mundial de Gastroenterología (OMG) la primera infección podrían presentarse en los primeros años de vida del ser humano por la convivencia tan estrecha que existe entre los infantes y sus padres. Tomando en cuenta este factor podría decirse que quizá las madres son la principal fuente de transmisión de *H. pylori,* quedando así la infección minoritaria de los casos en la etapa adulta (OMG, 2021).

Debido a la falta de certeza de su transmisión cierto número de estudios han propuesto que la adquisición de *H. pylori* también podría producirse a través de una fuente ambiental común. En particular, los animales y el agua han sido contemplados como posibles fuentes de infección (Mitchell, 2001).

1.3 Epidemiología

La infección por *H. pylori*, con una prevalencia global de alrededor del 50%, representa un significativo problema de salud pública a nivel mundial (WGO, 2021). La prevalencia de esta infección varía significativamente según la región geográfica, la etnia, la raza, la edad y las condiciones socioeconómicas. Inclusive su prevalencia puede variar dentro de una misma ciudad y entre pequeños grupos de una misma población (Goh, 2018).

Malaty y Graham en 1994 demostraron que la alta prevalencia de *H. pylori* en hispanos y afroamericanos se relaciona directamente con un bajo nivel socioeconómico durante la infancia, especialmente en etapas tempranas de la vida**.**

Estos factores socioeconómicos muchas veces reflejan los niveles de higiene, densidad de individuos e inclusive el nivel educativo. Por este motivo la prevalencia de la infección es generalmente mayor en los países en desarrollo y tiene presencia en algunos de los subgrupos con más necesidad de estas poblaciones (Hooi *et al.,* 2017). Por este motivo puede haber grandes variaciones en la prevalencia entre las poblaciones urbanas más ricas y las rurales con menos recursos.

En México, la infección se presenta desde la niñez con un 50% de seropositividad, la cual aumenta hasta llegar a una media nacional del 70% de seroprevalencia de *H. pylori* en la población. Además, la tasa de mortalidad de cáncer gástrico reportado presenta un importante aumento de 4.5% a 6.5% en un lapso de 10 años (Torres *et al*., 2005; Alvarado-Esquivel, 2013), siendo de gran importancia y preocupación para el sector salud.

1.4 Patogenia de la infección por *H. pylori*

Ingresando por la boca, *H. pylori* viaja a través del tracto digestivo hasta el estómago, donde sus flagelos le permiten desplazarse a través del moco protector hasta alcanzar la mucosa gástrica (Bai *et al*., 2009). Tiene la capacidad de sobrevivir a pH menores a 4. La acidez gástrica actúa como una barrera defensiva, controlando la proliferación de microorganismos patógenos que se introducen en el organismo a través de la alimentación. *H. pylori* cuenta con factores de patogenicidad que le permiten protegerse del medio ácido del estómago produciendo sustancias que la rodean de una capa con pH neutro. Esta capacidad le permite atravesar la barrera del moco que protege el estómago del ácido, y mediante sus flagelos, alcanzar un sitio de adhesión con menor acidez debajo de la mucosa, donde la acidez es menor (Yamaoka *et al*., 2012). La producción de amonio

por la ureasa bacteriana es la responsable de neutralizar el ácido en su entorno, favoreciendo la colonización y, simultáneamente, dañando el epitelio.

Por esto es que nace el desafío en las investigaciones de *H. pylori* para identificar factores de riesgo que puedan influir en la infección. Se han propuesto los genes de *cagA*, *vacA* y *babA*, entre otros, que están ligados a un alto riesgo de enfermedad ulcerosa péptica, adenocarcinoma gástrico o linfoma tipo MALT (Atherton, 2006).

1.4.1 Colonización gástrica: factores contribuyentes

Los factores de virulencia que contribuyen para la colonización por *H. pylori* en el epitelio son:

- **UREASA**

Aporta un pH neutro alrededor de la batería hidrolizando la urea (CO $[NH_2]_2$) en amonio ($\mathrm{NH_4}^+$) y gas carbónico (CO_2). El amonio producido eleva el pH a 6 o 7 alcalinizando la región y permitiéndole llegar a la superficie de las células de la mucosa donde el pH es prácticamente neutro. El $NH_4{}^+$ también daña la microcirculación y a las células epiteliales superficiales dando como resultado necrosis del tejido lo que ayuda al desarrollo de gastritis atrófica crónica y carcinogénesis (Hatakeyama, 2009).

- **FLAGELOS**

Para que *H. pylori* colonice la mucosa gástrica, necesita penetrar la capa de moco, alcanzar la superficie epitelial para adherirse a ella y escapar del ácido gástrico, todo esto lo logra gracias su gran actividad de movimiento, que le es dado por sus 2 a 6 flagelos situados en un solo polo (Yokota *et al*., 2007).

- **ADHESINAS**

La adhesión a la mucosa gástrica resulta fundamental tanto para el establecimiento inicial como para la supervivencia a largo plazo de la bacteria en el estómago. Esta unión permite a la bacteria superar las defensas naturales del estómago, incluyendo la acción propulsora del peristaltismo, la expulsión del contenido gástrico mediante el vaciado y el reemplazo continuo de las células epiteliales.

La adherencia está mediada por proteínas de membrana externa entre las que se encuentran las siguientes (Magalhães-Reis 2010):

- **HpaA**: Proteína localizada en su membrana externa. Interviene como mediadora de la unión entre glicoconjugados y ácido siálido (N-acetil-neuraminil-lactosa) presentes en la superficie de las células epiteliales gástricas y neutrófilos (Nyström-Svennerholm, 2007).
- **BabA**: Es una adhesina que interactúa con las células epiteliales a través del antígeno del grupo sanguíneo ABO y al antígeno Lewis B (Leb^b) ubicado en la mucosa gástrica. Esta acción le permite a la bacteria adaptarse y persistir, lo que ocasiona una respuesta inflamatoria severa dando como resultado un mayor riesgo de desarrollar úlcera duodenal y adenocarcinoma (Ishijama *et al*., 2011; Yamaoka *et al*., 2006).
- **SabA**: Esta proteína se une a los receptores del ácido siálico de las células epiteliales del estómago a través de carbohidratos sializados, los cuales estimula para que produzcan especies reactivas de oxígeno, que a su vez produce daño oxidativo en el epitelio gástrico, dando lugar a la importancia que tiene SabA como factor de virulencia. SabA está asociada con el desarrollo de metaplasia intestinal, atrofia y cáncer gástricos (Yamaoka, 2008).
- **OipA**: Es una proteína de membrana externa con actividad inflamatoria, está presente en todas las cepas de *H. pylori*, cuya función es la adhesión. Produce en exceso *IL-8* y otras citoquinas proinflamatorias. Su expresión está relacionada con inflamación gástrica, úlcera duodenal y gastritis (Yamaoka, 2000).

1.4.2 Daño gástrico: factores contribuyentes

Debido a su potente actividad citotóxica y capacidad carcinogénica, se tratarás los siguientes factores de virulencia a nivel global:

-**Citotoxina Vac A**: es una proteína que se encuentra en todas las cepas de *H. pylori*, induce la vacuolización y promueve la muerte celular programada (Basso *et al*., 2008). La toxina VacA desempeña un papel crucial en el crecimiento bacteriano al posibilitar la formación de canales iónicos. Estos canales promueven el transporte de moléculas complejas fuera de la célula huésped (Jones et al., 2010). El gen *VacA* es altamente polimórfico, mostrando variabilidad región 5´-terminal. (Rhead *et al*., 2007).

-**Isla de patogenicidad *CagPAI***: es un segmento de 40 kb con un 35% de G+C. Los genes *CagPAI* son sensibles a factores microambientales que incluyen los niveles de oxígeno, crecimiento bacteriano, pH y la presencia de ácidos grasos volátiles de cadena corta. *CagPAI* codifica a un sistema de secreción tipo IV (SSIV) y a la citotoxina *CagA* (Kumar *et al*., 2011).

-**Citotoxina CagA**: es considerado el principal factor de virulencia de *H. pylori* (Backert *et al*., 2000). Se distinguen dos tipos de cepas: las que expresan la toxina CagA (positivas) y las que no la expresan (negativas), siendo las CagA positivas más virulentas. La producción de CagA se potencializa cuando el pH es ácido. Está induce a la producción de citocinas inflamatorias y su efecto sobre las células gástricas es la reducción en la producción de ácido. (Tohidpour, 2016).

1.5 Patologías relacionas con *Helicobacter pylori*

Numerosas investigaciones afirman que *H. pylori* es la principal causa para desarrollar gastritis (Torres *et al*., 2016; Khean *et al*., 2015; Malfertheiner-Megraud, 2012), la cual es una condición patogénica para generar úlceras, linfomas tipo MALT y adenocarcinoma gástrico (ACG) (Cervantes, 2016). El ACG está relacionado con más de un millón de muertes a nivel mundial y con el 90% de tumores asociados a la infección por la bacteria (Organización Panamericana de la Salud, 2021).

El sitio de colonización y los diferentes grados de inflamación ocasionados por la bacteria son determinantes para clasificar las complicaciones gastroduodenales (Sonnenberg-Lash, 2010). La gastritis se caracteriza por la irritación e inflamación de las paredes internas del estómago, específicamente en las capas mucosa y submucosa. Este cuadro clínico suele estar asociado con la infección por *H. pylori* o la administración de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), exceso en el consumo de bebidas alcohólicas, estrés, etc Cuando se presenta gastritis aguda la inflamación de la mucosa no genera cambios morfológicos permanentes y ésta pasará a ser crónica si no es atendida (Pizzi *et al*., 2014).

Un proceso inflamatorio que afecta el recubrimiento del estómago de forma gradual y constante a lo largo de un período prolongado se define como gastritis crónica. Esta patología se diferencia de la gastritis aguda por la presencia de linfocitos y células plasmáticas en la mucosa, lo que ocasiona la producción de citocinas. La gastritis crónica, en algunos casos, se vincula con el desarrollo de atrofia en la mucosa gástrica y metaplasia intestinal. Estos cambios tisulares pueden ser consecuencia de una infección crónica por *H. pylori*, el abuso del alcohol y otros factores etiológicos (Kumar *et al*., 2005).

En caso de que la infección persevere el deterioro será mayor originando una gastritis crónica atrófica (Dixon, 2001). Cuando se llega a este nivel de daño la mucosa se adelgaza, se producen menos glándulas, se infiltran neutrófilos y linfocitos a lo largo de la lámina propia desencadenando la alteración de la estructura, pérdida del tejido glandular, ausencia de producción de moco, de

enzimas y de la hormona gastrina, necesarias para mantener el buen funcionamiento de la mucosa (Dixon, 2001).

Cuando la inflamación predomina en el antro gástrico sin atrofia se relaciona con una hipersecreción ácida, lo que desarrolla úlceras gastroduodenales. Una úlcera es básicamente una ruptura en la piel inflamada o la membrana de la mucosa que recubre el tracto alimentario. Ocurre cuando hay una alteración del equilibrio normal en la morfología de la mucosa gastroduodenal causada por una mayor agresión o una disminución de su resistencia, dando como resultado una lesión gástrica o duodenal, la cual se extiende de la *muscularis mucosae* hasta la submucosa o a zonas más profundas en las capas del estómago, en donde el epitelio de la mucosa queda vulnerable a agentes dañinos internos como el ácido gástrico o pepsina, y externos como es el caso de consumo prolongado de AINES o infección por *H. pylori* (Andrade *et al.,* 2007). Cuando la úlcera se encuentra en la curvatura menor del estómago se denomina gástrica y cuando se localiza en duodeno, se clasifica como úlcera duodenal (Kumar *et al.* 2005).

Cuando la inflamación se acompaña de atrofia en el cuerpo y antro del estómago se asocia a una hiposecreción, que predispone a un mayor riesgo para desarrollar lesiones premalignas y ACG (Malfertheiner *et al*., 2011).

1.6 Tratamiento para la erradicación de *H. pylori*

Ya se ha mencionado que *H. pylori* produce enfermedades gástricas con una alta prevalencia, por lo que para erradicarla existe una de esquemas terapéuticos que disminuyen significativamente la incidencia y mortalidad de cáncer gástrico (Ford *et al*., 2020), así como de la prevalencia de úlceras pépticas y dispepsias (Chiang *et al*., 2020).

No es fácil eliminar la infección por *H. pylori* debido a que no existen recomendaciones generales respecto al esquema que se debe usar. El consenso de Maastricht (Malfertheiner *et al.,* 2017) recomienda la combinación de inhibidores

de la bomba de protones (IBP) y al menos dos antibióticos (claritromicina, amoxicilina, metronidazol, tinidazol, levofloxacina) los cuales se deben elegir tomando en cuenta la tasa de resistencia antimicrobiana, con o sin sales de bismuto. Asimismo, se aconseja utilizar esquemas que logren una tasa de erradicación ≥90% y el uso de claritromicina en lugares donde la tasa de resistencia no rebase el 15%.

En nuestro país por muchos años se ha utilizado el tratamiento triple estándar como primera línea de elección, que contiene amoxicilina, claritromicina y un inhibidor de la bomba de protones (IBP), pero debido a que existe una alta prevalencia de resistencia a la claritromicina (28%) la eficiencia de esta terapia ha disminuido (Ladrón de Guevara *et al*., 2018).

Una opción más es la combinación de amoxicilina, metronidazol más un IBP. Sin embargo, debido a que existe también una resistencia a metronidazol se reportan fallas hasta de un 20%. Ambas terapias se administran generalmente por un lapso de 7 a 14 días.

Como segunda línea de tratamiento está la terapia cuádruple que combina un IBP, antibióticos como la tetraciclina y el metronidazol, además, como cuarto componente se adicionan sales de bismuto. Este tratamiento puede durar hasta 21 días (Wannmacher, 2011).

Existe otra terapia tras un segundo curso de tratamiento en la que se sustituye a la claritromicina por levofloxacina, combinada con IBP y amoxicilina, que forman un esquema triple que es reportada como alternativa efectiva y ha sido considerada como una opción de terapia de rescate después de presentar tasas de erradicación del 80% al 90% (Greenberg *et al*., 2011).

1.6.1 Problemática actual de las terapias anti-*H. pylori*.

La terapia de erradicación de *H. pylori* requiere la administración de al menos dos antibióticos varias veces al día durante periodos largos de tiempo, los efectos secundarios y costos elevados de la medicación provocan el abandono del

tratamiento por parte del paciente, esto desemboca en una resistencia a la restringida cantidad de antibióticos contra la bacteria.

Esta resistencia es una problemática a la cual se enfrentan los sistemas de salud del mundo. La resistencia que se genera hacia los antibióticos da como resultado la persistencia de la infección y en casos más severos el desarrollo de úlceras pépticas y cáncer gástrico (Palacios *et al*., 2011).

Debido a la incompleta erradicación de *H. pylori* por las terapias convencionales se abre la necesidad para la búsqueda de alternativas terapéuticas en el tratamiento de la infección.

1.7 Las plantas, una base del sistema de la Medicina Tradicional

La Medicina Tradicional es la recopilación de información que se ha ido generando a través del tiempo y transmitiendo de generación en generación en comunidades de diferentes etnias, las cuales ocupan este sistema de salud tradicional a la par del sistema convencional. Esta tradición aumenta la demanda del uso de plantas medicinales como una alternativa para ayudar a la mejora de terapias convencionales (OMS, 2008).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1979) una planta medicinal es cualquier especie vegetal que contiene sustancias capaces de proporcionar efectos terapéuticos o cuyos principios activos constituyen una base para el desarrollo de nuevos fármacos. También ha estimado que más del 80% de la población mundial recurre constantemente a la medicina tradicional con el fin de dar alivio a un amplio espectro de enfermedades, dentro de este tipo de medicina está incluido el empleo de extractos de plantas o de sus principios activos (OMS, 2013).

Los productos naturales están compuestos de sustancias activas (Newman-Cragg, 2012), que son de gran importancia para el tratamiento de diferentes padecimientos. El análisis químico ha revelado la presencia de una serie de estructuras orgánicas, incluyendo compuestos fenólicos y sus variantes (quinonas, flavonas, flavonoides, flavonoles, taninos y cumarinas), así como terpenoides, aceites esenciales,

alcaloides, pectinas y polipéptidos (Thuille, 2003). Estos grupos se han utilizado como materia prima de medicamentos semisintéticos tomando en cuenta su contenido fitoquímico y su poco o nulo efecto tóxico (Beg, 2000).

Una alternativa a los fármacos convencionales son pues los productos naturales. El 25% de los fármacos convencionales que ya existen contienen moléculas activas, las cuales han sido sintetizadas a partir de investigaciones fitoquímicas de plantas medicinales tradicionales (Newman-Cragg, 2007). Debido a esto la industria farmacéutica ha renovado sus estrategias en favor del desarrollo y descubrimiento de fármacos de origen natural.

El uso de hierbas, comercializadas como suplementos dietéticos o parte de la medicina natural y tradicional, es una práctica extendida a nivel global. Más de 1500 especies se emplean tanto en países de bajos recursos, como África y Asia (donde pueden ser la principal o única forma de tratamiento), como en países desarrollados, donde sirven como alternativas para abordar diversas enfermedades (Patwardhan, 2005).

1.7.1 Plantas medicinales empleadas en el tratamiento de úlceras, gastritis y terapias anti-*H. pylori*

A partir de que fue descubierta la estrecha relación que existe entre *H. pylori* con enfermedades gástricas, la investigación en esta área dio un giro completo, ya que ahora los investigadores no solo buscan alternativas con actividades gastroprotectoras, sino también con actividad contra la bacteria. Esto ha conducido a encontrar sustancias con actividad inhibitoria sobre el crecimiento de la bacteria (Castillo y Romero, 2007), entre las que se encuentran los extractos de plantas medicinales con agentes fitoterapéuticos (Ohsugi *et al*., 1997).

En los últimos años se han publicado una serie de trabajos que demuestran la efectividad de algunas especies en el tratamiento de patologías gástricas y úlceras pépticas, como, por ejemplo: el cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) (Navarrete *et al*., 2005); el axihuitl (*Euphatorium aschembornianum*) (Flores *et al.,*

2019); la sábila (*Aloe vera*) (Park *et al.,* 2017); y la cancerina (*Hippocratea celastroides)* (García *et al*., 2016), entre muchas otras.

En México se han sometido a evaluación e identificación una variedad de especies de plantas medicinales que puedan cubrir la necesidad que existe para prevenir y combatir trastornos gastrointestinales ocasionados por la infección de *H. pylori* (Castillo *et al.* 2009), una de estas especies es *Cyrtocarpa procera.*

1.8 Taxonomia de *Cyrtocarpa procera* Kunth (Kew, 2024)

Reino: Plantae

Filo: Estreptofita

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnoliidae

Orden: Sapindales

Familia: Anacardiaceae

Género: *Cyrtocarpa*

Especie: *Cyrtocarpa procera* Kunth

(Kew, 2024)

1.8.1 Generalidades de *Cyrtocarpa procera* Kunth

Cyrtocarpa procera Kunth (Anacardiaceae), comúnmente conocida como “chupandilla” (Morelos); “ciruelillo” (Puebla); “copalcojote”, “baricoca” (Guerrero); “machocote” o “palo de chupandia” (Oaxaca), “coco de cerro” (Alto Balsas), “chucum-pum” (Estado de México), “chucumpuz” (Michoacán), “copalcocote”, “copal”, “copali” (Jalisco) y “chocote” (Nayarit), es una especie endémica de México,

que se distribuye principalmente en zonas con clima semicálido, semiseco y templado. Crece en bosque tropical caducifolio o subcaducifolio entre los 1,200 y 1,500 metros sobre el nivel del mar (Argueta *et al*., 1994). Se distribuye en varios estados de la República Mexicana como es el Estado de México, Puebla, Oaxaca, Guerrero, Colima, Michoacán, Morelos, Jalisco y Nayarit (Figura 1).

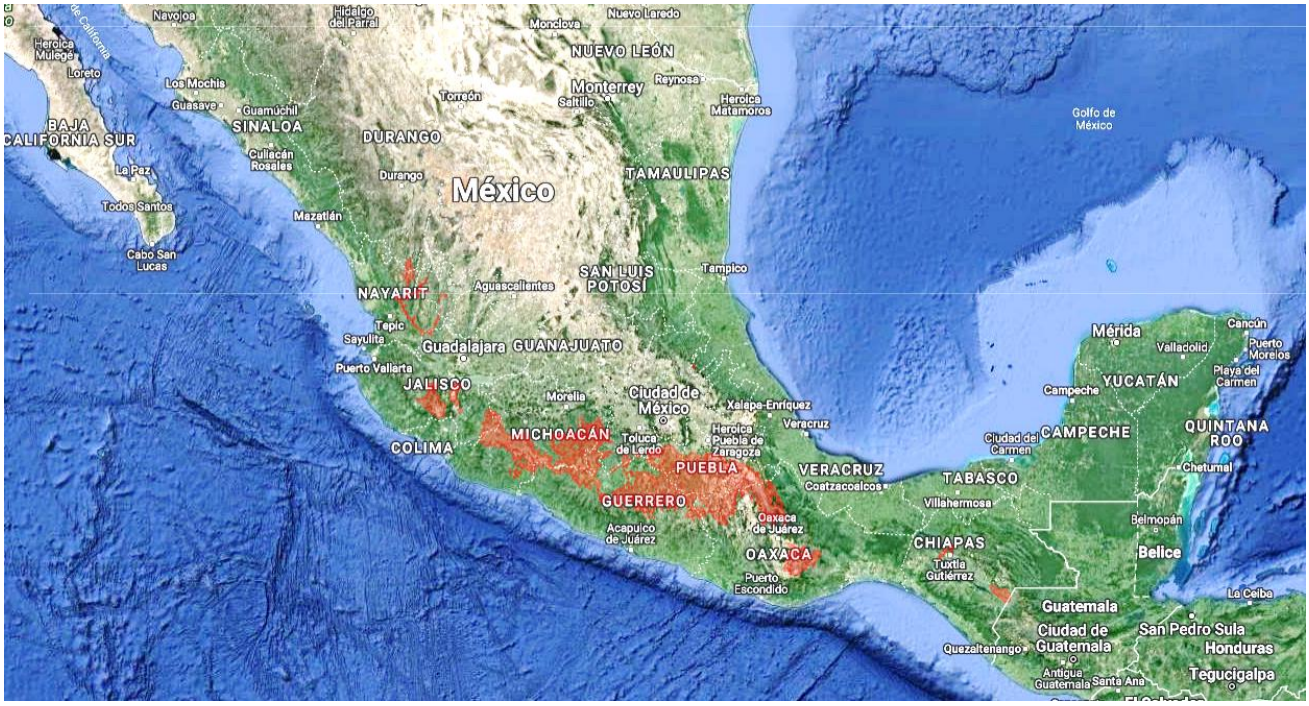


Figura 1. Mapa de la distribución geográfica de *Cyrtocarpa procera* en la República Mexicana. Las manchas rojas indican los estados donde se encuentra distribuida. Imagen CONABIO (https://enciclovida.mx/especies/171291-cyrtocarpa-procera).

C. procera es un árbol de 6 m de altura o más con corteza gris (Figura 2A), algo rugosa; sus últimas ramas presentan hojas semejantes a plumas de 4 a 7.6 cm con un soporte que las une a tallos alados (Figura 2B); flores blancas agrupadas en racimos de 3 mm de longitud; fruto velludo de 2 cm de largo, color amarillo cuando madura; la semilla con una o dos celdas florece entre marzo y mayo (Argueta, 1994) (Fonseca, 2008).



Figura 2. Imágenes del árbol (A), hojas, fruto (B) y corteza (C) de Cyrtocarpa procera. Tomadas de la página digital de CONABIO (https://enciclovida.mx/especies/171291-cyrtocarpa-procera).

1.9 Uso medicinal de *Cytocarpa procera* Kunt

La corteza de *C. procera* (Figura 2C) es muy usada por habitantes de diferentes zonas geográficas de México para calmar varios tipos de dolores. Como el dolor de muela y tos. Otra forma de empleo es remojar cascaritas en agua y tomar como agua de tiempo esta preparación se usa para trastornos digestivos y disentería (Maldonado, 1997) o para diabetes (García, 1992). Además, es utilizada para lavar heridas y llagas debido a que se logra una cicatrización más rápida cuando se aplica la infusión.

Si se hace una decocción de la corteza y se toma como agua de uso es empleada para el tratamiento de trastornos gastrointestinales, como la gastritis y la úlcera péptica (Argueta *et al.,* 1994; Canales *et al.*, 2005).

Como *C. procera* (coco de cerro) es muy parecida a *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate), es muy cotidiano que las personas que las recolectan ocupen chupandilla con corteza de cuachalalate (Hersch-Martínez, 1995). Esta sustitución se realiza, a menudo, para el tratamiento de afecciones como gastritis, úlcera péptica y cáncer gástrico (Argueta et al., 1994)

1.10 Antecedentes fitoquímicos de *Cyrtocarpa procera*.

La investigación fitoquímica de la corteza de *C. procera* es aún muy escasa. En la Tabla 1 se pueden observar los metabolitos secundarios que se han aislado e identificado de algunos extractos de la corteza.

Tabla 1. Compuestos identificados de extractos obtenidos de la corteza de *Cyrtocarpa procera.*

EXTRACTO DE CORTEZA	COMPUESTOS	REFERENCIA
Hexánico y Diclorometano	Esteroles (β-amirina y β-sitosterol) Ácidos grasos (1,3-propildipentadecanoato, 3-hidroxipropil 9-octadecenoato, pentadecilbenceno, eicosilbenceno, docosano, heptacosano, dotiacontano y 2,6,10-trimetiltetradecano	(Rodríguez *et al.,* 2006)
Hexánico	β-amirina y β-sitosterol	(Rosas *et al.,*2011)
Metanólico	Ácido gálico, catecol, catequina y algunos fenilpropanoides	(Orozco, 2010)
Metanólico	Catequina	(Martínez *et al.,* 2018)
Metanólico	Flavonoides (crisina, naringenina, kaempferol, catequina y quercetina)	(Rodríguez *et al*., 2020)

Estos metabolitos fueron identificados por diferentes técnicas, como la Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS) (Rodríguez *et al*., 2006; Rosas *et al*., 2011). Por su parte el ácido gálico, catecol, catequina y fenilpropanoides fueron determinados por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) (Orozco, 2010; Martínez *et al*., 2018) y los flavonoides se identificaron por la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Presión acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS) (Rodríguez *et al.,* 2020).

1.10.1 Antecedentes de las actividades biológicas de *Cyrtocarpa procera*

Existen diferentes trabajos que reportan la actividad antibacteriana de extractos de la corteza *C. procera* contra bacterias Gram positivas y negativas, con valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) que varían de 7.8 µg/mL a 1.5 mg/mL (Tabla 2).

Tabla 2. Actividad antibacteriana de diferentes extractos de *Cyrtocarpa procera.*

BACTERIA	CMI o CMB	EXTRACTO	REFERENCIA
Vibrio cholerae	1.5 mg/mL	Metanólico	Canales *et al*., 2005
Shigella boydii	0.125 mg/mL		
Staphylococcus aureus	1.5 mg/mL		
Staphylococcus epidermidis	1.0 mg/mL		
Bacillus subtilis	1.5 mg/mL		
Staphylococcus aureus y Bacillus subtilis	No mostraron actividad antimicrobiana	Hexánico, Cloroformo:Metanol (1:1) Y Metanólico	Rodríguez *et al*., 2006
Sarcina lutea	0.125 mg/mL	Metanólico	Orozco 2010
Staphylococcus aureus	0.50 mg/mL		
Staphylococcus epidermidis	0.75 mg/mL		
Yersinia enterocolitica	0.75 mg/mL y CMB= 0.10 mg/mL		
Vibrio cholerae Tor	0.50 mg/mL CMB= 0.75 mg/mL)		
Staphylococcus aureus	0.25 mg/mL		
Vibrio cholerae	1 mg/mL	Metanólico	Martínez *et al.* 2018
Helicobacter pylori	250 µg/mL CMI ≥ 500 µg/mL	Acuoso (Dilución en Agar) Metanólico	Castillo *et al.* 2009
Helicobacter pylori	7.8 µg/mL 15.6 µg/mL 62.5µg/mL 62.5µg/mL 125 µg/mL	Hexánico Diclorometano Diclorometano-Metanol Metanol Acuoso	Escobedo *et al*. 2012

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria CMB: Concentración Mínima Bactericida

También se ha determinado la actividad del extracto metanólico de la corteza de *C. procera* contra el hongo patógeno *Trichophyton mentagrophytes*, presentando una concentración fúngicida media (CF_{50}) de 471.30 µg/mL (Orozco, 2010).

Dentro de las actividades farmacológicas de la corteza se ha reportado en más de una ocasión los efectos gastroprotectores de sus extractos metanólicos, así como su actividad en la resolución de la úlcera gástrica Tabla 3.

Tabla 3. Actividad gastroprotectora y resolutora de úlceras del extracto metanólico de *Cyrtocarpa procera.*

EFECTO	**MODELO**	**EXTRACTO**	DE_{50}	**ACTIVIDAD**	**REFERENCIA**
Gastroprotector	Lesión gástrica inducido por etanol en ratas	Metanólico	45.54 mg/kg 36.68 mg/kg	Actividad anti-ulcerogénica	Rosas *et al.* 2011
Gastroprotector	Ulceración gástrica inducida por etanol en ratón	Metanólico	0.53 mg/kg	Actividad anti-ulcerogénica	Escobedo *et al.* 2012
Gastoprotector y Resolución de úlcera	Úlceras gástricas inducidas por etanol en ratón	Metanólico (Administración de 300 mg/kg del extracto dos veces al día por vía oral durante 20 días consecutivos, redujo del área de la úlcera en un 62.65%)	No se reportó	Actividad y Resolución de úlcera gástrica	Escobedo *et al*. 2018

De igual manera también se han realizado estudios para determinar la actividad antiinflamatoria y antioxidante, utilizando diferentes modelos en ratón y ensayos con DPPH en el caso de los antioxidantes (Tabla 4).

Tabla 4. Otras actividades de extractos de *C. procera.*

MODELO	EXTRACTO	INHIBICIÓN	REFERENCIA
Inducción de edema de ratón	Hexánico	Inhibición máxima del 57.45% con 3 mg/oreja	Escobedo *et al.*, 2012
Colitis inducida químicamente en ratón	Metanólico	Efecto preventivo contra la producción de citocinas inflamatorias	Rodríguez-Canales *et al.* 2020
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE			
Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH)	Metanólico	CA_{50} de 4.78 µg/mL	Orozco 2010
Ensayo DPPH	Metanólico	CA_{50} de 34.44 µg/mL	Rodríguez-Canales *et al.* 2020

1.10.2 Antecedentes directos. Estudio preliminar del perfil químico de *Cyrtocarpa procera*

Han sido escasos los estudios dirigidos para la identificación de moléculas de *C. procera*. El presente trabajo se desprende de una investigación realizada (Ramos, 2021) en colaboración de la Facultad de Medicina de la UNAM y el Laboratorio de Investigación de Plantas Medicinales del Centro de Investigación en Biotecnología de la UAEM; en la cual se identificaron cuatro catequinas a partir de un extracto acetato de etilo (AcOEt) de la corteza de *C. procera.* En su separación, purificación y caracterización estructural se ocuparon técnicas como cromatografía en capa fina, columna abierta de en sílice gel, Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) y resonancia magnética nuclear (RMN) de protones y carbono. Así, se logró la caracterización de (+)-catequina, isómeros de epicatequina (+)-epicatequina y (−)-epicatequina y (−)-epicatequina galato.

Previamente a este estudio ya se había identificado la presencia del compuesto catequina en el extracto metanólico de la corteza de *C. procera* (Orozco, 2010; Martínez *et al.,* 2018; Rodríguez *et al*., 2020). Sin embargo, en el trabajo de Ramos (2021) se reportó por primera vez la identificación del isómero (+)-catequina, el cual anteriormente solo se descubrió como catequina y de tres nuevos compuestos en la corteza de *C. procera*, (+)-epicatequina, (-)-epicatequina y (−)- epicatequina galato, lo que contribuyó a la información fitoquímica para esta especie; además, se realizó la cuantificación de las cuatro catequinas aisladas.

Para observar moléculas polares (flavonoides) en la corteza de la chupandilla se usaron técnicas de caracterización estructural como lo es la espectrometría de masas y ultra cromatografía de líquidos (Ramos, 2021) (Tabla 5). De manera general los flavonoides están relacionados con diversas actividades biológicas y su mecanismo de acción se caracteriza principalmente por su actividad antioxidante. Esto sugiere que los efectos beneficiosos del extracto metanólico de *C. procera*, con relación a las actividades reportadas, podrían deberse a la presencia de dichos flavonoides, específicamente de taninos y antocianinas en la corteza.

COMPUESTOS	TANINO (Hidrolizable/condensado)	Antocianinas	Tiempo de retención	m/z
Ácido protocatéquico	**+**		1.92	154.0629
Catequina	**+**		2.27	290.0782
Petunidina-3-O-glucosido		**+**	4.15	480.0567
Trímero de procianidina	**+**		4.23	882.1634
Ácido gálico	**+**		4.29	170.0216
Petunidina-3-5-O-diglucósido		**+**	13.67	642.4696

1.11 Flavonoides

Los metabolitos secundarios son compuestos de gran importancia, ya que funcionan como mecanismo de defensa contra factores externos (Augustin *et al.,* 2011), de los cuales se han logrado caracterizar alrededor de 10, 000 estructuras quedando miles de estos compuestos por describirse (Cheng *et al*., 2014). Se dividen en cuatro grupos principales: fenólicos, terpenos, glicósidos y alcaloides (Ávalos-Pérez, 2009).

El grupo fenólico ha logrado despertar un interés muy importante en diferentes campos científicos debido a que presentan propiedades antidiarreicas, antitumorales, antibacterianas y antivirales.

Este grupo se divide en tres agrupaciones principales: ácidos fenólicos, polifenoles y flavonoides (Hernández *et al.,* 2019).

Los flavonoides, del prefijo “flavo” del latín *flavus,* significa de color amarillo y rojo (RAE, 2001), haciendo referencia a pigmentos. Estos cuentan con un grupo aromático, de bajo peso molecular, distribuidos entre las plantas, dando lugar a la mayoría de los colores amarillo, rojo y azul (Aherne, 2002).

Poseen una estructura general de $C_6 - C_3 - C_6$ (anillos A, C y B) que están compuestos por dos anillos fenilos (A y B), unidos mediante un anillo pirano (C) (Anderson y Markham, 2006) (Figura 3), y son clasificados de acuerdo con sus variaciones en el grupo pirano (Martínez *et al.,* 2002). Es de mucha importancia el estado de oxidación del anillo pirano y la posición del anillo B.

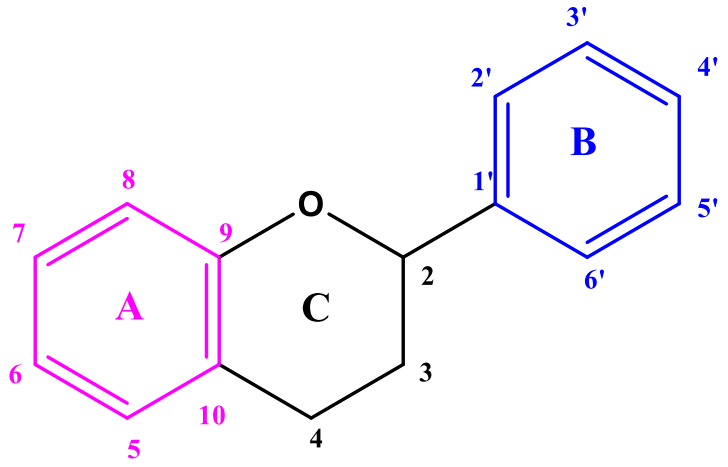


Figura 3. Estructura general de un flavonoide con numeración y especificación de cada anillo (Herrera, 2016).

1.11.1 Clasificación de flavonoides

Se clasifican según las características que tengan en su estructura:

- **Isoflavona.** En casi todos los flavonoides el anillo B se encuentra unido a la posición 2 del grupo pirano; en las isoflavonas el anillo B ocupa la posición 3. Son muy coloreadas y tienen poca presencia en las plantas.
- **Flavonoles:** Esta molécula posee en el anillo C un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo –OH en posición 3'. En el anillo B en la posición 4' cuenta con un grupo R en lugar de un –OH. Son los flavonoides más abundantes en los vegetales presentando pigmentación amarilla en las plantas.
- **Flavanos:** Presentan un grupo –OH en la posición 3 del anillo C. En el anillo B posición 3' y 4' tiene un grupo –OH en cada carbón y en la posición 5' un grupo R.
- **Flavanonoles:** En el anillo C cuenta con la unión de un grupo -OH en la posición 3 y un carbonilo en el carbón 4. Respecto al anillo B en la posición 3' y 4' cuentan con una cadena lateral respectivamente y el –OH en la posición 4.

- **Flavonas:** Se caracteriza por un grupo carbonilo en la posición 4 del anillo C y la falta del grupo –OH en su posición 3’ del anillo B.
- **Antocianidinas:** Presentan un grupo metoxi en la posición 3’ del anillo B y un grupo -OH en los carbonos 4’ y 5’. También poseen un doble enlace entre el carbono 3 y 4 del anillo C cargando positivamente al oxígeno, lo que lo hace más propenso a formar enlace con una molécula con carga negativa (Figura 4). Son grupos característicos por presentar pigmentos muy llamativos en flores y frutas (Limón *et al*., 2010; Cartaya-Reinaldo, 2001).

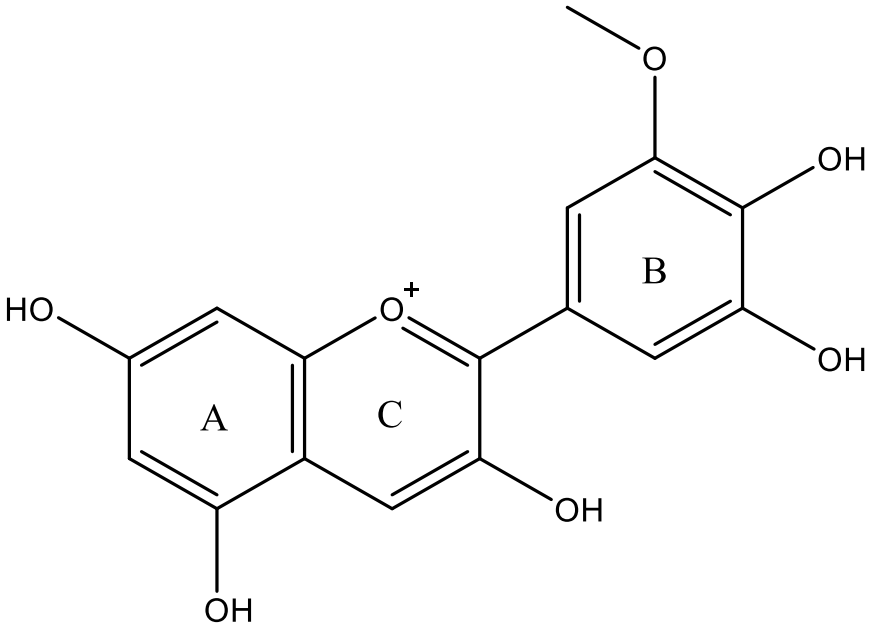


Figura 4. Estructura general de las antocianidinas (Limón, 2010).

1.11.2 Antocianinas, proantocianidinas o taninos condensados

La formación de taninos condensados (Figura 5) implica la polimerización de moléculas flavonoides, predominantemente de monómeros de flaval-3,4-dioles (proantocianidinas) (Samil *et al.,* 2005), de las cuales se liberan las antocianidinas por hidrólisis en medio ácido.

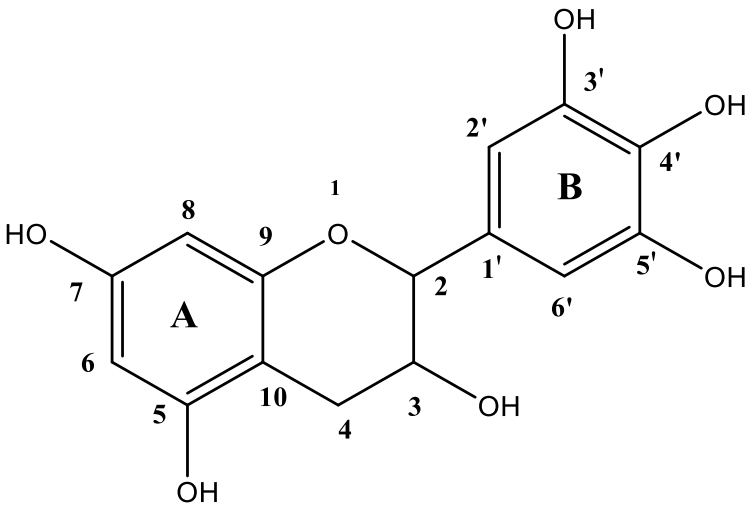


Figura 5. Estructura básica de los taninos condensados (Samil et al., 2005).

Las antocianinas son glicósidos de las antocianidinas, ya que cuenta con la presencia de un azúcar, generalmente en la posición 3 del anillo C y 5 del anillo A, por medio de un enlace β-glucósido a la aglicona (antocianidina) (Badui, 2006). Al unirse la antocianidina con el azúcar le proporciona estabilidad y solubilidad, haciendo la molécula más estable (Leguizamón, 2005) (Figura 6).

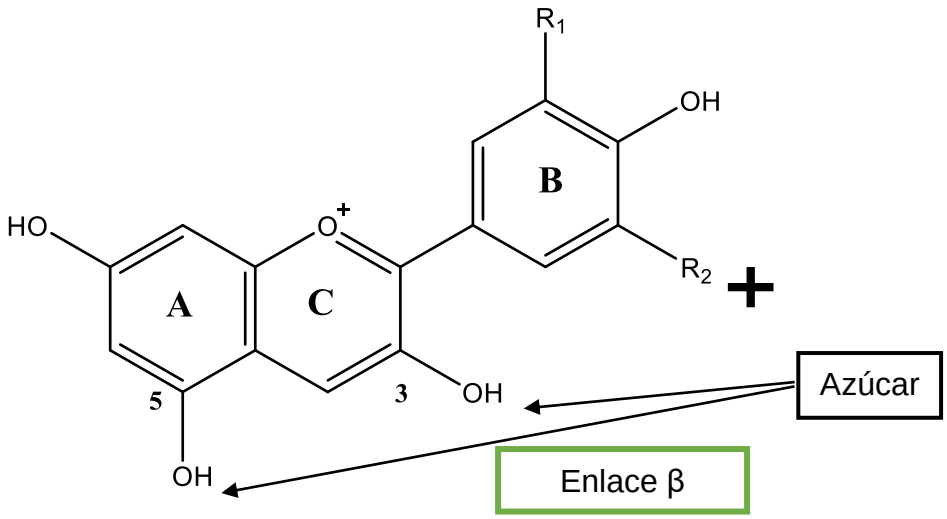


Figura 6. Estructura de una antocianina y sitios de unión de los azúcares (Leguizamón, 2005).

1.11.3 Propiedades de las antocianinas

Se conocen alrededor de 20 antocianidinas que cuando se combinan con diferentes azúcares generan aproximadamente 300 antocianinas. Entre las más importantes tenemos a la cianidina, delfinidina, pelargonidina, peonidina, malvidina y petunidina, las cuales, son responsables de aportar una gama muy amplia de colores a frutos y flores, tales como el rojo, anaranjado, azul y púrpura (Badui, 2006). Cabe resaltar que estas moléculas se han encontrado en cantidades elevadas en cortezas de árboles leñosos (Hon-Shiraishi 2001) y se ha mencionado su participación en funciones biológicas vitales atribuidas a su actividad antioxidante.

Diversos grupos de investigación se han enfocado en estudiar plantas y sus propiedades farmacológicas, analizando de qué manera las antocianinas aportan sus propiedades funcionales y cómo pueden interactuar en las actividades biológicas como agentes antiinflamatorios, antioxidantes, anticancerígenos, antidiabéticos y antimicrobianos (Khoo *et al.,* 2017).

2. JUSTIFICACIÓN

La corteza de *Cyrtocarpa procera* es ampliamente utilizada en la Medicina Tradicional Mexicana como auxiliar en el dolor de muelas, cicatrizante cutáneo y alivio de enfermedades gastrointestinales. Ha demostrado poseer actividad anti-*H. pylori in vitro*, antiinflamatoria, gastro protectora y resolutoras de úlceras gástricas, *in vivo.*

Para comprender mejor estas actividades farmacológicas, es crucial llevar a cabo un estudio fitoquímico profundo de la corteza de *C. procera*, con el fin de elucidar compuestos polares que podrían ser los responsables de dichas actividades y que nos abrirían el panorama de su investigación.

Son pocos los reportes que se tienen, pero recientemente se realizó una investigación enfocada en el análisis del extracto con AcOEt de la corteza, el cual, se mostró la presencia de grupos flavonoides importantes como lo son las catequinas, de las que se identificaron las siguientes moléculas: (+)-catequina, (+)-epicatequina, (−)-epicatequina y (−)-epicatequina galato. Además, en esta misma investigación se mencionó la presencia de moléculas de mayor polaridad derivadas de flavonoides en el extracto metanólico.

El presente trabajo tiene como fin la purificación e identificación de antocianinas, que son metabolitos secundarios de alta polaridad que se encuentran a menudo en cortezas de árboles leñosos en cantidades importantes (Hon-Shiraishi 2001) y de las que se ha sugerido su capacidad de interactuar en el ser humano como agentes antioxidantes, antiinflamatorios, antidiabéticas, anticancerígenas, antimicrobianos, entre otros (Khoo *et al.,* 2017); propiedades que se le ha atribuído a la corteza de *C. procera* en la medicina tradicional de nuestro país (García, 1992). Con el fin de corroborar que las antocianinas son las precursoras de la actividad antimicrobiana se determinará la actividad anti-*H. pylori* de dichos compuestos polares con el fin de aportar datos importantes para futuras investigaciones preclínicas y clínicas de *C. procera.*

3. HIPÓTESIS

Las antocianinas presentes en el extracto metanólico de la corteza de *C. procera* son los principales responsables de su actividad *anti-H. pylori*.

4. OBJETIVO GENERAL

Aislar antocianinas del extracto metanólico de *C. procera* y evaluar su actividad anti-*H. pylori.*

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Establecer sistemas cromatográficos en capa fina con resolución suficiente para la separación y caracterización de antocianinas presentes en el extracto metanólico de *C. procera.*

- ✓ Aislar y purificar antocianinas mediante técnicas cromatográficas en columna abierta y HPLC preparativo.

- ✓ Elucidar la estructura química de las moléculas aisladas mediante técnicas espectroscópicas de RMN y espectrometría de masas.

- ✓ Evaluar la actividad anti-*H. pylori* de los compuestos aislados mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

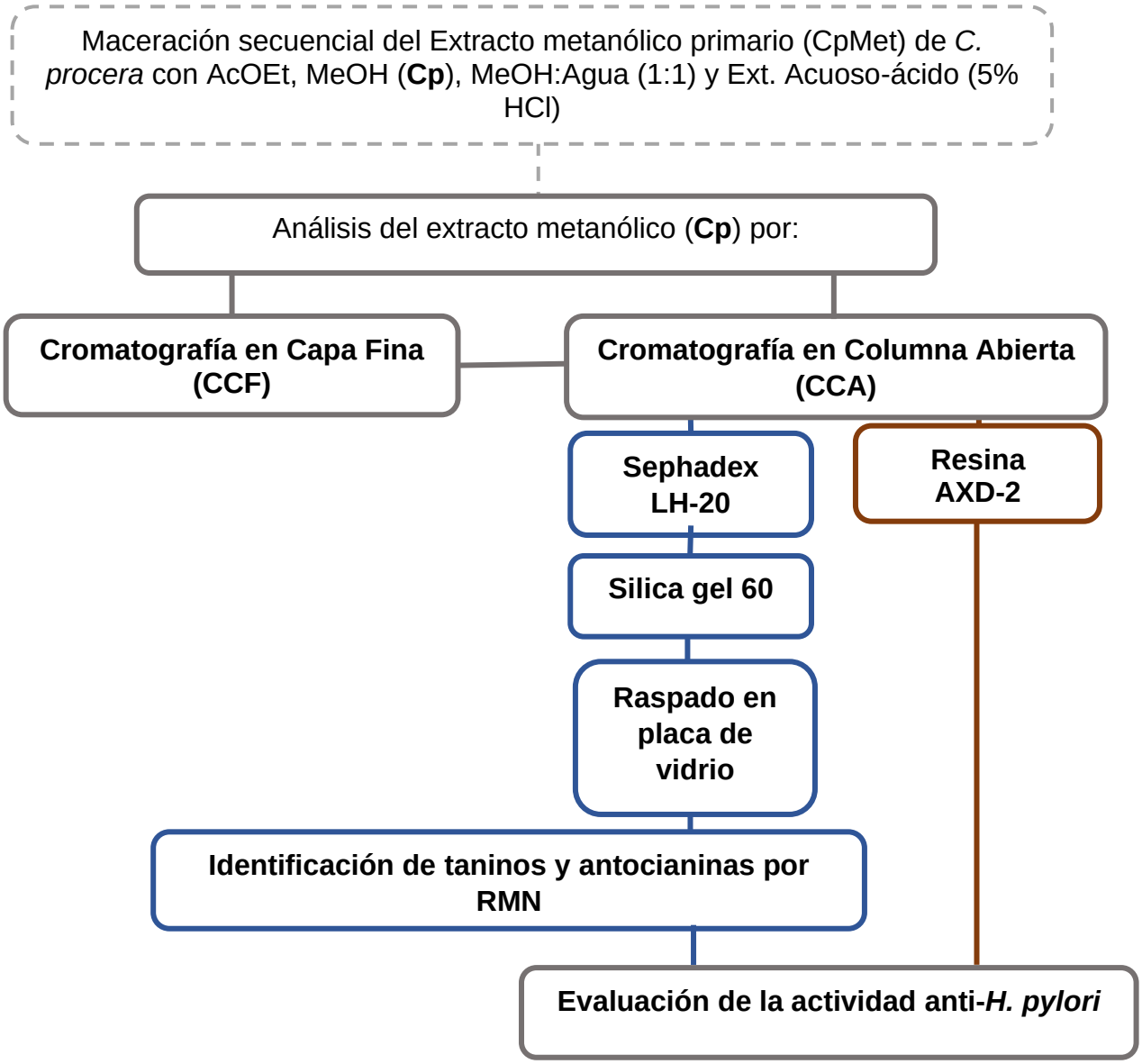


Figura 7. Diagrama general de la estrategia experimental para el aislamiento de compuestos y evaluaciones farmacológicas a partir de la corteza de *C. procera.*

7. METODOLOGÍA

7.1 Análisis del extracto metanólico Cp por Cromatografía en Capa Fina (CCF)

El extracto metanólico denominado como **Cp** que fue utilizado en este estudio proviene de una maceración secuencial con solventes de diferente polaridad de un extracto metanólico primario de la corteza de *C. procera*. En este proceso se utilizaron solventes en cascada como lo fue: acetato de etilo, metanol, una mezcla metanol:agua (1:1) y una disolución acuosa ácida (5% HCl). La metodología empleada en esta extracción se basa en un trabajo previo (Ramos, 2021).

La separación de los compuestos polares presentes en el extracto metanólico **Cp** se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina (CCF). Se empleó un sistema de disolventes butanol:ácido fórmico:agua (BAW) (40:10:15 v/v/v) como fase móvil y placas de sílica gel 60 F254 Merck® de fase normal, con dimensiones de 2x5 cm y 6x5 cm. Para el análisis, se aplicaron 3 µL del extracto metanólico **Cp**, a una concentración de 1 mg/mL en metanol, sobre cada placa cromatográfica.

Las placas cromatográficas se visualizaron en luz ultravioleta (UV) (254 nm) y larga (366 nm). Posteriormente, se sumergieron en una solución de vainillina al 1% en una mezcla de ácido sulfúrico y etanol (2:98 v/v). El revelado se realizó mediante calentamiento en una parrilla a 120 °C.

7.2 Cromatografía en columna abierta (CCA)

Se ensambló una columna de vidrio de 42 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro en un soporte universal. La fase estacionaria se agregó a la columna y se saturo con la fase móvil. Posteriormente se aplicó el extracto.

7.3 Fraccionamiento del extracto metanólico Cp de la corteza de *C. procera* por Cromatografía en Columna Abierta (CCA)

7.3.1 Fraccionamiento primario por CCA con Sephadex LH-20

En esta columna, se empleó Sephadex LH-20 como fase estacionaria y de etanol al 80% como fase móvil inicial para el extracto metanólico **Cp**. Posteriormente, para modificar la polaridad de la elución se adicionó acetona al 70%. Las fracciones recolectadas fueron concentradas en un evaporador centrífugo Eppendorf Vacufuge Plus, hasta sequedad.

Las fracciones obtenidas fueron posteriormente analizadas por cromatografía en capa fina (CCF), utilizando placas de sílica gel 60 F254 Merck® con dimensiones de 4x8 cm. Se aplicaron aproximadamente 3 µL de cada fracción, a una concentración de 1 mg/mL en metanol, en el punto de aplicación de cada placa. La elución se realizó con una fase móvil compuesta por butanol:ácido fórmico:agua (BAW) (40:10:15 v/v/v). Las placas fueron reveladas mediante inmersión en una solución de vainillina al 1% en ácido sulfúrico/etanol y posterior calentamiento a 120 °C en una parrilla. Finalmente, se procedió al análisis de los resultados y a la determinación de los rendimientos correspondientes.

7.3.2 Fraccionamiento secundario por Cromatografía en Columna Abierta (CCA) con sílica gel 60

Con el fin de continuar la purificación de las fracciones obtenidas de la columna Sephadex LH-20, se procedió al montaje de una segunda columna abierta de vidrio. Se utilizó sílica gel 60 como fase estacionaria y BAW (40:10:15 v/v/v). Se colectaron las fracciones y se llevaron a sequedad. Cada una de las fracciones fue sometida a un análisis por cromatografía en capa fina (CCF) de fase normal, utilizando BAW como fase móvil. Se observaron las placas mediante una cámara de revelado CAMAG con luz ultravioleta (UV) a 366 nm. A continuación, las placas se

sumergieron en una solución de vainillina al 1% en ácido sulfúrico/etanol y fueron reveladas por calentamiento en una parrilla a 120 °C. Finalmente, se llevó a cabo el análisis de los resultados y la determinación de los rendimientos correspondientes de cada fracción.

7.3.3 Cromatografía en Capa Fina (CCA) con sílica gel 60. Raspado en placa de vidrio

Para completar la purificación, se seleccionaron las fracciones que mostraron la menor cantidad de manchas en placa cromatográfica durante la migración de los compuestos a través de la fase estacionaria, indicando una mayor pureza. Estas fracciones fueron disueltas en metanol y aplicadas en forma de banda a lo largo de la placa de vidrio. En esta ocasión, la elución se llevó a cabo con una fase móvil compuesta por acetato de etilo:agua:ácido acético:ácido fórmico (80:26:11:11, v/v/v/v). Una vez que la placa se encontraba completamente seca, se procedió a raspar la zona de sílica gel correspondiente a la banda de interés, procurando evitar la inclusión de otros compuestos. La sílica que contenía las diferentes bandas de compuestos se extrajo con metanol, que posteriormente se llevó a sequedad en un evaporador centrífugo Eppendorf Vacufuge Plus. Finalmente, se determinó el rendimiento en peso seco de los compuestos obtenidos.

7.4 Caracterización estructural de un compuesto aislado por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La elucidación estructural de los compuestos aislados mediante los métodos cromatográficos, tanto en capa fina como en columna abierta, se llevó a cabo utilizando estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Para la caracterización de los compuestos, se adquirieron los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de protón (^{1}H) y DEPTQ en un

espectrómetro Varian, por un total de 15 horas a 600 MHz. Para la preparación de las muestras, estas fueron disueltas en metanol deuterado. El tetrametilsilano (TMS) fue empleado como referencia interna para la calibración de los desplazamientos químicos en los espectros de RMN de ^{1}H y DEPTs.

La identificación estructural se realizó después de un análisis exhaustivo de sus espectros. Específicamente, se consideraron los desplazamientos químicos (δ), las correlaciones en el desdoblamiento de las señales y las constantes de acoplamiento. Adicionalmente, se estableció una comparación con los espectros correspondientes a los metabolitos secundarios estructuralmente similares, previamente caracterizados en la literatura.

7.5 Cromatografía en Columna Abierta (CCA) con Resina AXD-2. Fracción fenólica.

Con el propósito de obtener una fracción fenólica enriquecida, se dispuso una columna cromatográfica empleando Amberlite XAD-2, un polímero hidrófobo de estireno-divinilbencenoresina como fase estacionaria. Previo al uso, la resina fue activada mediante un lavado exhaustivo con agua acidificada a pH 2 con ácido clorhídrico (HCl), empleando un volumen aproximado de 500 ml. Tras la activación, se aplicó vacío brevemente para remover el exceso de agua.

Posteriormente se disolvieron 200 mg del extracto metanólico en 20 ml de agua pH 2, la solución resultante se introdujero en la columna previamente preparada Amberlite XAD-2. A continuación, se permitió una interacción de 1 hora. Transcurrido este tiempo, la fase estacionaria fue lavada con un litro de agua neutra y nuevamente se aplicó vacío.

Finalmente, la elución de los compuestos fenólicos se realizó con 200 ml de metanol grado HPLC. La fracción eluida se concentró hasta sequedad mediante un evaporador centrífugo Eppendorf Vacufuge Plus y se determinó su rendimiento por gravimetría del residuo seco.

7.6 Ensayo de actividad anti-*Helicobacter pylori* de extractos metanólicos y fracciones aisladas de *Cyrtocarpa procera*.

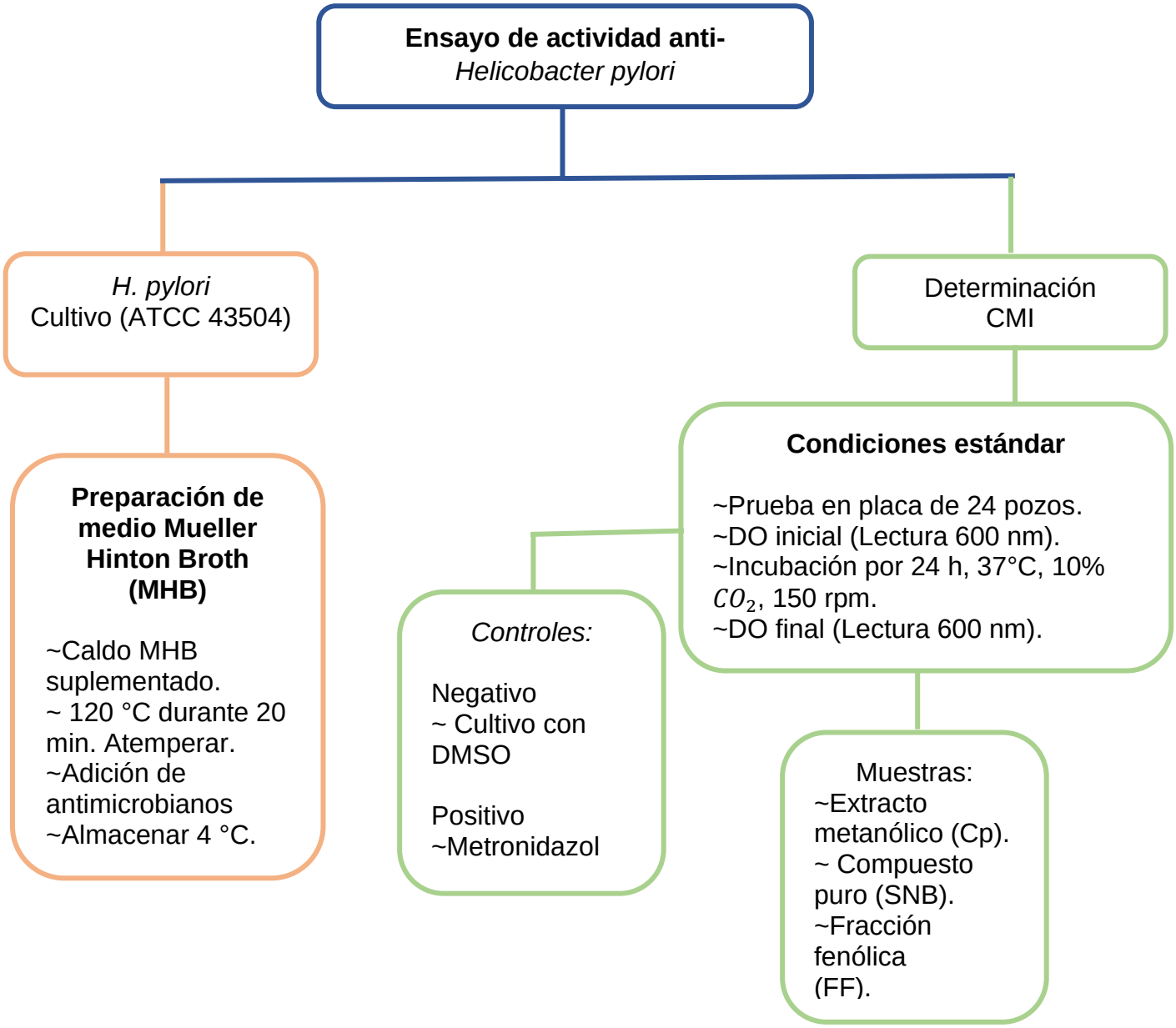


Figura 8. Diagrama general de la estrategia experimental para el ensayo de actividad anti-H. pylori de muestras obtenidas a partir de la corteza de C. procera.

7.6.1 Preparación de medio Mueller Hinton Broth (MHB)

Se disolvieron 21 g de polvo de MHB, 2 g de β-ciclodextrina en 1 L de agua destilada para realizar el medio Mueller Hinton Broth (MHB). Se esterilizo a 120 °C durante 20 min. Una vez que el medio MHB alcanzó una temperatura adecuada (menos de 40 °C), se adicionaron los siguientes antimicrobianos: 10 mg de vancomicina, 5 mg de trimetoprima, 2 mg de anfotericina B y 2.5 mg de polimixina. La mezcla se homogeneizó mediante agitación suave hasta obtener una solución uniforme. Posteriormente, el medio suplementado con los antibióticos se distribuyó en tubos Falcon de 50 ml, los cuales fueron almacenados en refrigeración a 4 °C hasta su uso en los ensayos microbiológicos.

7.6.2 Cepa bacteriana y preparación del lugar de trabajo.

Se trabajó con la cepa de *Helicobacter pylori* ATCC 43504. Las bacterias se mantienen almacenadas en alícuotas criopreservadas a -80 °C (ultracongelador REVCO) en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM. Todo el trabajo y los experimentos realizados con la bacteria se realizan en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

7.6.3 Determinación de concentración inhibitoria mínima (CMI) del extracto metanólico Cp, de las fracciones aisladas SBN y FF.

La actividad antibacteriana de las muestras a ensayar se evaluó determinando su concentración mínima inhibitoria (CMI). La CMI representa la concentración mínima de la muestra a la cual inhibe completamente el crecimiento bacteriano.

Se preparó un cultivo de *H. pylori* en medio MHB de la siguiente manera: Se descongelo la cepa bacteriana y se resuspendió evitando la creaciòn de burbujas, disgregando el pellet bacteriano. Tras la homogeneización, se tomó un volumen en

microlitros de la suspensión bacteriana y se incorporó a 90 ml de medio MHB previamente atemperado y contenido en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Enseguida se mezcló suavemente con movimientos circulares. Posteriormente, se tomaron dos alícuotas de 600 µL, las cuales se depositaron en celdas de espectrofotómetro para su lectura a 600 nm. El objetivo fue alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO) de 0.230. Si la DO alcanzada no era la deseada, se adicionaban volúmenes adicionales de la suspensión bacteriana hasta lograr la DO indicada.

Una vez obtenida la DO requerida, el matraz Erlenmeyer con el cultivo bacteriano se transfirió a una incubadora programada a 37°C con una atmósfera de 5% de oxígeno (O_2) y de dióxido de carbono 10% (CO_2), estuvo en agitación a 150 rpm durante 5 h.

Transcurrido dicho tiempo de incubación, se retiró el matraz de la incubadora y se verificó que la $A_{600} = 0.300$, de no ser así, se extendía el tiempo de incubación hasta obtener la absorbancia esperada. Esta absorbancia corresponde a la fase inicial del crecimiento logarítmico del cultivo.

Una vez que el cultivo alcanzó la DO deseada, se distribuyeron 1500 µL del cultivo bacteriano cuidadosamente en cada uno de los 24 pocillos de las microplacas empleadas en el ensayo. Se agregaron10 µL de las concentraciones de las diferentes concentraciones de las muestras (3.6 mg/µL, 7.81 mg/µL, 15.6 mg/µL, 31.5 mg/µL, 62.5 mg/µL y 125 mg/µL). Dado que las muestras fueron diluidas en dimetilsulfóxido (DMSO) se realizaron controles que solo incluían el solvente sin muestra como controles negativos y que representan el 100% del crecimiento. En la figura 9 se detalla la distribución utilizada en cada placa.

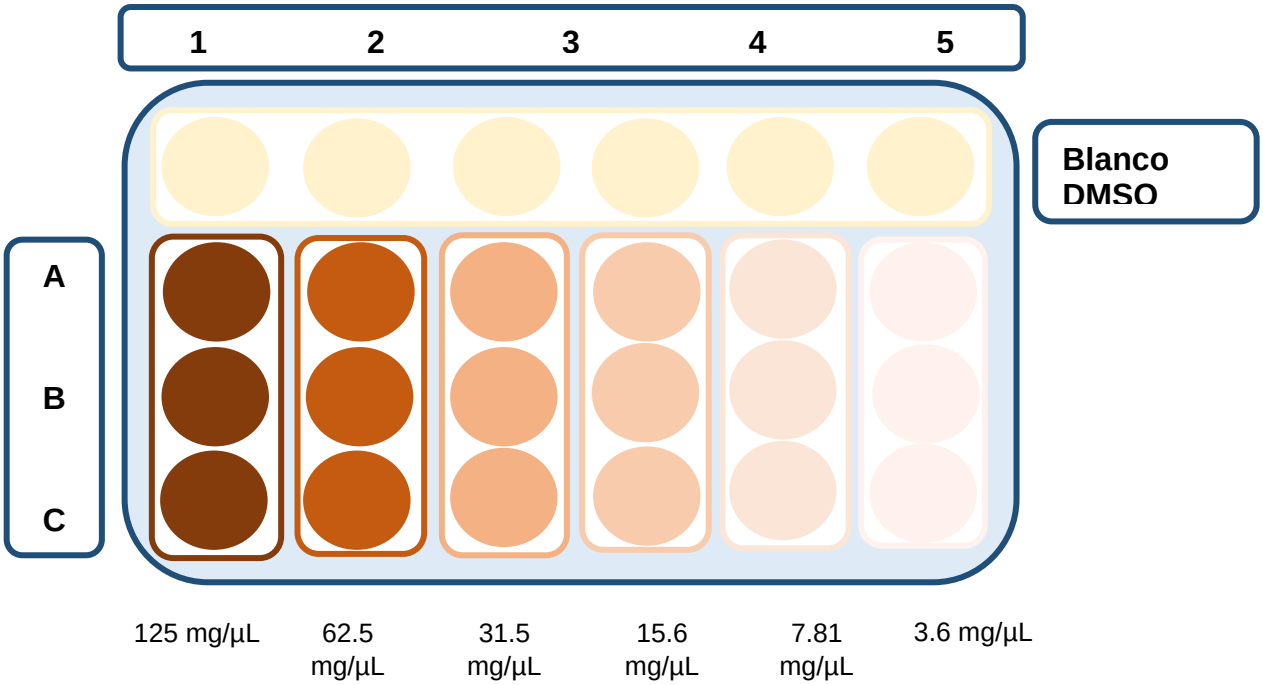


Figura 9. Representación de las diluciones seriadas aplicadas en placa de 24 pozos de las muestras de la corteza de *C. procera*.

Una vez incorporadas las muestras a los pocillos, se realizó una resuspensión suave del contenido. Posteriormente, se tomaron 600 µL de cada pocillo y se colocaron en celdas de espectrofotómetro separadas, con el fin de registrar la lectura inicial (DO_i) de cada dilución.

Se dejaron en incubaron por 24 con agitación a 150 rpm. Pasado este tiempo que corresponde al término de la fase exponencial del cultivo, se retiraron las microplacas de la incubadora y se tomaron 600 µL de cada pocillo para medir la DO final (DO_f) de cada dilución. El porcentaje de inhibición se calculó utilizando el crecimiento de los controles negativos como referencia (100% de crecimiento).

$$\%\text{Crecimiento} = \frac{(DO_f - DO_i \ Promedio\ del\ triplicado\ del\ esnsayo\ )(100)}{DO_f - DO_i\ control\ negativo}$$

$$\%\ \text{de Inhibición} = 100 - \%\ \text{crecimiento}$$

Cada experimento se realizó por triplicado y se realizaron al menos tres experimentos independientes.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Análisis del extracto metanólico Cp por Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Como primer acercamiento para el estudio del extracto metanólico se realizó un análisis mediante cromatografía en capa fina (CCF) utilizando diferentes sistemas de fases móviles, que proporcionaran una separación y resolución óptimas de los compuestos de interés, los cuales, tienen caracteristica una alta polaridad. El sistema que demostró la mejor resolución consistió en una combinacion de butanol, ácido fórmico y agua (BAW) en la proporción 40:10:15 v/v/v, resultando en un eluyente de carácter polar, como se ilustra en la Figura 10.

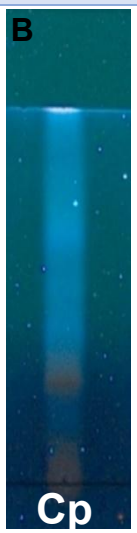
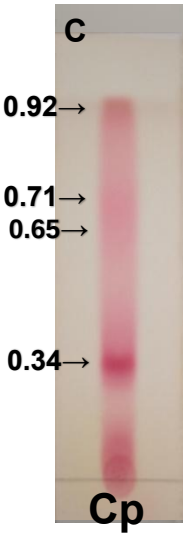
ANTES DE REVELAR		DESPUES DE REVELAR	
Luz visible	UV 366 nm	Vainillina	UV 366 nm
			

Figura 10. Cromatografía en capa fina Fase Normal del extracto metanólico de *C. procera.* Revelada con vainillina 1% H_2SO_4 /Etanol a 120ºC

En la placa cromatográfica identificada con el inciso A, se observa una banda de color rojo ladrillo bajo luz visible, antes de ser revelada (Figura 11A). Esta coloración

es un indicativo característico de la presencia de antocianinas, tal como lo describe Badui (2006).

La razón por la que se observan bandas separadas en la placa cromatográfica es que cada compuesto del extracto metanólico (Cp) interactuó de manera distinta con la fase estacionaria y móvil esto se depende de la polaridad de cada compuesto. Esta diferencia de polaridad causó que los compuestos fueran eluídos a diferentes velocidades a lo largo de la placa, resultando en factores de retención (Rf) distintos.

Los RFs más bajos corresponden a los compuestos más polares, esto debido a que se crearon interacciones más fuertes con la fase estacionaria que cuenta con una alta polaridad proporcionada por la sílica y por consiguiente pasan más tiempo retenidos en la placa y menos en la fase móvil. Sucede lo contrario con los compuestos que presentan Rfs más altos, ya que al ser menos polares se retienen menos en la fase estacionaria de alta polaridad e interactúa más con la fase móvil, que tiene una polaridad más baja respecto a la fase estacionaria.

En resumen, la cromatografía en capa fina con el sistema de elución butanol:ácido fórmico:agua permitió una separación efectiva de los compuestos polares del extracto metanólico, sugiriendo la presencia de antocianinas por la observación directa de bandas coloreadas. La diferente polaridad de los compuestos influyó en su interacción con las fases estacionaria y móvil, resultando en diferentes factores de retención y, por ende, en su separación. Este análisis preliminar sienta las bases para la identificación y caracterización más profunda de los componentes del extracto.

8.2 Cromatografía en columna abierta

Para llevar a cabo el fraccionamiento y separación de los compuestos del extracto metanólico se ocupó la técnica de cromatografía en columna abierta (CCA). Cada una de estas columnas fueron eluídas con diferentes fases móviles. Se seleccionaron las fases que permitieron una mejor resolución en la separación del

extracto. En el primer fraccionamiento se empleó Sephadex LH-20 con etanol 80% y acetona 70% como eluyentes.
En la segunda columna se utilizó sílica gel fase normal con BAW (40:10:15) como fase móvil.

8.2.1 Fraccionamiento primario del extracto metanólico Cp de la corteza de *C. procera* por Cromatografía en Columna Abierta (CCA) con Sephadex LH-20.

La separación de los compuestos se llevó a cabo mediante cromatografía en columna, empleando Sephadex LH-20 como fase estacionaria y etanol al 80% como eluyente inicial. Sephadex LH-20, una resina de exclusión por tamaño empleada en el aislamiento de flavonoides (Mottaghipisheh-Iriti, 2020), separa los compuestos en función de su tamaño. Fue más rápida la salida de las moléculas de mayores dimensiones ya que fueron excluidas la resina por su gran tamaño. Paso lo contrario con las moléculas de menores dimensiones ya que ellas lograron entrar en la resina. Para asegurar una elución uniforme y evitar la formación de burbujas, la columna se preparó con 24 horas de anticipación, permitiendo la correcta compactación de la resina.

Posteriormente, se disolvieron 13 gramos de extracto metanólico Cp en etanol al 80% y se introdujeron en la columna. La elución continuó con etanol al 80% y se completó con acetona al 70% para modificar la polaridad de la fase móvil.

Se obtuvieron un total de catorce fracciones de 50 ml cada una aproximadamente, denominadas A1 a A14.

Una vez recolectadas las fracciones, se evaporaron para obtener sus (Tabla 6).

Tabla 5. Peso de las fracciones obtenidas del primer fraccionamiento por Sephadex LH-20 del extracto metanólico Cp de la corteza de *C. procera.*

	Fracción	Peso (mg)
ETANOL	A1	55.8
	A2	150.3
	A3	143
	A4	98.4
	A5	34
	A6	235.5
	A7	259
ACETONA	A8	225.3
	A9	1255
	A10	2698.5
	A11	2073.5
	A12	1084.5
	A13	328.8
	A14	114.2

Finalmente, para observar la separación de los diferentes compuestos, cada fracción se sometió a CCF con una fase móvil de butanol:ácido fórmico:agua (BAW) (40:10:15 v/v/v).

La cromatografía en capa fina demostró ser una técnica eficaz para el fraccionamiento inicial del extracto metanólico Cp, permitiendo la separación de compuestos con distinta polaridad (Figura 11). El revelado con vainillina fue importante para visualizar las manchas rojizas que se observaban en la placa directamente y que se intensificaron a color fucsia al ser calentadas facilitando la identificación de los compuestos presentes. La fase móvil utilizada, compuesta por BAW (40:10:15 v/v/v), se seleccionó por su capacidad de generar un gradiente de polaridad adecuada para separar los componentes del extracto, donde los

compuestos menos polares (Rf 0.92) migran hacia la parte superior de la placa, mientras que las moléculas más polares (Rf 0.34) permanecieron en la parte de abajo. Esta separación en grupos de polaridad intermedia, media y alta fue fundamental para enfocar los esfuerzos en la identificación y caracterización de las sustancias de interés, donde las fracciones A6, A7 y A8 parecen contener compuestos de baja polaridad, en comparación con las fracciones A3, A4 y A5 con polaridad media y las fracciones A9, A10, A11, A12 y A13, con alta polaridad. Es interesante observar cómo la elución inicial con etanol al 80% (Imagen 11C) permitió la extracción de compuestos de polaridad variable que no se hallaron en las fracciones finales, indicando que esta etapa es importante para una separación más completa de los componentes del extracto. Estos resultados sugieren la presencia de diferentes familias de compuestos en el extracto metanólico Cp y justifican la necesidad de realizar análisis complementarios para su purificación, como seguir purificando con CCA con diferentes fases estacionarias, así como el uso de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), además de técnicas analíticas como son la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la Espectrometría de Masas (EM), para la identificación de cada compuesto y el análisis posterior de sus posibles actividades biológicas.

Para proseguir con la purificación, se combinaron las fracciones A4 y A5, que contenían compuestos de baja y mediana polaridad, dando origen a la fracción **S45**. La decisión de concentrar la purificación en estas fracciones se basó en las dificultades encontradas al intentar aislar los compuestos de alta polaridad presentes en las fracciones A6 a A14. Desafortunadamente, la fracción A3 se perdió en el intento de purificación por HPLC, por lo que la purificación por este método no concluyó. Aunado a esto, el equipo presento fallas mecánicas y no fue posible seguir utilizándolo.

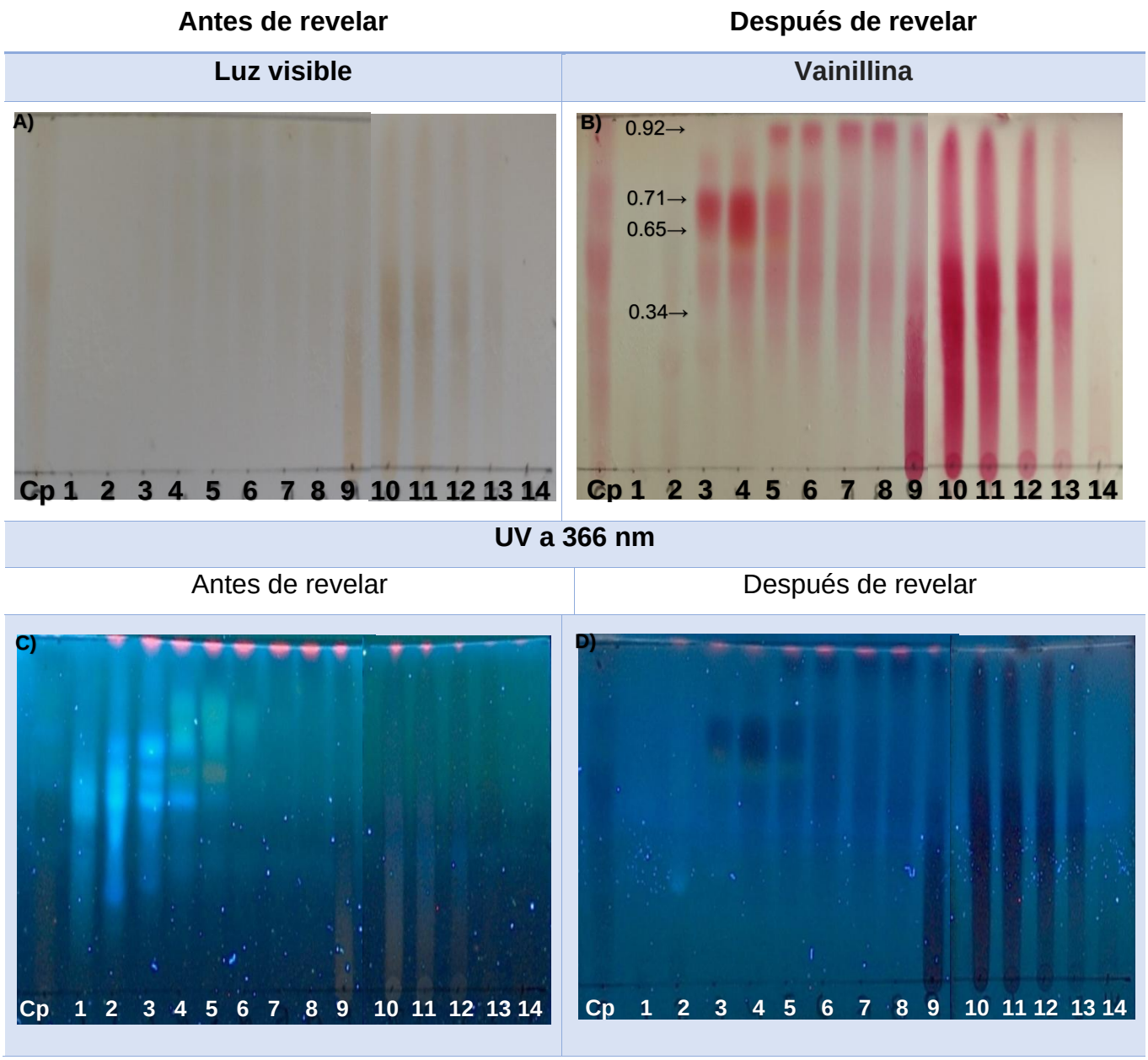


Figura 11. Cromatografía en capa fina Fase Normal del fraccionamiento primario por Sephadex LH-20 del extracto metanólico de *C. procera* (Cp), en donde A) y C) se observó con luz natural B) y D) se revelaron con vainillina 1% H_2SO_4 /Etanol a 120ºC. Cp: Extracto metanólico de *C. procera.*

El rendimiento total de la fracción **S45** fue de 132.4 mg. A continuación, se sometió a un segundo proceso de fraccionamiento.

8.2.2 Fraccionamiento secundario por CCA con sílica gel 60 (40-63 µm) de la reunión denominada fracción S45 del fraccionamiento primario.

Una vez utilizada Sephadex LH-20, se siguió con el siguiente paso que fue purificar por cromatografía en columna con sílica gel 60 (40-63 µm). Se utilizó una fase móvil de butanol:ácido fórmico:agua (BAW) en proporción (40:10:15) (Figura 12). La fracción S45 se aplicó a esta columna y se eluyó recolectando 35 fracciones de 2.5 ml cada una, identificadas de B1 a B35. Se utilizó CCF para realizan 14 agrupaciones.

.



Figura 12. Columna montada con sílica gel 60, utilizada para la separación de compuestos del extracto metanólico de *C. procera.* La fase móvil empleada fue butanol:ácido fórmico:agua (40:10:15).

Una vez reunidas las fracciones se concentraron y se pesaron para obtener su rendimiento en miligramos (Tabla 7) y se volvieron a analizar por CCF (Figura 13) para observar su perfil.

Tabla 6. Peso de las fracciones obtenidas del segundo fraccionamiento (fracción S45) con sílica gel fase normal como fase estacionaria y BAW (40:10:15) como fase móvil de la reunión B.

Fracción	Peso (mg)
B1	9.3
B2	7.8
B3	10.9
B4	12.4
B5	13.6
B6	18.4
B7	21.2
B8	10.7
B9	10.1
B10	8.7
B11	7.7
B12	6.8
B13	5.3
B14	7.9

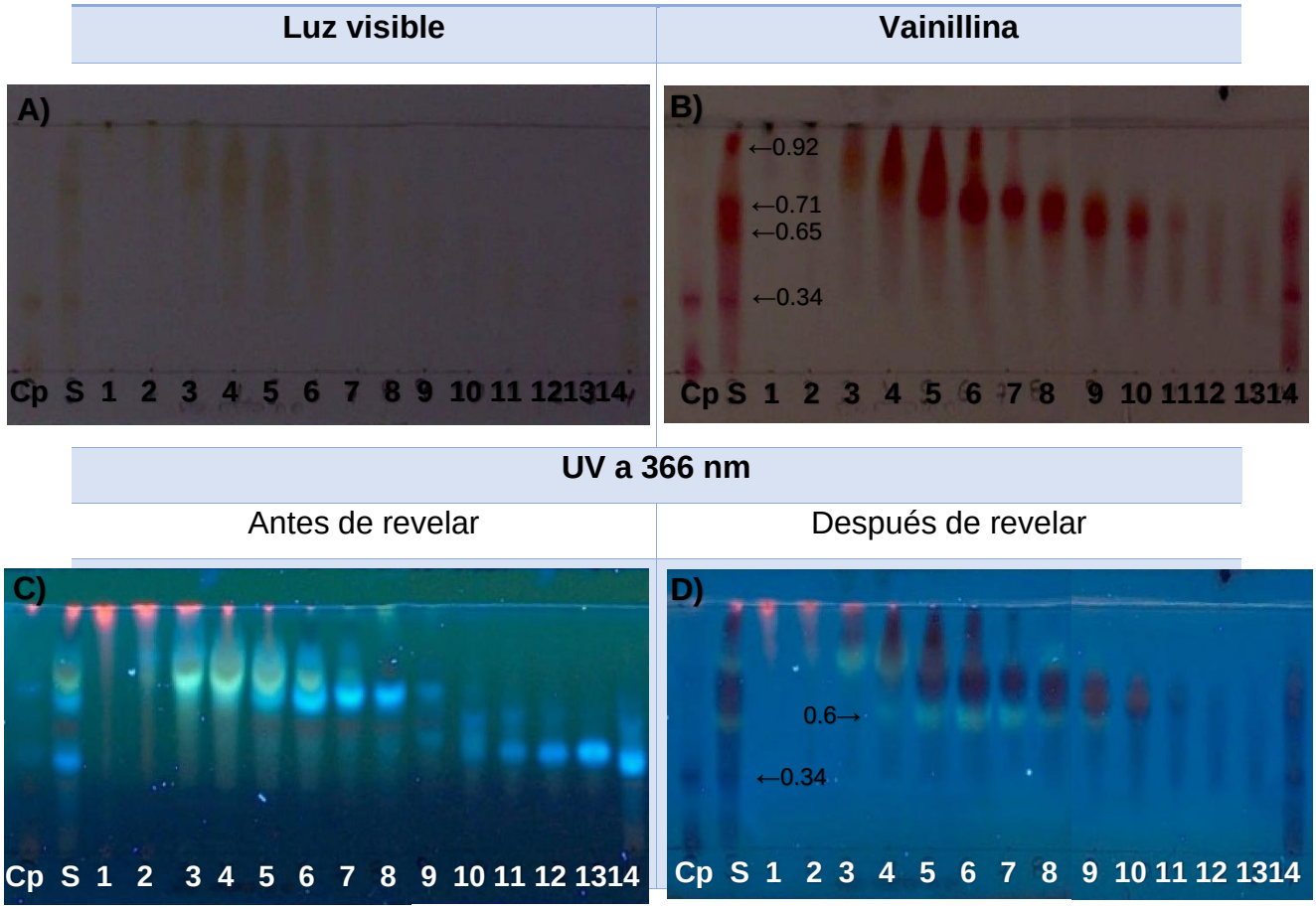


Figura 13. Cromatografía en capa fina Fase Normal de las reuniones del fraccionamiento secundario con sílica gel 60 de la reunión S45 del extracto metanólico de *C. procera*, en donde A) y B) se observó con luz natural C) y D) se revelaron con vainillina 1% $H_2SO_4/Etanol$ a 120ºC. C: Extracto metanólico de *C. procera.* S: fracción S45.

El análisis cromatográfico en capa fina (CCF) de las reuniones obtenidas revelo la separación de compuestos en función de su polaridad. La observación inicial bajo luz visible (Figura 13A) sugiere la presencia de compuestos con coloración propia en una tonalidad naranja-amarilla suave.

El revelado con vainillina (Figura 13B) proporcionó una visualización más detallada de los compuestos. Este reactivo es ampliamente utilizado en la detección de metabolitos secundarios, especialmente flavonoides, terpenoides, generando una variedad de colores que dependen de las modificaciones estructurales y los mecanismos de reacción involucrados (Wagner, 1996). La agrupación de compuestos de baja polaridad en las reuniones B1 a B3, y la aparición de manchas

de color fucsia con polaridad media (Rf 0.65 y 0.71) en las fracciones B4 a B11, indican una separación parcial basada en la afinidad de los compuestos por la fase estacionaria polar y la fase móvil empleada. Los diferentes valores de Rf obtenidos proporcionan una indicación de la polaridad de los compuestos, donde valores más altos sugieren menor polaridad y mayor afinidad por la fase móvil, tal como lo documentan varios estudios en separación de metabolitos de plantas (Patricio, 2019).

La observación bajo luz ultravioleta (UV) a 366 nm (Figura 13C) antes del revelado con vainillina revela la presencia de múltiples componentes en la fracción S45. En la reunión B3 y B4 se presentaron grupos de menor polaridad con Rf de 0.72 emitiendo luz en tonalidad amarilla. De B5 y B6 se observaron compuestos de mayor polaridad con Rf de 0.65 emitiendo una coloración azul vibrante. A partir de B7 a B14 se observaron manchas de luz de mayor polaridad en color azul. La capacidad de ciertos metabolitos secundarios para absorber la luz UV y emitir fluorescencia es una característica ampliamente utilizada para su detección en CCF, y está asociada con la presencia de grupos aromáticos conjugados en su estructura (Fried, 2018). La detección de múltiples manchas fluorescentes en S45 confirmaron que la fracción S45 no es un compuesto puro, sino una mezcla de varios componentes que requieren una mayor separación.

En la figura 13D se observa la placa revelada con vainillina bajo luz UV a 366 nm. En esta imagen se permitió observar a los compuestos que no son detectables en luz visible, revelando la complejidad de la composición química de la fracción S45. Los cambios en el color y la fluorescencia después del revelado sugieren la ocurrencia de reacciones químicas entre los compuestos y el reactivo de vainillina, formando productos coloreados y fluorescentes que permitieron una mejor diferenciación visual.

La fracción B7 fue elegida para la siguiente etapa de purificación debido a que mostró una mayor pureza en el análisis por CCF en comparación con las demás

fracciones y por la cantidad de muestra que se obtuvo para posteriores análisis. Se caracterizó por una polaridad media, evidenciada por un valor de Rf de 0.71 y un peso de 21.2 mg. La fracción B10 se nombrará como 'SNB' a partir de este punto.

8.6 Ensayo de actividad anti-*Helicobacter pylori* de extractos y fracciones aisladas de *Cyrtocarpa procera*.

8.3 Cromatografía preparativa en Capa Fina (CCF) con sílica gel 60. Raspado en placa de vidrio.

La purificación del compuesto SNB se continuó mediante CCF, utilizando placas de vidrio en fase normal, eluídas previamente con metanol para eliminar impurezas residuales. Debido a que la fase móvil BAW no logró separar adecuadamente los compuestos, por lo que se empleó una nueva fase móvil compuesta por acetato de etilo:agua:ácido acético:ácido fórmico (80:26:11:11, v/v/v/v). Esta modificación en la fase móvil disminuyó ligeramente la polaridad y facilitó un poco más la separación de las bandas, lo que permitió un raspado más selectivo de los compuestos. El ácido acético y el ácido fórmico en combinación en la fase móvil posiblemente contribuyeron a una mejor separación al modificar la interacción de los compuestos con la sílica. La sílica conteniendo una banda fue raspada y posteriormente extraída con metanol, obteniendo 17.2 mg del compuesto puro. La cantidad de compuesto fue poca pero suficiente para el análisis por RMN. Además, la cantidad obtenida permitió realizar el ensayo de actividad anti-*Helicobacter pylori.*

8.4 Caracterización estructural del compuesto SNB por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Se analizaron los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) DEPTQ y de protón (^1H) obtenidos del compuesto SNB. Realizar el análisis estructural de espectros de RMN puede ser un trabajo muy difícil especialmente para moléculas polares, de igual manera su purificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La caracterización estructural del compuesto SNB se complicó debido a que la muestra no se encontraba completamente pura, lo que incrementó la dificultan en la asignación de las señales.

Dada la complejidad inherente al análisis espectroscópico del compuesto SNB y las limitaciones impuestas por la presencia de impurezas, se optó por un enfoque descriptivo general para la interpretación de los espectros, centrándose en las señales y los desplazamientos químicos característicos.

En la figura 14 se puede observar el espectro de RMN de protón en donde se muestra la presencia de diferentes grupos de señales, que son característicos de acuerdo con la región en la que se encuentran.

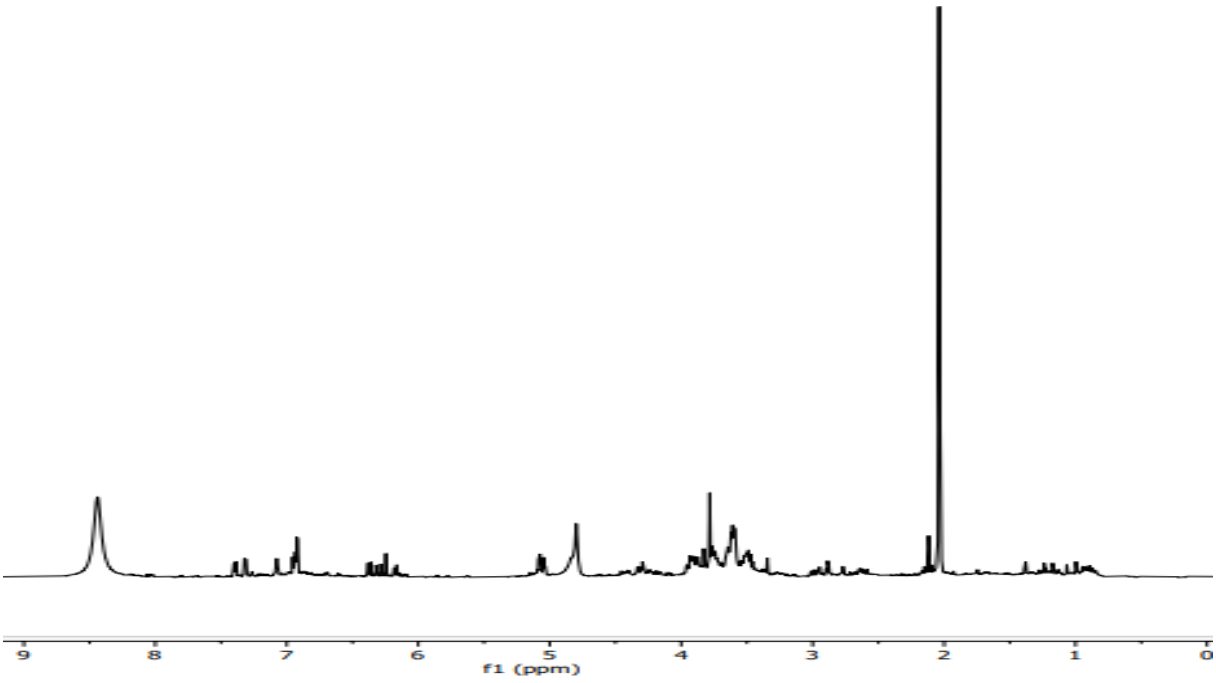


Figura 14. Espectro de RMN de protón ^1H a 600 MHz en oxido de deuterio (D_2O).

Las señales en la región 0-2.5 ppm indican la presencia de grupos alifáticos (CH_3, CH_2, CH). La escasez de señales en la región alifática, comparada con el área 3-4.5 ppm, podría indicar que la molécula no es predominantemente alifática.

Se observan multipletes señales entre 2.5-4.5 ppm. Esta región está muy concurrida con múltiples señales, lo que indica que hay protones acoplados entre sí. Dada la ubicación de los desplazamientos químicos, estos protones podrían estar unidos a carbonos vecinos de átomos electronegativos como oxígeno (O) o nitrógeno (N). En la región 3-4.5 ppm podrían existir azúcares, ya que los protones en los carbonos de una azúcar normalmente dan señales en esta región debido a los múltiples grupos hidroxilo y también a protones unidos a carbonos base oxígeno.

La señal ancha que se observa en 4.7 ppm es agua residual.

El doblete que se observa a 5ppm podría tratarse del hidrógeno de un azúcar

La presencia de señales en el rango de 6 a 7.5 ppm sugiere la presencia de protones unidos a anillos aromáticos. La presencia de múltiples señales en esta región sugiere que la fracción contiene un anillo aromático sustituido. Es probable que existan diferentes patrones de sustitución en el anillo, lo que genera diferentes desplazamientos químicos. Aunado a esto, se aumenta la posible presencia de una aglicona aromática (como se sugiere por las señales entre 3-4.5 ppm), donde el anillo aromático podría pertenecer a una aglicona unida al azúcar en forma de un glicósido.

Finalmente, la señal alrededor de 8.5 ppm podría indicar un protón aromático altamente desprotegido o una amida terciaria (Pavia, 2014).

El espectro de RMN de ^{13}C, presentado en la Figura 15, se obtuvo mediante un experimento DEPTQ (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer - Quaternary) a 600 MHz utilizando una criosonda, requiriendo 15 horas de adquisición. El espectro, que distingue entre señales positivas (CH_3, CH) y negativas (CH_2), proporciona información valiosa sobre la composición del compuesto SNB.

Se observan señales entre 0 y 30 ppm, características de carbonos saturados alquílicos (RCH_3, RCH_2R). El rango de 25 a 80 ppm corresponde a carbonos unidos a heteroátomos electronegativos (O, N, Cl), sugiriendo la presencia de grupos funcionales como alcoholes, éteres, aminas o haluros. La presencia de dos señales 95 y 98 ppm son característicos de protones carbonos anoméricos de azúcares, que se confirman con la presencia de dos señales en 65 y 68 ppm, que son típicos de C-6 de moléculas de glucosa. Se podría atribuir estas señales a dos unidades de glucosa o a la presencia de una mezcla en proporciones equivalentes de dos compuestos con un azúcar en su composición química. Entre 115 y 130 ppm se observa la presencia de carbonos aromáticos. Finalmente, la ausencia de señales en la región de 155 a 220 ppm descarta la presencia de grupos carbonilo (C=O) en la molécula. Esta información, obtenida a partir del análisis del espectro DEPTQ, proporciona una descripción inicial de la estructura química del compuesto analizado.

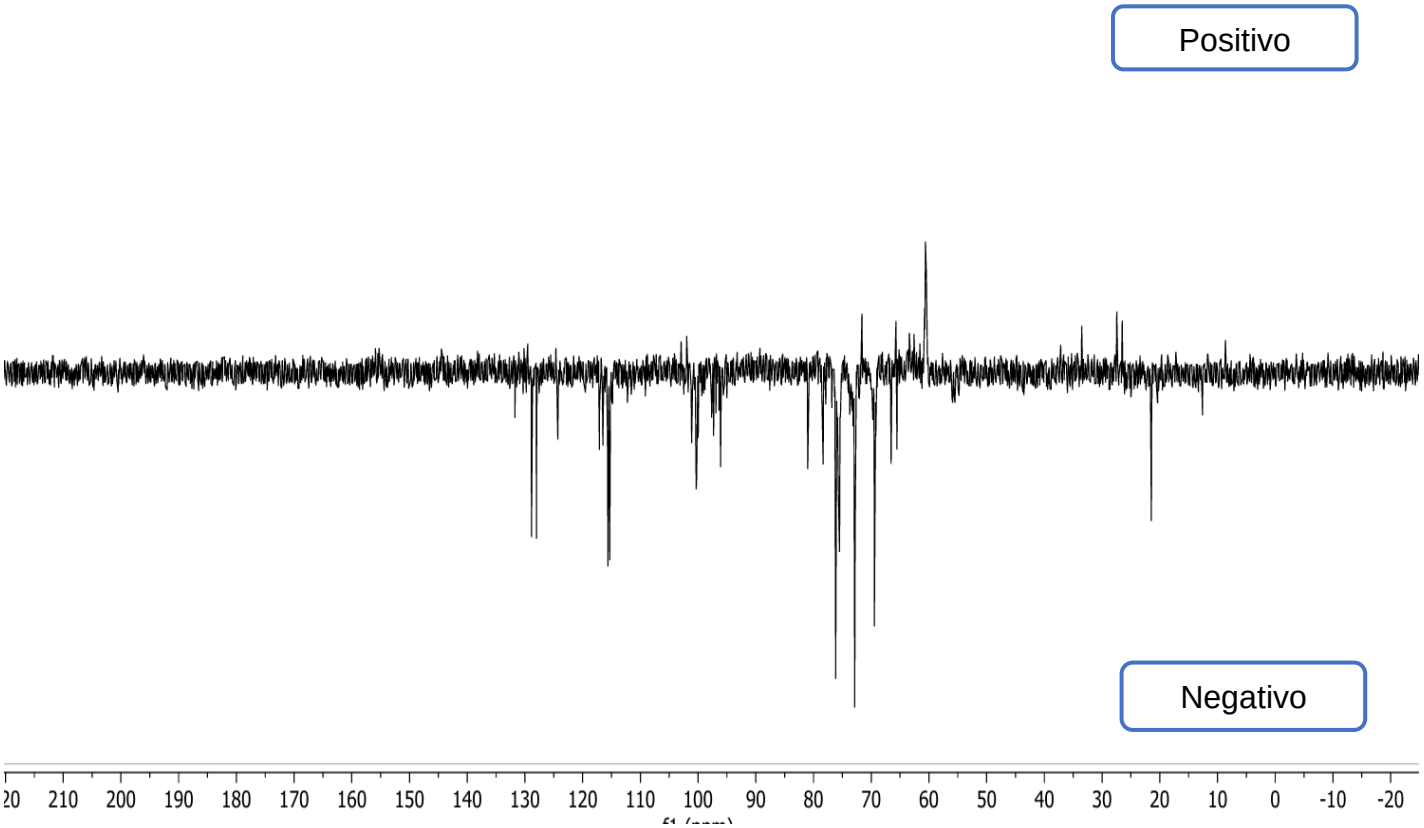


Figura 15. Espectro de RMN de protón ^{13}C a 600 MHz en oxido de deuterio (D_2O).

El análisis conjunto de los espectros de RMN de ^{1}H y ^{13}C (DEPTQ) sugiere una molécula formada por una parte azúcar y otra aromática.

En resumen, la evidencia espectroscópica sugiere la presencia de un glicósido con una aglicona aromática sustituida. Sin embargo, se requieren análisis adicional para confirmar esta hipótesis y determinar la estructura precisa.

8.5 Cromatografía en Columna Abierta (CCA) con Resina Amberlite AXD-2. Fracción fenólica.

Dada la dificultad para purificar a las antocianinas del extracto metanólico Cp se decidió obtener una fracción enriquecida en compuestos fenólicos.

Se empleó una columna resina Amberlite XAD-2 como fase estacionaria. La elección de esta resina se basó en su alta afinidad hacia polifenoles, tanto de alto como de bajo peso molecular, incluyendo taninos condensados (Pan *et al*., 2021). Esta resina, al ser un polímero estireno-divinilbenceno, permite la formación de interacciones tanto hidrófobas como polares con los compuestos fenólicos presentes en el extracto. La activación de la resina con agua ácida, y la posterior disolución del extracto metanólico, se realizó para optimizar estas interacciones y promover la retención selectiva de los polifenoles en la resina. La carga del extracto metanólico Cp fue de 200 mg en la columna con un el tiempo de contacto de una hora, lo que fue determinante para que los polifenoles se unieran adecuadamente a la resina. Posteriormente, el lavado de la columna con abundante agua neutra tuvo como finalidad eliminar impurezas como azúcares y otras moléculas polares, excluyendo a los compuestos de interés.

Para asegurar una mejor separación, se realizó un lavado selectivo del algodón ubicado en la parte inferior de la columna, donde se acumuló una cantidad considerable de color. Se introdujeron 5 ml de metanol grado HPLC al fondo de la columna esto con el objetivo de lavar el algodón y eliminar el color. Este es

importante para evitar la presencia de compuestos no deseados que pudieran interferir con análisis posteriores.

Se lavó la columna para obtener los compuestos fenólicos contenidos en la resina (Figura 16). Esta elución con metanol, al ser un solvente polar, fue eficaz para interactuar con los compuestos retenidos y promover su liberación (Soto-García, 2016).



Figura 16. Columna con XAD-2 como fase estacionaria lista para eluir con metanol.

Se obtuveron un total de 33.5 mg de la fracción fenólica, a la cual nombramos **FF**.

Se empleó un análisis en CCF para comparar el extracto metanólico (Cp) con la fracción fenólica (FF) y el compuesto purificado (SNB) (Figura 17). Utilizando como fase móvil BAW en proporción (40:10:15 v/v/v).

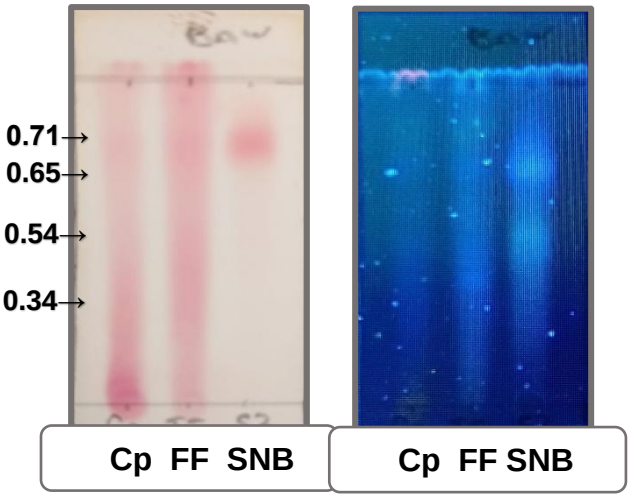


Figura 17. De lado izquierdo, placa cromatografica imagen a luz visible. De lado derecho vista en luz UV a 366 nm. Revelada con vainillina 1% H_2SO_4 /Etanol a 120ºC

La Figura 17 presenta un análisis visual comparativo de las fracciones obtenidas mediante cromatografía en capa fina. Observamos tres muestras: el extracto metanólico (Cp), la fracción fenólica (FF), y el compuesto purificado SNB, todos ellos observados tanto en luz visible y luz ultravioleta a 366 nm.

En la muestra Cp se observó una mezcla compleja de compuestos, evidenciado por la presencia de varias manchas eluídas a lo largo del recorrido cromatográfico. Esto sugiere una diversidad de polaridades entre los componentes del extracto metanólico (Cp), confirmando lo discutido anteriormente sobre su complejidad. Los compuestos menos polares, que han migrado más lejos del punto de aplicación, parecen ser abundantes, aunque también se perciben compuestos de mayor polaridad en el punto de aplicación y muy cerca de él.

En comparación, la fracción fenólica (FF) exhibe un perfil distinto. Se observa una menor concentración de compuestos polares en el punto de aplicación, lo que indica que la purificación con la resina AXD-2 fue efectiva en separar parte de los compuestos no fenólicos. Además, las manchas en esta fracción son notablemente más intensas en comparación con Cp, lo que podría ser consecuencia directa de la purificación, que eliminó compuestos no fenólicos permitiendo que los compuestos

fenólicos reaccionaran con el revelador de vainillina, resultando una coloración más pronunciada. Lo que facilitó la identificación de manchas con valores de Rf específicos de: 0.34, 0.65, 0.71 y 0.92.

SNB presenta una mancha que sobresale con un Rf de 0.71 bajo luz natural. Sin embargo, al observarla bajo luz UV a 366 nm se notó la presencia de un grupo adicional de compuestos con un Rf de 0.54, lo que podría deberse a que algunos compuestos reaccionan en esta longitud de onda. A partir de este punto lo que era llamado compuesto purificado SNB pasará a llamarse fracción **SNB**.

Fue complicada la purificación en la parte fitoquímica, pero se obtuvo material suficiente de algunas muestras, para realizar los ensayos de actividad anti- *H. pylori*. Esto fue crucial para determinar el potencial biológico de estos extractos y fracciones.

8.6.1 Compuestos y diluciones

La evaluación de la actividad anti-*H. pylori* se realizó en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Este estudio fue supervisado por la Dra. Irma Romero Álvarez y contó con el apoyo de la estudiante de Licenciatura en Biología Yatziry Luna Galicia.

Para evaluar la actividad biológica se realizaron ensayos por triplicado con el extracto metanólico (Cp), la fracción fenólica (FF) y con la fracción SNB. Inicialmente, se prepararon soluciones stock de cada una de estas muestras disolviéndolas en DMSO (Figura 18). La solubilidad en DMSO es crucial para garantizar una distribución homogénea del compuesto y así evitar inconsistencias en el ensayo. Ya se ha demostrado en el laboratorio que el DMSO no presenta toxicidad a la concentración final que queda en el ensayo. Además, es ampliamente utilizado *in vitro* debido a su capacidad para solubilizar una amplia gama de compuestos (Dyrna *et al*., 2019; CLSI, 2020). Al no presentar inconvenientes para disolver la muestra confirmó la afinidad de estos compuestos con solventes polares,

lo que es coherente con su extracción metanólica y por lo que se sugiere que los componentes activos presentes en nuestras muestras poseen una alta polaridad. Esto es particularmente relevante para la fracción fenólica (FF), ya que los compuestos fenoles son conocidos por su estructura rica en grupos hidroxilo, lo cual les confiere polaridad y solubilidad en solventes polares (Dai *et al*., 2010).

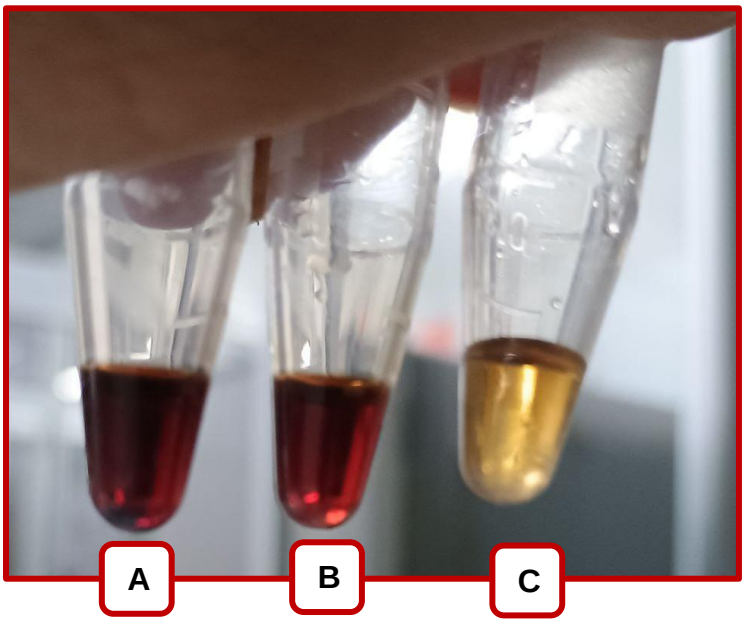


Figura 18. Muestras stock disueltas en DMSO: A). Extracto metanolico Cp, B). Fracción fenólica FF y C). Fracción SNB.

8.6.2 CMI del metronidazol como antibiótico control positivo.

El metronidazol (Mt) es un antibiótico que se utiliza con frecuencia contra *Helicobacter pylori*, ya que cuenta una eficacia que es influenciada según prevalencia de la bacteria. En el presente estudio, se seleccionó la cepa ATCC 43504 de *H. pylori*, caracterizada por su resistencia intrínseca al metronidazol. El valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) determinado fue de 250 µg/mL (Figura 19), lo que concuerda con los límites de resistencia estandarizados previamente reportados para esta cepa, cuyo rango se sitúa entre 64 y 256 µg/mL

(CLSI, 2007; EUCAST, 2023). La obtención de una CMI dentro del rango esperado para la cepa ATCC 43504 valida la metodología empleada y establece un punto de referencia crucial para evaluar el potencial antibacteriano de nuestras fracciones, considerando la resistencia a metronidazol como un factor a superar.

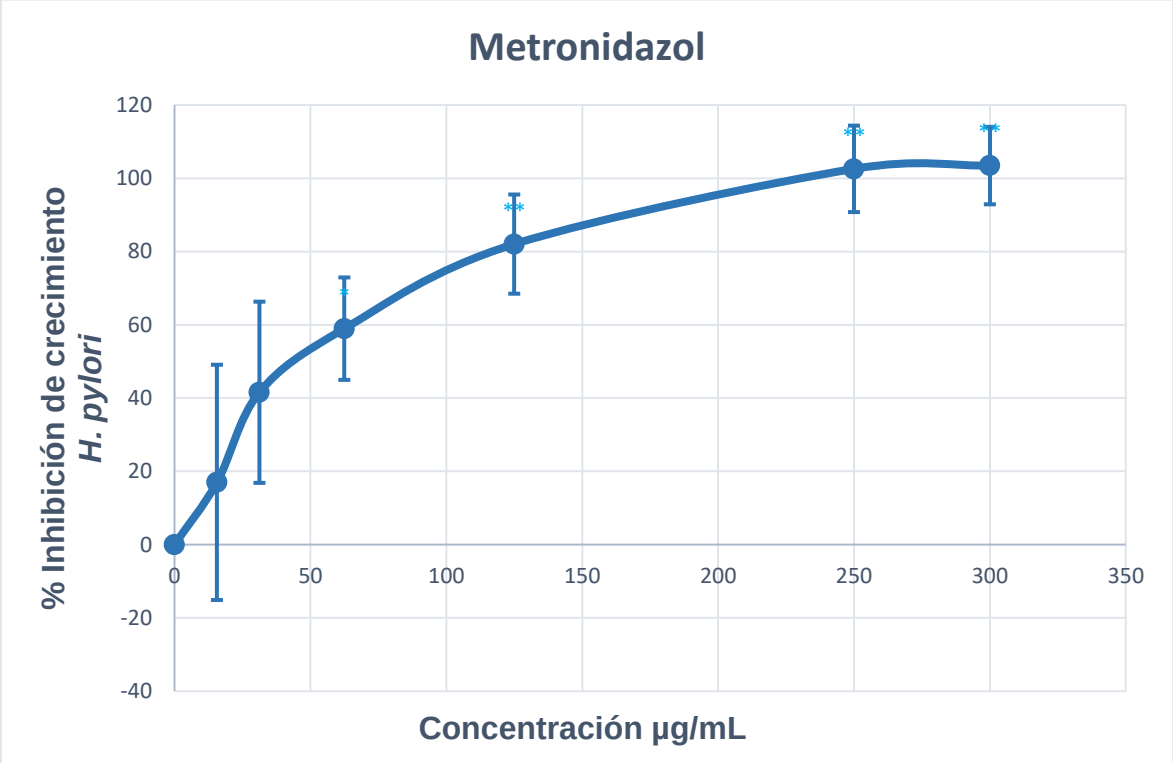


Figura19. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por metronidazol. Cada punto representa la media de 4 experimentos± DE. Valores estadísticamente significativos con respecto al control, *P < 0.01, ** P< 0.0001 de acuerdo con la prueba Shapiro-Wil.

8.6.3 CMI del extracto metanólico Cp

El extracto metanólico Cp empleado en este estudio se obtuvo a partir del extracto metanólico primario (CpMet) de la corteza de *C. procera*. CpMet fue sometido a un proceso de fraccionamiento por extracción secuencial de solventes realizada previamente por Ramos (2020). Dicha metodología empleó una extracción sucesiva con acetato de etilo, metanol, una mezcla metanol:agua (1:1) y, finalmente, una

extracción ácida acuosa (5% HCl). El extracto Cp utilizado en este trabajo corresponde a la fracción metanólica obtenida en esta extracción secuencial.

En este trabajo se determinó la susceptibilidad *H. pylori* hacia Cp (Figura 20). Como se puede observar a la concentración más baja ensayada (62.5 µg/mL), la inhibición del crecimiento es de un 20%. Sin embargo, a medida que se incrementa la concentración a 250 µg/mL se observa un aumento pronunciado en la inhibición hasta llegar con esta última concentración al 100% de inhibición de crecimiento (CMI). A concentraciones superiores a 250 µg/mL, la curva se estabiliza, indicando que el aumento de la concentración no incrementa significativamente la inhibición. En la misma figura se muestra la cuerva de inhibición de metronidazol donde es claro que a partir de 125 µg/mL las curvas son muy semejantes.

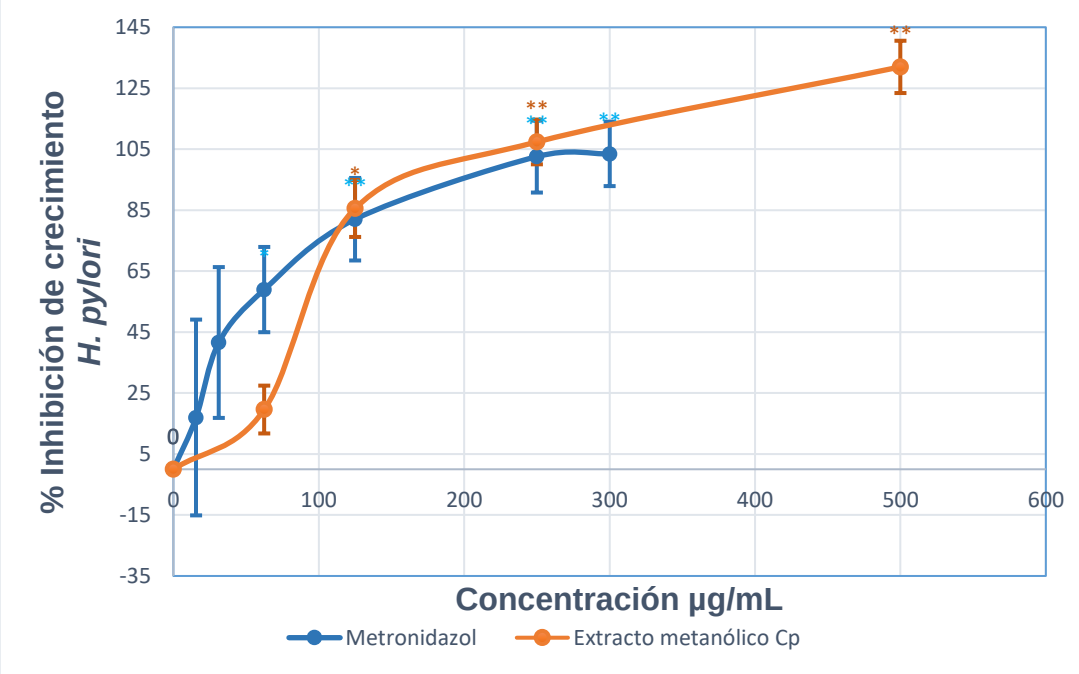


Figura 20. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por metronidazol comparado con Cp. Cada punto representa la media de al menos 3 experimentos± DE. Valores estadísticamente significativos con respecto al control, *P < 0.01, ** P< 0.0001 de acuerdo con la prueba Shapiro-Wil.

Dicho esto, Cp presentó una concentración mínima inhibitoria CMI de 250 µg/mL, mientras que el extracto primario CpMet mostró una CMI significativamente menor

de 62.5 µg/mL (Escobedo-Hinojosa, 2012). Esta diferencia en la actividad antimicrobiana puede atribuirse a la variación en la concentración de los compuestos bioactivos responsables del efecto inhibitorio en ambas muestras. Es posible que, durante el proceso de fraccionamiento del extracto CpMet, algunos de estos compuestos bioactivos se removieron, posiblemente durante la extracción con acetato de etilo. A diferencia de Cp, en el extracto CpMet estos compuestos se mantuvieron intactos, lo que explicaría su mayor potencia antimicrobiana.

La caracterización de las catequinas (+)-catequina, (−)-epicatequina, (+)-epicatequina galato y (−)-epicatequina galato en el extracto de acetato de etilo, realizada previamente por Ramos en el 2020, sugiere una posible explicación para respaldar esta hipótesis. Si bien Ramos no evaluó la actividad biológica de estas catequinas individualmente, existen reportes en la literatura que respalda su potencial anti-*H. pylori (*Díaz-Gómez et al., 2013; Takabayashi 2004; Mabe *et al*., 1999). Estudios previos han demostrado la capacidad de estas catequinas para inhibir el crecimiento de *H. pylori*, incluyendo la cepa ATCC 43504 (Díaz-Gómez et al., 2013). Además, se ha reportado su actividad inhibidora contra bacterias Gram-positivas (Sinsinwar-Vadivel, 2020; Fathima-Rao, 2016), así como otras propiedades biológicas (de Araújo *et al*., 2022; Saleem *et al*., 2020; Owczarek *et al*., 2019). Por lo tanto, se plantea que la presencia de estas catequinas en el extracto de acetato de etilo podría contribuir significativamente a la actividad anti-*H. pylori* y menos presentes los compuestos polares presentes en el extracto metanólico. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para confirmar esta hipótesis y determinar la contribución específica de cada catequina a la actividad antimicrobiana del extracto. Además de estudiar la actividad anti-H.pylori de los extractos metanol:agua (1:1) y de la extracción ácida acuosa (5% HCl).

Como ya comentamos, el extracto Cp exhibió una CMI de 250 µg/mL, un valor similar al observado para el metronidazol (250 µg/mL) (CLS1, 2007; EUCAST, 2023). Esta observación indica que la actividad anti-*H. pylori* del extracto metanólico es comparable a la del metronidazol sugiriendo el potencial terapéutico del extracto Cp. La posible aplicación del extracto metanólico como alternativa terapéutica al

metronidazol en el tratamiento de infecciones por *H. pylori* resistentes a este antibiótico requiere una investigación más exhaustiva.

8.6.4 CMI de la fracción pura (SNB)

Se determinó la susceptibilidad de la fracción SNB la cual proviene de una purificación del extracto metanólico Cp. En la figura 21 se muestra el efecto de concentraciones crecientes de la fracción SNB, como puede observarse la fracción no presenta una inhibición estadísticamente significativa del crecimiento de *H. pylori* aún a la concentración más alta ensayada, 125 µg/mL. En la misma figura se compara el efecto con el control positivo metronidazol, que como ya habíamos visto inhibe forma creciente conforme aumenta su concentración.

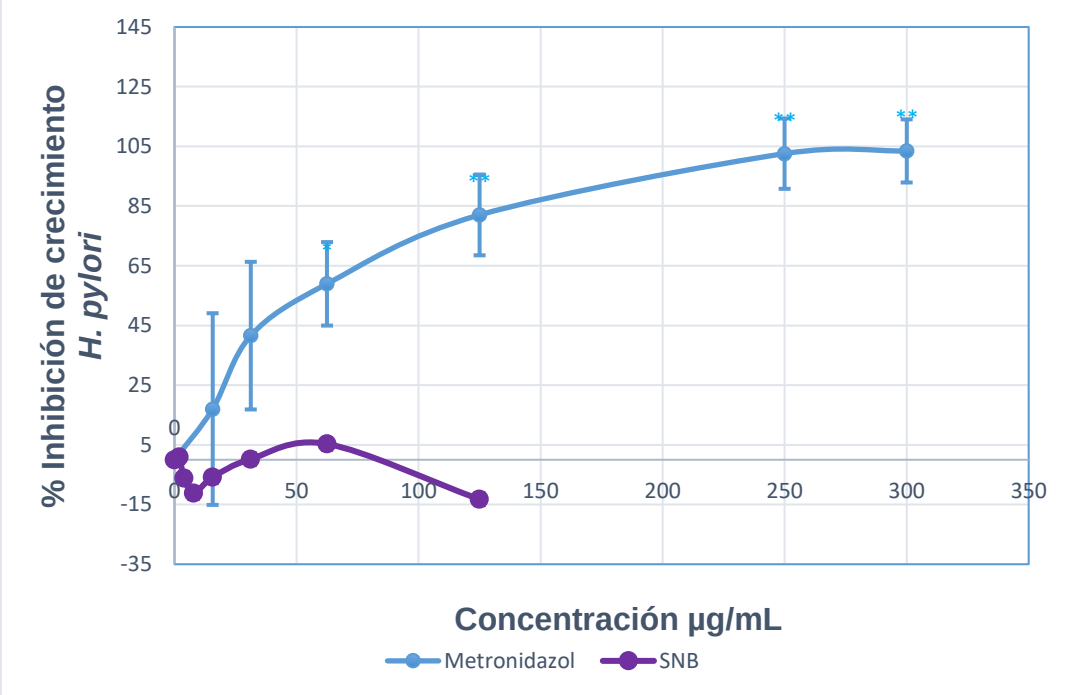


Figura 21. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por metronidazol comparado con la fracción SNB. Cada punto representa la media de al menos 3 experimentos± DE. Valores estadísticamente significativos con respecto al control, *P < 0.01, ** P< 0.0001 de acuerdo con la prueba Shapiro-Wil.

8.6.5 CMI de la fracción fenólica (FF)

En la figura 22 se muestra una clara relación dosis-respuesta entre la concentración de FF (µg/mL) y el % de inhibición del crecimiento de *H. pylori*.

Se determinó que la CMI fue de 250 µg/mL, comparable a la del metronidazol de 250 µg/mL, que también se muestra en la figura 22. A esta concentración la FF logró una inhibición del 105.13% y el metronidazol de 102.56% respectivamente, por lo que esta similitud en la eficacia a la CMI sugiere que la FF podría ser una alternativa terapéutica prometedora para el tratamiento de infecciones por *H. pylori*. Sin embargo, las curvas no son similares ya que a concentraciones bajas (hasta 125 µg/mL) el metronidazol es más eficiente que la FF a la bacteria.

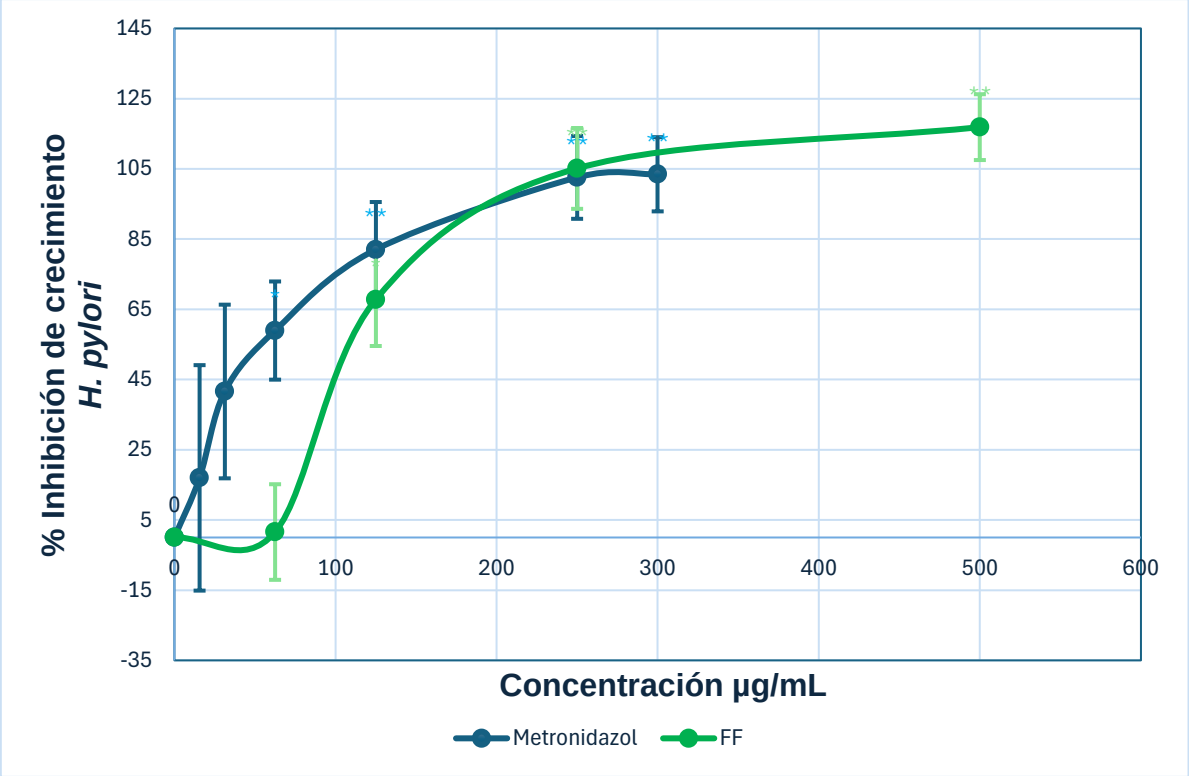


Figura 22. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori por metronidazol comparado con FF. Cada punto representa la media de al menos 3 experimentos± DE. Valores estadísticamente significativos con respecto al control, *P < 0.01, ** P< 0.0001 de acuerdo con* la prueba Shapiro-Wil.

Este hallazgo indica una actividad antimicrobiana significativa de FF. No obstante, el potencial terapéutico de la fracción fenólica FF requiere una investigación más profunda de sus componentes. La biodisponibilidad de los polifenoles que componen a la FF está intrínsecamente ligada a su estructura química, caracterizada por la presencia de múltiples grupos hidroxilo fenólicos (Tsimogiannis, 2019). Esta diversidad estructural permite clasificarlos en diferentes subgrupos, incluyendo ácidos fenólicos, taninos, flavonoides (como las antocianinas), carotenoides y proantocianidinas. Estos compuestos han demostrado poseer una amplia gama de actividades biológicas, no limitándose a la actividad anti-*H. pylori* (Díaz-Gómez *et al*., 2013), sino que también incluyen efectos neuroprotectores, cardioprotectores, antiinflamatorios, antidiabéticos, anticancerígenos y antienvejecimiento (Prabhu *et al*., 2021; Zhang *et al*., 2021; Kaur *et al*., 2021). La complejidad de la composición de la FF y la multiplicidad de sus posibles mecanismos de acción requieren un análisis exhaustivo para determinar su eficacia y seguridad como agente terapéutico. Estudios futuros deberían enfocarse en la caracterización completa de la composición de la FF, la evaluación de la biodisponibilidad de sus componentes individuales y la elucidación de sus mecanismos de acción específicos**.**

9. CONCLUSIONES

- Se logró establecer mediante una búsqueda exhaustiva un sistema cromatográfico capaz de separar compuesto de alta polaridad presentes en el extracto metanólico (Cp) de *C. procera.*
- Si bien la purificación de antocianinas y taninos condensados en *C. procera* mediante HPLC no se logró debido a su complejidad estructural, la experiencia adquirida en el manejo de esta técnica permitirá continuar la búsqueda de nuevos compuestos.
- Se determinó el efecto de los extractos Cp, FF y SNB sobre el crecimiento de la cepa de referencia *H. pylori* ATCC 43504. Las CMIs de Cp y FF (250 µg/mL) fueron comparables a las del antibiótico metronidazol utilizado en las terapias de erradicación de la bacteria. Estos resultados sugieren el potencial de estas dos muestras como alternativas terapéuticas al metronidazol, considerando la alta resistencia de *H. pylori* a este fármaco.
- Se descartó a fracción SNB como posible terapia contra *H. pylori*.
- *Cyrtocarpa procera* se perfila como una especie con la capacidad de solucionar o prevenir los problemas de erradicación de *H. pylori,* pero se requiere investigación adicional para validar su eficacia terapéutica o preventiva.

10. PERSPECTIVAS

-Identificar y caracterizar los compuestos fenólicos presentes en FF para evaluar su actividad antibacteriana contra *Helicobacter pylori*.

-Determinar el perfil químico de los extractos metanol:agua (1:1) y ácido acuoso de CpMet para identificar los compuestos bioactivos responsables de las actividades biológicas previamente descritas.

-Se propone realizar una purificación más completa para aislar y caracterizar el compuesto mayoritario de SNB para contribuir en el conocimiento del perfil fitoquímico de *C. procera*.

11. BIBLIOGRAFÍA

A

- Aherne SA y O'Brien NM.: Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. Nutrition, 2002, 18:75-81.
- Alvarado-Esquivel C. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in pregnant women in rural durango, Mexico. Int J Biomed Sci. 2013 Dec;9(4):224-9. PMID: 24711758; PMCID: PMC3884792.
- Amieva MR, El-Omar EM. Host bacterial interactions infection. Gastroenterology. 2008; pp 134: 306 – 23.
- Augustin JM, Kuzina V, Andersen SB, Bak S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. Phytochemistry. 2011; 72(6):435-457. DOI: 10.1016/j.phytochem.
- Argueta, VA, Cano, L., Rodarte, M. Atlas de Plantas de la Cultura Tradicional Mexicana. Medicamento. Instituto Nacional del Indígena, México, DF. 1994. http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=cyrtocarpa-procera.
- Atherton JC. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. Annu Rev Pathol. 2006; 1:63-96. DOI: 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100125. PMID: 18039108.
- Ávalos Ga, Pérez-Urria CE. Metabolismo secundario de plantas. 2009; 2(3):119-145. ISSN:1989-3620

B

- Backert S, Ziska E, Brinkmann V, Zimny-Arndt U, Fauconnier A, Jungblut PR, Naumann M, Meyer TF. Translocación de la proteína *Helicobacter pylori* en células epiteliales gástricas por un aparato de secreción tipo IV. Microbiol celular. 2000; 2(2):155-64. DOI: 10.1046/J.1462-5822.2000.00043.X. PMID: 11207572.
- Badui D. S. Química de los Alimentos. Editorial Pearson Educación, México. 2006; pp 417-427.
- Bai H, Li Q, Liu X, Li Y. Characteristics and Interactions of *Helicobacter pylori* and *H. pylori*-Infected Human Gastroduodenal Epithelium in Peptic Ulcer: A Transmission Electron Microscopy Study. Dig Dis Sci 2009.
- Basso D, Zambon CF, Letley DP, Stranges A, Marchet A, Rhead JL, Schiavon S, Guariso G, Ceroti M, Nitti D, Rugge M, Plebani M, Atherton JC. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA gene polymorphisms. Gastroenterology. 2008; 135(1):91-9. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.03.041. Epub 2008 Mar 25. PMID: 18474244.
- Beg, A. y. I. A. "Effect of Plumbago zelanica extract and certain curing agents on multidrog resistant bacteria of clinical drugs". 2000

C

- Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Avila, G., Duran, A., Lira, R. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, Mexico. Journal of Ethnopharmacology. 2005; 97: 429-439.
- Cartaya, O., Reynaldo Inés Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. Cultivos Tropicales [en linea]. 2001, 22(2), 5-14[fecha de Consulta 9 de Mayo de 2023]. ISSN: . Disponible en: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215009001
- Castillo-Juárez I. y Romero I. Plantas con actividad anti- *Helicobacter pylori*: una revisión. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 2007; 80:35-61.
- Castillo-Juárez I, González V, Jaime-Aguilar H, Martínez G, Linares E, Bye R, Romero I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. Journal of Ethnopharmacology. 2009; 122:402-405.
- Cervantes García .*Helicobacter pylori*: mecanismos de patogenicidad. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab. 2016;63(2):100-9. Disponible en:https: //www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2016/pt162h.pdf

- Cheng, A.-X.; Han, X.-J.; Wu, Y.-F.; Lou, H.-X. La función y catálisis de las oxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato involucradas en la biosíntesis de flavonoides vegetales. 2014; *15*, 1080-1095. https://doi.org/10.3390/ijms15011080
- Chiang T-H, Chang W-J, Chen SL-S, Yen AM-F, Fann JC-Y, Chiu SY-H, et al. Mass eradication of *Helicobacter pylori* to reduce gastric cancer incidence and mortality: a long-term cohort study on Matsu Islands. Gut. 2020:gutjnl-2020-322200. Epub ahead of print.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) Estándares de rendimiento para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. 30a ed. CLSI; Wayne, PA, EE. UU.: 2020.

D

- Dai, J.; Mumper, R.J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* **2010**, *15*, 7313-7352. https://doi.org/10.3390/molecules15107313.
- Díaz-Gómez R., López-Solís R., Obreque-Slier E., Toledo-Araya H. Efecto antibacteriano comparativo del ácido gálico y la catequina contra *Helicobacter pylori* - Ciencia de los Alimentos. 2013. 54, 331–335. 10.1016/en.lwt.2013.07.012
- De Falco M, Lucariello A, Iaquito S, Esposito V, Guerra G, De Luca A. Molecular mechanisms of *Helicobacter pylori* patogénesis. J Cell Physiol 2015; 29:1702-7.
- Dixon, M. Pathology of Gastritis and Peptic Ulceration. In H.L.T. Mobley, G.L. Mendz, and S.L. Hazell (eds), *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. ASM press, Washington, D.C. 2001: 459- 469.
- Dyrda G., Boniewska-Bernacka E., Man D., Barchiewicz K., S. El efecto de los disolventes orgánicos sobre microorganismos seleccionados y membrana de liposoma modelo. 2019;46(3):3225–3232. doi: 10.1007/s11033-019-04782-y.

E

- Escobedo-Hinojosa, W. I.; Díaz del Carpio., J.; Palacios-Espinosa, J. F.; Romero, I. Contribution to the Ethnopharmacological and Anti-*Helicobacter pylori* Knowledge of *Cyrtocarpa procera* Kunth (Anacardiaceae). J. Ethnopharmacol. 2012, 143, 363-371.
- Escobedo-Hinojosa WI, Gomez-Chang E, García-Martínez K, Guerrero Alquicira R, Cardoso-Taketa A, Romero I. Gastroprotective Mechanism and Ulcer Resolution Effect of *Cyrtocarpa procera* Methanolic Extract on Ethanol-Induced Gastric Injury. Evid Based Complement Alternat Med. 2018 Jan 9;2018:2862706. DOI: 10.1155/2018/2862706. PMID: 29507589.

F

- Fathima A., Rao J. R. Toxicidad selectiva de catequina-un flavonoide natural hacia las bacterias. Appl. Microbiol. Biotecnol, 2016. 100, 6395–6402. 10.1007/s00253-016-7492-x
- Fried, B., & Sherma, J. *Thin-Layer Chromatography: Techniques and Applications*. CRC press, 2018. Pp 471
- Ford AC, Yuan Y, Moayyedi P. eradication therapy to prevent gastric cancer: systematic review and meta analysis. Gut. 2020; 69: 2113-21. 31.
- Flores-Fernández JM, Padilla-Camberos E, Fernández-Flores O, Diaz-Martínez NE, Barragán-Álvarez CP, Ramírez-Rodríguez PB. Gastroprotective activity and pharmacological safety evaluation of *Eupatorium aschenbornianum*. Exp Ther Med. 2019 Dec;18(6):4467-4472. doi: 10.3892/etm.2019.8093. 2019 Oct 10. PMID: 31777549; PMCID: PMC6862456.

G

- García-Alonso G, Monroy-Noyola A, Contreras-Arellano A, Mariscal-Durand JF, Gálvez-Molina Y, Vázquez-Velázquez A, García-Jimenez S, Nuñez P, Cardoso-Taketa A, Villarreal ML. Preclinical evaluation of anti-*Helicobacter* spp. activity of *Hippocratea celastroides* Kunth and its acute and sub-acute toxicity. BMC Complement Altern Med. 2016 Nov 8; 16(1):445. doi: 10.1186/s12906-016-1412-6. PMID: 27825331; PMCID: PMC5101718

- García, B.I. Estudio etnobotánico de las cortezas medicionales del estado de Morelos y zonas limítrofes con Puebla y Guerrero. Tesis. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos. 1992; 96 p.
- Greenberg E Robert, Garnet L Anderson, Douglas R Morgan, Javier Torres, William D Chey, Luis Eduardo Bravo, Ricardo L Dominguez, Catterina Ferreccio, Rolando Herrero, Eduardo C Lazcano-Ponce, María Mercedes Meza-Montenegro, Rodolfo Peña, Edgar M Peña, Eduardo Salazar-Martínez, Pelayo Correa, María Elena Martínez, Manuel Valdivieso, Gary E Goodman, John J Crowley, Laurence H Baker. Terapias triples de 14 días, concomitantes de 5 días y secuenciales de 10 días para la infección *por Helicobacter pylori* en siete sitios de América Latina: un ensayo aleatorizado.2011. The Lancet,Volume 378, Issue 9790 ,Pages 507-514.
- Goh K-L. Lecciones aprendidas de la epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori* en Malasia: JGHF Marshall and Warren. J Gastroenterol Hepatol. 2018; 33 (6):1177-84.
- Goodman KJ, Correa P. Transmission of *Helicobacter pylori* among siblings. Lancet. 2000 Jan 29;355(9201):358-62. DOI: 10.1016/S0140-6736(99)05273-3. PMID: 10665555.
- Goodwin, C. S., J. A. Armstrong, T. Chilvers, M. Peters, M. D. Colins, L. Sly, W. McConnell, and W. E. S. Harper. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. Int. J. Syst. Bacteriol. 1989; 39:397–405.

H

- Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. J Gastroenterol. 2009; 44(4):239-48. DOI: 10.1007/s00535-009-0014-1. Epub 2009 Mar 7. PMID: 19271114.
- Hernández Guiance, S. N; Marino, L; Isern, D. M; Coria, I. D.; Irurzun, I. Flavonoides: aplicaciones medicinales e industriales. Facultad de Química, Universidad Del Centro Educativo Latinoamericano. Instituto de Física de Rosario, CCT-CONICET. Instituto de Investugaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas – CONICET. 2019; 1-17.
- Hersch-Martínez, P. Commercialization of medicinal plants from southwest Puebla, Mexico. Economic Botany. 1995; 49: 197-206.
- Hon DNS, Shiraishi N. Wood and Cellulosic Chemistry. Marcel Dekker Inc. 2001.
- Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, et al. Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis. Gastroenterology. 2017 1;153(2):420-9

I

- Ishijima N, Suzuki M, Ashida H, Ichikawa Y, Kanegae Y, Saito I, Borén T, Haas R, Sasakawa C, Mimuro H. BabA-mediated adherence is a potentiator of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system activity. J Biol Chem. 2011 Jul 15;286(28):25256-64. DOI: 10.1074/jbc.M111.233601. Epub 2011 May 19. PMID: 21596743; PMCID: PMC3137096.

J

- Jones KR, Whitmire JM, Merrell DS. A Tale of Two Toxins: *Helicobacter Pylori* CagA and VacA Modulate Host Pathways that Impact Disease. Front Microbiol. 2010 Nov 23;1:115. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00115. PMID: 21687723; PMCID: PMC3109773.

K

- Kaur, K.; Asthir, B.; Verma, D.K. Biosynthesis, bioavailability, and metabolism of plant polyphenols: Biological activities and their potential benefits inhuman health. In *Phytochemicals in Food and Health: Perspectives for Research and Technological Development*, 1st ed.; Verma, D.K., Thakur, M., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2021; pp. 233–258.
- Kew, 2024. Royal Botanic Gardens. Plants of the wold online. https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:69514-1#higher-classification

- Khean G, WahCh, Seiji Sh, Yoshio Y. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection and Public Health Implications. Blackwell Publishing Ltd. 2015;16(1):1-9.
- Khoo, H.E., Azlan, A., Tang, S.T., Lim, S.M. 2017, Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits, *Food & nutrition research, 61*(1), 1361779, DOI: https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. Robbins and Contran Pathologic basis of disease. Seventh Edition. 2005; Elsevier Saunders: 810-827.
- Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Rev. 2006 Jul; 19(3):449-90. doi: 10.1128/CMR.00054-05. PMID: 16847081; PMCID: PMC1539101.

L

- Ladrón de Guevara, L. Bornstein-Quevedo, S. González-Huezo, et al. Erradicación de *Helicobacter pylori* en México con un esquema basado en levofloxacina versus la triple terapia estándar: resultados de un estudio clínico de fase, abierto, aleatorizado, de no inferioridad. Rev Gastroenterol Mex. 2018.
- Leguizamón, G., A. González-León y R. Báez-Sañudo. Antocianinas en uva (*Vitis vinifera L*.) y su relación con el color. Revista Fitotecnia Mexicana. 2005; 28: 359-368.
- Limón Daniel, Alfonso Díaz, Liliana Mendieta, Félix Luna, Edgar Zenteno y Jorge Guevara. Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. Laboratorio de Neurofarmacología, Facultad de Ciencias Químicas BUAP 2 Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. 2010; p 1-13.

M

- Mabe KYamada M, Oguni YO, Takahashi T. Actividades In Vitro e In Vivo de las Catequinas del Té contra *Helicobacter pylori*. Agentes Antimicrobianos. 1999. https://doi.org/10.1128/aac.43.7.1788
- Magalhães A, Reis CA. Helicobacter pylori adhesion to gastric epithelial cells is mediated by glycan receptors. Braz J Med Biol Res. 2010 Jul; 43(7):611-8. DOI: 10.1590/s0100-879x2010007500049. Epub 2010 Jun 7. PMID: 20521012
- Malaty, H.M., Graham, D.Y. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. 1994; 35:742-745.
- Maldonado, A. B. J. Aprovechamiento de los recursos florísticos de la Sierre de Huahutla, Morelos, México. Tesis de Maestría en Ciencias (Biológicas). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.1997; 149 p.
- Malfertheiner P. The intriguing relationship of *Helicobacter pylori* infection and acid secretion in peptic ulcer disease and gastric cancer. Dig Dis., 29 2011; pp. 459-464 http://dx.doi.org/10.1159/000332213
- Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon AT, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. Gut. 2017;66:6-30
- Malfertheiner P, Megraud F. Management of *Helicobacter pylori* infection the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. 2012; 66(1). Disponible en: https://gut.bmj.com/content/66/1/6
- Martínez-Elizalde, K. S., Rodríguez-Monroy, M. A., Flores, C. M., Hernandez-Portilla, L. B., Barbosa-Cabrera, E., & Canales-Martinez, M. Comparison of Biological Properties of Two Medicinal Extracts of the Tehuacan-Cuicatlan Valley. EvidenceBased Complementary and Alternative Medicine, 2018.
- Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñon MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr Hosp 2002; 17(6): 271-278.
- Marshall, B.J. & Warren, J.P. Unidentified curved bacilli in the stomach patients with gastritis and peptic ulceration. 1984; Lancet 1, 1311-1315.

- Mitchell, H. Epidemiology of Infection. In: *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. (Eds. Mobley, H.L.T., Mendz, G.L. y Hazell, S.L.) ASM Press Washington: 2001; 7-18.
- Mottaghipisheh J, Iriti M. Sephadex® LH-20, Isolation, and Purification of Flavonoids from Plant Species: A Comprehensive Review. Molecules. 2020 Sep 10;25(18):4146. doi: 10.3390/molecules25184146. PMID: 32927822; PMCID: PMC7570886.

N

- Navarrete, A.; Sánchez-Mendoza, ME; Arrieta, J.; Cruz-Antonio, L.; Oliva, I.; Castañeda-Hernández, G. Gastroprotección y efecto de la administración simultánea de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) sobre la farmacocinética y actividad antiinflamatoria del diclofenaco en ratas. J. Pharm. Farmacol. 2005, 57, 1629–1636.
- Nyström J, Svennerholm AM. Oral immunization with HpaA affords therapeutic protective immunity against *H. pylori* that is reflected by specific mucosal immune responses. Vaccine. 2007 Mar 30; 25(14):2591-8. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.12.026. Epub 2006 Dec 26. PMID: 17239498.
- Newman, D. J., Cragg, G. M. Natural Products as sources of new drugs over the last 25 years. Journal of natural products. 2007; 70: 461-477.
- Newman y Cragg, G. M. Los productos naturales como fuentes de nuevos fármacos durante los 30 años desde 1981 hasta 2010. 2012.

O

- Ohsugi M, Basnet P, Kadota S, et al. Traditional Medicines. 1997; 14: 186-91.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS), 2021. https://www.paho.org/es/noticias/8-3-2021-erradicar-infeccion-por-helicobacter-pylori-es-todo-reto-local-mundial
- Organización Mundial de Gastroenterología (OMG) 2021. Directrices mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología. *Helicobacter pylori.*
- Orozco Martínez, J. Estudio comparativo de algunas actividades biológicas de las cortezas de Ceiba aesculifolia subsp. parvifolia, Juliania abstringents y *Cyrtocarpa procera* de San Rafael, Coxcatlan, Puebla. Tesis UNAM. 2010.
- Owczarek, A., Kłys, A., & Olszewska, M. A. A validated 1H qNMR method for direct and simultaneous quantification of esculin, fraxin and (–)-epicatechin in *Hippocastani cortex*. *Talanta*, 2019. 192, 263-269.

P

- Palacios-Espinosa F., Escobedo-Hinojosa W. y Romero I. Panorama Actual del estudio de las plantas con actividad anti-*H. pylori*. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 2011; 14:51-61.
- Pan H, Wang Y, Xu X, Qian Z, Cheng H, Ye X, Chen S. Simultaneous Extraction and Depolymerization of Condensed Tannins from Chinese Bayberry Leaves for Improved Bioavailability and Antioxidant Activity. J Agric Food Chem. 2021 Sep 29;69(38):11292-11302. DOI: 10.1021/acs.jafc.1c03962. Epub 2021 Sep 17. PMID: 34533948.
- Park, CH; Hijo, HU; Yoo, CY; Lee, SH La fracción de gel de bajo peso molecular de Aloe vera exhibe gastroprotección al inducir la actividad inhibidora de la matriz metaloproteinasa-9 en tejidos de lesión gástrica aguda inducida por alcohol. 2017.
- Patwardhan, B.; W. Dnyaneshwar; P. Pushpangadan; N. Bhatt. “Advance Access” Publication 27, e CAM 2 (4) 465–473. DOI:10.1093/ecam/neh140 Review- Ayurveda and Traditional Chinese Medicine: A Comparative Overview. 2005.
- Pizzi M, Saraggi D, Fassan M, et al. Secondary prevention of epidemic gastric cancer in the model of *Helicobacter pylori* associated gastritis. Dig Dis. 2014;32:265-74
- Prabhu, S.; Molath, A.; Choksi, H.; Kumar, S.; Mehra, R. Classifications of polyphenols and their potential application in human health and diseases. *Int. J. Physiol. Nutr. Phys. Educ.* 2021, *6*, 293–301.

R

- Ramos Adame Mónica, Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa, Irma Romero Álvarez. TESIS: Aislamiento, identificación y cuantificación de compuestos de tipo catequinas de extractos de la corteza de *Cyrtocarpa procera* Kunth. 2021.

- Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Eshagh Hosseini M, Atherton JC. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. Gastroenterology. 2007 Sep;133(3):926-36. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.06.056. Epub 2007 Jul 3. PMID: 17854597.
- Rodríguez-Canales, M., Martínez-Galero, E., Nava-Torres, A. D., Sanchez-Torres, L. E., Garduño-Siciliano, L., Canales-Martínez, M. M. & Rodríguez-Monroy, M. A. Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of the Methanolic Extract of *Cyrtocarpa procera* Bark Reduces the Severity of Ulcerative Colitis in a Chemically Induced Colitis Model. Mediators of Inflammation, 2020.
- Rodríguez-López, V., Aguirre-Crespo, F., Salazar, L., & Estrada-Soto, S. Identification of fatty acid esters and hydrocarbon derivatives from *Cyrtocarpa procera* Kunth by GC–MS. Natural product research. 2006; 20(1), 1-7.
- Rosas-Acevedo, H., Terrazas, T., González-Trujano, M. E., Guzmán, Y., & Soto- 107 Hernández, M. Anti-ulcer activity of *Cyrtocarpa procera* analogous to that of *Amphipterygium adstringens*, both assayed on the experimental gastric injury in rats. Journal of Ethnopharmacology. 2011; 134(1), 67-73.

S

- Saleem, H., Htar, T. T., Naidu, R., Anwar, S., Zengin, G., Locatelli, M., & Ahemad, N. HPLC–PDA polyphenolic quantification, UHPLC–MS secondary metabolite composition, and in vitro enzyme inhibition potential of Bougainvillea glabra. 2020, 9(3), 388.
- Samil A, Alma MH, Acemioğlu B. Journal of Applied Polymer Science, 2005; 98, 2450.
- Sinsinwar S., Vadivel V. La catequina aislada de la cáscara de anacardo exhibe actividad antibacteriana contra aislados clínicos de MRSA a través del estrés oxidativo mediado por ROS. 2020. Appl. 104, 8279–8297. 10.1007/s00253-020-10853-z
- Sonnenberg, R.H. Lash, R.M. Genta. A national study of *Helicobacter pylori* infection in gastric biopsy specimens. Gastroenterology, 2010, 139, pp. 1894-1901 http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2010.08.018
- Soto-García, Marcela, & Rosales-Castro, Martha. Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de Pinus durangensis y Quercus sideroxyla, 2016. *Maderas. Ciencia y tecnología*, *18*(4), 701-714. Epub 00 de de 2016.https://dx.doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000061

T

- Takabayashi, F., Harada, N., Yamada, M. *et al.* Efecto inhibidor de las catequinas del té verde en combinación con sucralfato sobre *Helicobacter pylori* infección en jerbos mongoles. *J Gastroenterol* **39**61–63. 2004. https://doi.org/10.1007/s00535-003-1246-0
- Tohidpour A. CagA-mediated pathogenesis of *Helicobacter pylori*. Microb Pathog. 2016 Apr;93:44-55. DOI: 10.1016/j.micpath.2016.01.005. Epub 2016 Jan 12. PMID: 26796299.
- Torres J, Lopez L, Lazcano E, Camorlinga M, Flores L, Muñoz O. Trends in *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Mexico. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005 Aug;14(8):1874-7. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0113. PMID: 16103429.
- Torres Jiménez F,Torres Bayona C. Fisiopatología molecular en la infección por *Helicobacter pylori*. Salud Uninorte. 2016;32(3):500-12. Disponible en: https://www.redalyc.org/pdf/817/81750089012.pdf.
- Tsimogiannis, D.; Oreopoulou, V. Clasificación de compuestos fenólicos en plantas. En *Polifenoles en Plantas: Aislamiento, Purificación y Preparación del Extracto*2a ed.; Watson, 2019; pp. 263–281.
- Thuille, N. "Bactericidal activity of herbal extracts." INt. J. Hyg. Environ. Health. 2003; 206: 1-5.

W

- Wagner, H., & Bladt, S. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer Science & Business Media. 1996.

- Wannmacher, L. Review of the evidence for *H. pylori* treatment regimens. In Technical report series. pp. 33. Report of 18th expert committee on the selection and use of essential medicines. (WHO, 2011).
- WGO, 2021. Directrices mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología. *H. pylori.*

Y

- Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. 2000 Jun 20;97(13):7533-8. DOI: 10.1073/pnas.130079797. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A 2000 Sep 26;97(20):11133. PMID: 10852959; PMCID: PMC16580.
- Yamaoka Y, Ojo O, Fujimoto S, Odenbreit S, Haas R, Gutierrez O, El-Zimaity HM, Reddy R, Arnqvist A, Graham DY. *Helicobacter pylori* proteínas de la membrana externa y enfermedad gastroduodenal. Tripa. 2006 Junio; 55(6):775-81. DOI: 10.1136/gut.2005.083014. Epub 2005 Diciembre 1. PMID: 16322107; PMCID: PMC1856239.
- Yamaoka Y. Increasing evidence of the role of *Helicobacter pylori* SabA in the pathogenesis of gastroduodenal disease. J Infect Dev Ctries. 2008 Jun 1;2(3):174-81. DOI: 10.3855/jidc.259. PMID: 19738347; PMCID: PMC2833341.
- Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-related gastroduodenal diseases from molecular epidemiological studies. Gastroenterol Res Pract. 2012; 2012: 371503.
- Yokota S, Ohnishi T, Muroi M, Tanamoto K, Fujii N, Amano K. Highly-purified *Helicobacter pylori* LPS preparations induce weak inflammatory reactions and utilize Toll-like receptor 2 complex but not Toll-like receptor 4 complex. 2007; 51: 140-148.

Z

- Zhang, L.; Han, Z.; Granato, D. Polyphenols in foods: Classification, methods of identification, and nutritional aspects in human health. In *Advances in Food and Nutrition Research Series 98: Application of Polyphenols in Foods and Food Models*, 2021; pp. 1–33.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos, a 13 de mayo del 2025.

VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Los integrantes de la Comisión Revisora de la tesis titulada: **Evaluación de la actividad anti-***Helicobacter pylori* **de compuestos fenólicos de** *Cyrtocarpa procera* **Kunth,** que presenta la **C. Miriam Merino Rodríguez**, del Programa de Posgrado Maestría en Biotecnología, bajo la dirección del DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA y codirección de la DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ, han determinado que el documento reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado, por lo que emiten su **VOTO APROBATORIO.**

Comisión Revisora de tesis (firma electrónica)

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA (director de tesis, CEIB UAEM)

DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ (codirectora de tesis, FF UAEM)

DRA. ERIKA GOMEZ CHANG (UNAM)

DRA. IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO (CEIB UAEM)

DR. FERNANDO CUEVAS REMIGIO (CEIB UAEM)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

FERNANDO CUEVAS REMIGIO | Fecha:2025-05-13 14:34:53 | FIRMANTE

qmFlp7EhfEuxEHpzRri5OZd9AT663XhAFdCW6G+O3oDtbOJG7afQPU819QRmdoYJlVrUaTp3dLkCtCeJa7yxTdWs0ejA56QfAsVJIGFIoF8MVhYlcu06jljrxXlHbMZBm49bzvOWg
GDxabIhzE7dNKniLa8/tDBvuTtDn4F9YCx8nWIIRaDc+JW9P9r30pK6kBchB0Nn9jdI7ao5Pef9aoRZkAr//izpUlLI9LawNX5pCpERCT6JdM2Nc9rAXRGPGlcU7Z1WEPYXPibhRvfw
psAydX68vpnb4R9WnUhhHvk3YHkldAGkZU50AS8V1hdEroFHowwwSpHECWug++LyyA==

ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2025-05-15 13:46:10 | FIRMANTE

fgFYJk2TnOzbxN+z33qLMlk0ApJbBYRSO4P6C5jPXHblWphUx160eCHcQ1GS1WI1wiyFEc+XXtiZTlQYqxUmme2l383rWOt78T5jmEVX1GJIa9taUWcHmKbUEUpWB78gnnB9q
/yy0GinNst93vkF5jrcxlQ3uTqTOsKcULdxNDy+nUa1doLfNtGpwIkRLrgu7+qZ6OHx7iZ1pFWrC6k8+F01J5TjF8PHDaLWs1d+qd/CUYijWPikJ4agnFNvZVLUjsF6q+xd7XbMEzX+5
bb0kVx1ZavFryui1rWkb4bD1k000a9mcHp+o6P7+qTtkG5/ZD7YkZWM+LlJSK6Ikl/f6g==

IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO | Fecha:2025-05-15 18:53:33 | FIRMANTE

mHDADIjPn2d7SZFA++IsQz6+F/SKK0MpJ0+l40nDcezyaWfF7xrdr0+RfKqhScgxGgNrIZgV6amE9wDaPnKQFsGFT0jh0gP8dut/9fFZDAGkfdMac3Ho9g0C8X25T1zLrGy1WsCyc
sXGWDK9rT5UooT2J6+ue5FMhpD3P7ePCLJtNv+lQ5V03ySP2NCKn/2mcj5kAoTolb107N51O+81qkpXo6k2LTWxz4lDcleBC0DD8BfnHyosN5cwZWCC2xUR4oAVH6lO3vovWG
j6R7tR5+8Jw0nFzBQ9cf1teSNsEenyMwtbJ5bEoTXArx/7E1vX6KU/sX+wyWWXjSqblQJM0w==

IRMA ROMERO ÁLVAREZ | Fecha:2025-05-15 22:47:48 | FIRMANTE

MjrZuSsjZWkBX/H5+lqdIIN92CC4KICwRrkPLnJzlA0pwf1Ymjs+WBByyYQ1CPOOxc8GO8Y/+6396gnEOb6+uvxqa2aEjVU/yfs6nlOvinBixiM5YlRRqt0x6KynQ2MPMrSiq/+jSDtdY
aukRaTGV4cdZ+Kd/xU0SztAfxDiSnbC71IMx6vE+YbBtULlNtv+3cExNL0LqatNXbuOdmjy+T+x1x07ZKms+p8/MTedW2Uo3D1TKxblL0wmU+PxtWBTlraK6mbOTw+m04/bbsHbyz
3n9m+VeZF9jmGXNsmWAXqciiCI7Jg2YUPXxqGTxbc1aGio0diSHRW3sziK91nBsw==

ERIKA GOMEZ CHANG | Fecha:2025-05-15 22:59:07 | FIRMANTE

U9QqQhSMbLuoTPKWTH6vyaJX8YDAvyS+HMcB7A8a9xWOAkFwzRnZnljqxhag9l7I7vYFMwt9Jc1mPvhIOXpkUpZqb03aDKX2gncaRxXw8Z4KGgcZdIfXP0ijbXbWwvS9J4prK
wA6S/yijF9W5W6JHZVfYGbYMhWhhtMFHuPMQal7eu+XidmZWsOW4qX3CundjvkR9yB8d27cBMc2xQGszqCM1Yi07ZCTqKR8pdAq9LS39qkQMoOC7AUoU9SrWlDc4n+Ekhr
NNjDP6Aw2SZIqjGPkaNy/T28/loJob5kHP9jWmjKYmh9e9N9sU/moDb5siqrefuW64tWOANsgcZUtLQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

MKSRhOBbN

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/3YKgImSVFsBt7K94UPptOOWzKInCgZAY