

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DE EXTRACTOS VEGETALES DE *Ilex guayusa* e *Ilex paraguariensis* FRENTE a *Helicobacter pylori*.**



Pontificia Universidad  
**JAVERIANA**  
Bogotá

**Estudiante.**

Laura Camila Portela Quintero.

Trabajo de grado.

Programa de Bacteriología.

**LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA ESPECIAL**

**GRUPO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

**GRUPO DE INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

**BOGOTÁ**

**2020**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DE EXTRACTOS VEGETALES DE *Ilex guayusa* e *Ilex paraguariensis* FRENTE a *Helicobacter pylori*.**

**Estudiante.**

Laura Camila Portela Quintero.

Trabajo de grado.

Programa de Bacteriología.

**Director.**

Alba Alicia Trespalacios, Bact, MSc., PhD

Departamento de Microbiología

Pontificia Universidad Javeriana

Bogotá D.C., Colombia

**Co-Director**

Geison Modesti Costa, QF, MSc., PhD

Departamento de Química

Pontificia Universidad Javeriana

Bogotá D.C., Colombia

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DE EXTRACTOS VEGETALES DE *Ilex guayusa* e *Ilex paraguariensis* FRENTE a *Helicobacter pylori*.**



LAURA CAMILA PORTELA QUINTERO.

---

Alba Alicia Trespalacios.  
Bact, MSc., PhD  
Directora

---

Claudia Marcela Parra Giraldo  
Bact, MSc., PhD  
Evaluador

---

Geison M. Costa  
MSc., PhD  
Co- director

---

Juliet Angélica Prieto Rodríguez  
PhD  
Evaluador

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA**

### **NOTA DE ADVERTENCIA.**

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

Artículo 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1996

## AGRADECIMIENTOS.

Principalmente a *Dios*, por concederme sabiduría y ciencia para poder enfrentar las dificultades que estamos viviendo y no discernir para llevar a cabo el trabajo.

A *mis padres*, por su amor y su bondad, quienes han forjado mi camino y me han dirigido por el sendero correcto.

A *mi directora Alba Alicia Trespalacios y codirector Geison Modesti Costa*, por abrirme la puerta, creer en mí, viendo mis capacidades y enseñarme que con dedicación, entendimiento y esfuerzo se puede llegar lejos, a pesar de las adversidades consecuencia de la pandemia fue una experiencia muy enriquecedora en mi camino profesional.

A *Sebastián Castañeda, Carmen Acosta y Daniela Cualla*, quienes estuvieron siempre presentes guiándome en el camino, y contribuyeron con su conocimiento y ayuda para la elaboración del trabajo, muchas gracias.

Infinitas gracias a todos los que contribuyeron en este trabajo.

## ÍNDICE GENERAL.

1. Resumen.....	10
2. Introducción.....	12
3. Planteamiento del problema .....	13
4. Justificación.....	14
5. Marco teórico .....	15
5.1. <i>Helicobacter pylori</i> .....	15
5.2. Plantas medicinales con actividad antimicrobiana.....	17
5.3. Género <i>Ilex</i> .....	18
6. Objetivos.....	21
6.1. Objetivo general.....	21
6.2. Objetivos específicos .....	21
7. Metodología.....	22
7.1. Material vegetal.....	22
7.2. Obtención de los extractos.....	22
7.3. Cepas bacterianas.....	23
7.4. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales las especies <i>Ilex guayusa</i> e <i>Ilex paraguariensis</i> frente a <i>H. pylori</i> .....	24
7.5. Análisis cualitativo de los extractos vegetales de <i>Ilex guayusa</i> e <i>Ilex paraguariensis</i> por medio de Cromatografía en Capa Delgada (CCD).....	26
8. Resultados/Discusión.....	27
8.1. Obtención de los extractos.....	27
8.2. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales las especies <i>Ilex guayusa</i> e <i>Ilex paraguariensis</i> frente a <i>H. pylori</i> .....	27
8.3. Análisis cualitativo de los extractos vegetales de <i>Ilex guayusa</i> e <i>Ilex paraguariensis</i> por medio de Cromatografía en Capa Delgada (CCD).....	31

9. Conclusiones.....	36
10.Recomendaciones.....	37
11.Bibliografía.....	38

## ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1.....	19
Tabla 2.....	20
Tabla 3.....	28
Tabla 4.....	29

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.....	28
Figura 2.....	30
Figura 3.....	30
Figura 4.....	31
Figura 5.....	32
Figura 6.....	33

## RESUMEN.

*Helicobacter pylori* es una bacteria capaz de colonizar la mucosa gástrica de los humanos produciendo gastritis crónica en todos los infectados, y a úlcera péptica en 10-15 % de los casos, cáncer gástrico en 1 a 2% de los infectados y linfoma gástrico tipo MALT en 1 de cada 100000. La prevalencia de *H. pylori* en los países industrializados oscila entre 20-50%, y en los países en desarrollo de 70 – 80%. Se ha encontrado que la mejor estrategia para reducir la incidencia de cáncer gástrico, una de las patologías asociadas con la infección, es la erradicación de la infección por *H. pylori*. El tratamiento actual para la erradicación de la infección por *H. pylori* es el uso de terapias de primera línea, que combina dos antibióticos con un inhibidor de bombas de protones. En los últimos años la eficacia de estas terapias ha disminuido especialmente por causa de la resistencia de la bacteria a los antibióticos usados en las terapias de erradicación de la infección, por este motivo es de suma importancia encontrar nuevas alternativas terapéuticas.

Teniendo en cuenta esta problemática y las implicaciones que tiene la infección por *H. pylori* en el desarrollo de cáncer gástrico, los productos naturales pueden ser una fuente potencial de nuevos agentes antimicrobianos. Por esta razón, este trabajo evaluó la actividad antimicrobiana de diferentes extractos de *Ilex guayusa* e *Ilex paraguariensis*, frente a cepas de referencia de *H. pylori*. Se evaluaron diferentes concentraciones de extractos acuosos y etanólicos de las plantas en estudio mediante dilución en agar. Los extractos hidroetanólicos y acuosos de *I. guayusa* a concentraciones de 1000 ug/mL presentaron actividad anti *H. pylori*. Los extractos obtenidos por maceración etanólica de *I. paraguariensis* tuvieron la mejor actividad frente a *H. pylori* a una concentración de 500 µg / mL, mientras los extractos acuosos de esta especie no mostraron actividad antimicrobiana frente a *H. pylori*. Los análisis cromatográficos de los extractos de *I. guayusa* presentaron varias manchas referentes a compuestos fenólicos. En *I. paraguariensis* se observó una mayor complejidad con relación al perfil de compuestos fenólicos y también se evidenció la presencia de ácido cafeico y cafeína en su composición. Se observan saponinas en ambas especies, sin embargo, en *I. paraguariensis* se aprecia una mayor riqueza de estas.

## SUMMARY.

*Helicobacter pylori* is a bacterium capable of colonizing the gastric mucosa of humans, producing chronic gastritis in all those infected, and a peptic ulcer in 10-15% of cases, gastric cancer in 1 to 2% of those infected, and gastric lymphoma type MALT in 1 in 100,000. The prevalence of *H. pylori* in industrialized countries ranges from 20-50%, and in developing countries from 70-80%. It has been found that the best strategy to reduce the incidence of gastric cancer, one of the pathologies associated with infection, is the eradication of *H. pylori* infection. The current treatment for eradication of *H. pylori* infection is the use of first-line therapies, which combines two antibiotics with a proton pump inhibitor. In recent years, the efficacy of these therapies has decreased, especially due to the resistance of the bacteria to antibiotics used in infection eradication therapies, for this reason it is of utmost importance to find new therapeutic alternatives.

Given these issues and the implications of *H. pylori* infection in the development of gastric cancer, natural products can be a potential source of new antimicrobial agents. For this reason, this work evaluated the antimicrobial activity of different extracts of *Ilex guayusa* and *Ilex paraguariensis*, against *H. pylori* reference strains. Different concentrations of aqueous and ethanolic extracts of the plants under study were evaluated by agar dilution. Hydroethanolic and aqueous extracts of *I. guayusa* at concentrations of 1000 ug / mL showed anti *H. pylori* activity. The extracts obtained by ethanolic maceration of *I. paraguariensis* had the best activity against *H. pylori* at a concentration of 500 µg / mL, while the aqueous extracts of this species did not show antimicrobial activity against *H. pylori*. Chromatographic analyzes of the extracts of *I. guayusa* showed several spots referring to phenolic compounds. In *I. paraguariensis* a greater complexity was observed in relation to the phenolic compound profile and the presence of caffeic acid and caffeine in its composition was also evidenced. Saponins are observed in both species, however, in *I. paraguariensis* a greater richness of these is observed.

## INTRODUCCIÓN.

Durante siglos, se ha asociado la utilización de productos vegetales en la medicina popular debido a sus reconocidos atributos en la salud, pero inicialmente sin alguna evidencia científica, simplemente basadas en la tradición y conocimientos populares. En los últimos siglos, el uso de las plantas medicinales vino a motivar el interés investigativo. Se han estudiado cada vez más las propiedades bioactivas que se le atribuyen a dichas plantas gracias a sus menores costos, alta efectividad, biodisponibilidad y pocos efectos adversos. En especial, los efectos antimicrobianos de múltiples especies, que se han confirmado en estudios *in vitro* e *in vivo*. De hecho, un gran porcentaje (aprox. 40%) de las moléculas activas utilizadas en la terapia se derivan de moléculas bioactivas extraídas o basadas plantas medicinales. (1)(2)(3)

Entre las múltiples infecciones que aquejan al hombre, se encuentra la infección por *Helicobacter pylori*, la bacteria es el principal agente etiológico de enfermedades gastroduodenales, como la gastritis crónica, la úlcera péptica y el cáncer gástrico (4). Siendo catalogada como carcinógeno tipo I por La Organización Mundial de la Salud (5). Se estima que más del 80% de la población mundial se encuentra infectada por *H. pylori* (4) y en Colombia más del 60% de los adultos se encuentran infectados por esta bacteria (6). La terapia de erradicación de la infección por *H. pylori* ha disminuido su eficacia debido a la resistencia a los antibióticos empleados (7) y baja adherencia al tratamiento por efectos adversos (8). Por lo tanto, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para la erradicación de la infección por *H. pylori*, ha tomado importancia en los últimos años (5), además de ser una estrategia para reducir la incidencia de cáncer gástrico (9). Una de las alternativas terapéuticas que han sido estudiadas es el uso de productos naturales que han demostrado actividad antibacteriana contra *H. pylori* (10)(2)(1)(11).

Entre las plantas de amplio uso para tratar trastornos gastrointestinales están las especies *Ilex guayusa* e *Ilex paraguariensis*, las cuales son tradicionalmente usadas por su capacidad estimulante y depurativo del sistema digestivo (1)(12)(13) y por sus propiedades antioxidantes (14). En este contexto, este trabajo evaluó la actividad antimicrobiana de algunos extractos obtenidos de las especies *I. guayusa* e *I. paraguariensis* frente a *H. pylori* por el método de dilución en agar, de acuerdo con las directrices del CLSI (15).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La infección por *H. pylori* afecta el 80% de la población de los países en vía de desarrollo (4), situación que se atribuye a las malas condiciones sanitarias existentes en estas sociedades y que condicionan la exposición frecuente al patógeno (16). *H. pylori* es el principal agente etiológico de gastritis crónica, y en el 20% de los casos, la infección puede desencadenar una variedad de enfermedades graves, incluyendo las úlceras pépticas y cáncer gástrico (17). El cáncer gástrico es una enfermedad maligna considerada como el cáncer más frecuente de los países en vías de desarrollo y una de las primeras causas de mortalidad con más de 700.000 muertes anuales (18). En Colombia, el cáncer gástrico es la primera causa de muerte por cáncer en hombres y la tercera en mujeres (19)(6). El principal tipo de cáncer gástrico es el adenocarcinoma, que comprende dos variedades histológicas: el intestinal (CGI), que es la variante más frecuente y el tipo difuso (CGD). El primero se asocia fuertemente a *H. pylori* y a factores ambientales, como el consumo de tabaco y la dieta (19).

En Colombia más del 60% de los adultos se encuentran infectados por *H. pylori* (19) y la infección generalmente se adquiere en la niñez, pero el diagnóstico de cáncer gástrico, cuando ocurre, es más común después de la sexta década de vida (20)(6). El 90% de los casos de adenocarcinoma gástrico están relacionados con la infección por *H. pylori* en donde también intervienen factores genéticos del individuo y estilos de vida que incluyen la dieta, consumo de alcohol y fumar (1) (17). Por lo tanto, la erradicación de la infección es una de las estrategias que actualmente los consensos mundiales de gastroenterología postulan para la prevención de adenocarcinoma gástrico (21). En los últimos años el tratamiento recomendado para su erradicación, como esquema de primera línea, es la triple terapia estándar, constituida por un inhibidor de la bomba de protones, amoxicilina y claritromicina o metronidazol (7)(22)(23). Pero la eficacia de los tratamientos de primera línea comúnmente empleados es inferior al 80 %, debido especialmente a la resistencia primaria de la bacteria a metronidazol, claritromicina y levofloxacina, ocasionando un desafío en la erradicación de *H. pylori* (22)(24)(25).

## JUSTIFICACIÓN.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) emitió en febrero de 2017, una publicación para promover la investigación y el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para los gérmenes multirresistentes y clasificó a *H. pylori* como una bacteria de alta prioridad (5). Por lo tanto, existe la necesidad de buscar nuevos fármacos con actividad antibacteriana, siendo los productos naturales fuentes potenciales para encontrar nuevas moléculas con capacidad antibiótica (1)(26)(2), es aquí donde el género *Ilex* toma importancia.

En Latinoamérica se reconocen 17 especies del género *Ilex*, donde en las últimas décadas *I. paraguariensis*, más conocida como yerba mate, se destaca siendo un producto ampliamente utilizado de manera de bebida tradicional, y también por las propiedades benéficas que se vienen atribuyendo a esta planta, tales como: antioxidante, antiinflamatorio, antitumoral y en la reducción de peso (27).

Diferentes investigaciones han revelado el potencial antimicrobiano de *I. paraguariensis*, cuyo espectro de acción incluye bacterias Grampositivas y Gramnegativas. Dentro de los cuales se encontró actividad antimicrobiana de un extracto etanólico de hojas de *I. paraguariensis* frente a *H. pylori*. (1)(12)(28). A su vez, en Colombia la especie de este género que se destaca es *I. guayusa* comúnmente conocida como “guayusa” siendo utilizada para consumo humano, ya que se le atribuyen propiedades estimulantes del sistema nervioso y digestivo en la medicina tradicional. (29)

Teniendo en cuenta las altas tasas de resistencia de *H. pylori* a los antimicrobianos, que han conllevado a la disminución de la eficacia de las terapias de erradicación y la asociación de *H. pylori* con el desarrollo de cáncer gástrico (17), en este trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de las especies *I. guayusa* y *I. paraguariensis* frente a *H. pylori* como una estrategia para la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que puedan, a futuro, ser utilizadas para el tratamiento de la infección.

Con lo expuesto anteriormente, en este trabajo se planteó la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es la actividad antimicrobiana *in vitro* de algunos extractos vegetales de las especies *I. guayusa* e *I. paraguariensis* frente a *Helicobacter pylori*?

Este trabajo se realizó en conjunto con el Grupo de Enfermedades Infecciosas GEI y el Grupo de Investigación Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana.

## MARCO TEÓRICO.

### 1. *Helicobacter pylori*

En 1982, los investigadores J. Robin Warren y Barry Marshall en Australia aislaron por primera vez *H. pylori* en muestras de biopsias gástricas de pacientes con gastritis crónica y úlceras pépticas. Barry Marshall confirmó mediante los postulados de Koch que *H. pylori* era la principal causa de patologías gástricas. (4)(30)

*H. pylori* es una bacteria Gramnegativa, microaerofílica, flagelado con forma de bacilo espiral. Su característica bioquímica más importante es la ureasa, considerablemente más potente que en otras bacterias. Tiene otras dos enzimas muy útiles para su identificación cuando crece en medios de cultivo que son la oxidasa y la catalasa. Es capaz de habitar en el epitelio gástrico humano.(4) Por su forma de espiral puede atravesar la capa de moco que recubre el epitelio gástrico y colonizarlo, causando una interrupción en el revestimiento protector del estómago. Su capacidad de sobrevivir en el ambiente gástrico se explica por la producción de la enzima ureasa que transforma la urea en amoníaco y en dióxido de carbono; el amoníaco que neutraliza el pH gástrico promoviendo la atrofia del epitelio y la carcinogénesis. (31)

*H. pylori* es una bacteria que infecta a más de la mitad de la población mundial (22) y sus principales vías de transmisión son oral – oral y fecal – oral, que, en ausencia de un tratamiento basado en antibióticos, puede persistir durante toda la vida. En la mayoría de los casos, se adquiere en la infancia y a menudo persiste en la edad adulta, ya que el sistema inmune es incapaz de erradicarla (4)(31).

La infección por *H. pylori* puede cursar sintomática o asintomática, se estima que más del 70 % de las infecciones son asintomáticas (32). En todos los pacientes infectados la bacteria produce gastritis crónica que, en algunos pacientes, entre el 10-20% avanza a úlcera duodenal, 1 a 2% a cáncer gástrico y 1 de cada 100000 casos puede evolucionar a linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) y cáncer gástrico. (33)

El desarrollo de estas patologías asociadas a la infección depende de factores genéticos del huésped, factores ambientales como el estilo de vida que incluyen el tabaquismo, consumo excesivo de alcohol, bajo consumo de frutas y verduras y alto contenido de sal se encuentran entre los más relevantes y la infección por genotipos más virulentos de *H. pylori* como CagA (+) y VacA s1m1. (30)(34)

*H. pylori* permanece en el moco gástrico, por fuera de la célula epitelial gástrica; sin embargo, se han propuesto varios mecanismos capaces de desencadenar señales en las células del huésped que influyen en la aparición de la carcinogénesis. Dentro

de estas, se encuentra la proteína CagA (+), esta es translocada a la célula huésped por medio de un sistema de secreción tipo IV, y posteriormente fosforilada desencadenando cambios en el citoesqueleto, en la morfología y en la movilidad de la célula huésped, debido a que destruye las uniones estrechas, causa pérdida de la polaridad en las células epiteliales, y desestabiliza el complejo E-cadherina /  $\beta$ -catenina (30). De igual forma, inducen niveles más altos de las citoquinas proinflamatorias IL-1 e IL-8, que, a su vez, actúan como un quimio atrayente para las células polimorfonucleares (PMN). Se considera que estos PMN son de importancia crítica para la ruptura de la barrera epitelial local y pueden conducir a una mayor infiltración de la bacteria en la submucosa, desencadenando una inflamación crónica (35) y que, sumada a una condición de hipoclorhidria en el cuerpo gástrico constituyen como el principal factor de riesgo para el desarrollo de atrofia gástrica, y producción de radicales libres que lesionan el DNA de estas células con rápido crecimiento que luego puede avanzar a cáncer gástrico. También, se encuentra la proteína citotoxina vacuolizante (VacA) que una vez internalizada en la célula del hospedero, induce la formación de vacuolas, estimulando la apoptosis. Por lo cual, existe una amplia evidencia que implica a *H. pylori* en pasos claves en el desarrollo del cáncer gástrico. (30)(32)

La infección inicia un prolongado proceso precanceroso con las siguientes etapas bien caracterizadas: gastritis atrófica multifocal → metaplasia intestinal completa → metaplasia intestinal incompleta → displasia → cáncer gástrico. Por lo cual, *H. pylori* ha sido clasificada dentro del grupo I de carcinógenos por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (22)(17). Este grupo de carcinógenos tiene una asociación probada entre el agente y la neoplasia implicada. Por esto, la erradicación del *H. pylori* ha sido propuesta como una estrategia de quimio-prevención primaria para reducir la incidencia de cáncer gástrico. En 2012, se notificó la eficacia del tratamiento de la infección por *H. pylori* para reducir el riesgo, en un estudio clínico aleatorizado en Shandong, China, se encontró una reducción estadísticamente significativa del 39% en el riesgo de cáncer gástrico. Al igual que en el 2014, uno de los ensayos en Japón, reportó una reducción estadísticamente significativa en el riesgo de cáncer gástrico, en efecto indican que el tratamiento con *H. pylori* reduce la incidencia de cáncer gástrico entre un 30 y un 40%. También hay evidencia de que el tratamiento de *H. pylori* puede prevenir la anemia ferropénica en niños (25)(36).

El resultado de la infección en cada individuo es impredecible, así como lo es la forma en la que avanzan las lesiones de la mucosa gástrica. Sin embargo, la progresión puede ser detenida por la erradicación de *H. pylori* en los casos en que el daño de la mucosa aún se encuentra en un punto de retorno, ya que una vez la atrofia gástrica es muy avanzada o el cáncer ya ha desarrollado cáncer la erradicación de la infección no tiene ningún beneficio (37).

La estrategia para erradicar *H. pylori* consiste en una combinación de un inhibidor de la bomba de protones (IBP), con diversos antibióticos. Los antibióticos más usados son: metronidazol, claritromicina, amoxicilina, tetraciclina y levofloxacina (25). La eficacia de la erradicación de *H. pylori* depende del tipo y duración del tratamiento, el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente y la resistencia a los antibióticos. Los regímenes de tratamiento se clasifican en: duales, triples, cuádruples con bismuto, concomitantes, secuenciales e híbridas. Por lo general, se administran durante un período de aproximadamente 10 a 14 días. Desafortunadamente, la eficacia de este esquema tradicional, que inicialmente era del 90%, de manera progresiva ha disminuido y no alcanza resultados óptimos relacionado con varias circunstancias, tales como la disminución en la eficacia que se debe fundamentalmente al progresivo aumento de la resistencia primaria de *H. pylori* a los antibióticos más usados, que en la actualidad es del 60-70% (25)(38). Por otro lado, múltiples sitios de crecimiento, que dificultan la llegada de los antibióticos, falta de adherencia al tratamiento, e inadecuada supresión del ácido (25). Cuando *H. pylori* se expone a antibióticos que no lo erradican, desarrolla resistencia secundaria a los mismos.

Se ha encontrado una resistencia global del 31,1% para claritromicina y hasta del 80% para metronidazol. Cuando se documentó exposición previa a claritromicina y metronidazol, la resistencia aumentó a 73,9 y 78,3% respectivamente (8). En Colombia se reporta una resistencia a metronidazol mayor al 80%, a claritromicina de 25%, levofloxacina superior al 27% y de amoxicilina menor al 2%(22). La resistencia a claritromicina se considera que tiene mayor impacto en las fallas de erradicación de la infección por *H. pylori*. (22)(25)

## **2. Plantas medicinales con actividad antimicrobiana.**

Las plantas medicinales se han asociado como una fuente útil de nuevos fármacos o medicamentos, incluso frente a microorganismos, donde se ha encontrado actividad antimicrobiana contra cepas multirresistentes de *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Teniendo en cuenta que la infección por *H. pylori* desarrolla enfermedades gastrointestinales, y de manera tradicional se han utilizado una amplia variedad de sustancias derivadas de plantas para tratar trastornos gastrointestinales, varias investigaciones se han centrado en encontrar alternativas terapéuticas en las plantas medicinales. Diversos productos naturales con actividad antimicrobiana se han probado para tratar la infección por *H. pylori*, aunque todavía son limitados comparado con otras enfermedades (1)(10). Se han probado preparaciones de extractos vegetales que incluyen agua, solventes orgánicos o aceites esenciales. Se han reportado algunos estudios de especies vegetales con actividad antimicrobiana contra *H. pylori*. Entre los cuales, los extractos metanólicos de

*Carum carvi*, *Xanthium brasiliicum* y *Trachyspermum copticum* han demostrado actividad antimicrobiana contra 10 aislados clínicos de *H. pylori*. También algunas plantas en la medicina popular brasilera en el tratamiento de trastornos gastrointestinal como *Bixa orellana*, *Chamomilla recutita*, *Ilex paraguariensis* y *Malva sylvestris* fueron los más efectivos contra *H. pylori* en este estudio. Por otro lado, los extractos de metanol y acetona de la flor de *Acacia nilótica* y *Calotropis procera* evidenciaron tener actividad antimicrobiana con una MIC de 8 y 16ug/mL respectivamente, e inhibición de la actividad de la ureasa. Es bien conocido que la actividad de la ureasa en *H. pylori* es crucial en la supervivencia bacteriana y la patogénesis. Así siendo, los compuestos de plantas bioactivas fueron probados para ver su potencia antimicrobiana contra *H. pylori*. La berberina, un alcaloide de bencilisoquinolina, aislado de *Hydrastis canadensis*, reveló el valor MIC más bajo (0,78 µg /ml), por lo que se considera el compuesto bioactivo más efectivo, seguido de dialil tetrasulfuro (6 µg / ml), alicina (4 µg / mL) y palmatina (6.25 µg / mL) aisladas de *Allium sativum* y *Tinospora sagittate*, respectivamente. Por lo tanto, estos podrían contribuir en el tratamiento de la infección. Aunque algunas plantas han mostrado actividad antimicrobiana contra *H. pylori in vitro*, son escasos los estudios contra esta bacteria en modelos animales. La fracción hidroetanólica de *Calophyllum brasiliense* evidencio tener propiedades gastroprotectores y actividad anti-*H.pylori* en un modelo *in vivo*, debido a que las ratas Wistar inoculadas con *H.pylori* tratadas con esta fracción (50,100 y 200mg/kg) mostraron un marcado retraso en la ulcera de manera dependiente de la dosis. Además, los extractos de *Origanum vulgare* y *Vaccinium macrocarpon* mostraron una capacidad prominente para inhibir *H. pylori* a través de la inhibición de la ureasa.(1)

### 3. Género *Ilex*.

La principal especie representante del género *Ilex* es *I. paraguariensis* (28)(12), conocida popularmente como “yerba-mate” y de amplia presencia en Latinoamérica. Es ampliamente consumida como parte de la dieta habitual de los países sudamericanos de Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay debido a que, de las hojas y ramas, secas y molidas de un arbusto perenne de la familia Aquifoliacea, se prepara el “mate” por lo cual resulta de interés determinar si sus usos tradicionales están respaldados por efectos farmacológicos o simplemente basados en el folclore (29).

Se han realizado innumerables investigaciones sobre la composición química y actividades biológicas de la yerba mate, en que su composición se ha caracterizado por una variedad de polifenoles y derivados cafeoílicos, entre ellos ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido feruloilquínico, kaempferol, quercetina, ácido quínico y rutina, además de xantinas y gran variedad de saponinas, los cuales se les atribuye varias de las actividades farmacológicas reportadas para la especie.

Sin embargo, hay un número más limitado de investigaciones sobre sus propiedades antimicrobianas.(27) Prado et al. (2013), evaluaron la actividad antimicrobiana de los extractos etanoicos y metanoicos de *I. paraguariensis* (yerba mate) contra patógenos alimentarios como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* y *Escherichia coli* mediante la determinación de la concentración inhibitoria (MIC). Los extractos etanólicos y metanólicos de *I. paraguariensis* inhibieron todos los microorganismos evaluados, excepto *E. coli* (Tabla 1). El extracto etanólico produjo las MIC (0,78 mg/mL) más baja en *S. aureus* y *S. enteritidis*; para *L. monocytogenes*, los valores fueron similares. Lo que demuestra su alta actividad bactericida in vitro. Asimismo, mostro alto contenido de fenólicos totales y la presencia de derivados clorogénicos, principalmente ácido 3-O-cafeoilquínico y cafeico.

**Tabla 1:** Actividad antibacterial de extractos metanoicos y etanólicos de yerba mate (28) .

	<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. Enteritidis</i>		<i>E. coli</i>	
	M	E	M	E	M	E	M	E
<b>Inhibition zone (mm)</b>	21.67 +/- 0.57	23.67 +/- 0.57	10.00 +/- 0.00	10.33 +/- 0.58	10.00 +/- 0.00	13.67 +/- 0.57	-	-
<b>MIC</b>	1.56	0.78	3.13	3.13	6.25	3.13	-	-
<b>MBC</b>	3.13	0.78	3.13	3.13	6.25	6.25	-	-

MIC: minimun inhibitory concentration (mg/mL); MBC: minimun bactericidal concentration (mg/mL); M: methanolic extract; E: ethanolic extract; Averages of triplicates +/- standard deviation; -:No inhibition

Por otro lado, Cogo et al. (2010), observaron que el extracto etanólico de las hojas tostadas de *I. paraguariensis* inhibió el crecimiento del *H. pylori in vitro* en los ensayos de difusión en disco y de concentración mínima inhibitoria por dilución en agar, los valores MIC90 demostraron que *I. paraguariensis* fue capaz de inhibir un mayor número de aislamientos clínicos en comparación con otros extractos, aunque

la variedad verde Yerba Maté (MIC90: 5.0 mg / ml) fue ligeramente menos activa que la variedad tostada (MIC90: 2.5 mg / ml). (Tabla 2).

**Tabla 2:** Valores de MIC (mg / ml) de extractos de plantas contra aislados clínicos y cepas de referencia de *Helicobacter pylori*.(12)

<i>H. pylori</i> strains	Plant extracts				
	<i>B. orellana</i>	<i>C. recutita</i>	<i>I. paraguayensis</i> (green yerba mate)	<i>I. paraguayensis</i> (roasted yerba mate)	<i>M. sylvestris</i>
<i>H. pylori</i> 26695	< 0.625	< 0.625	< 0.625	< 0.625	< 0.625
<i>H. pylori</i> J99	< 0.625	< 0.625	< 0.625	2.5	1.25
BP-84	>5.0	>5.0	5.0	1.25	>5.0
BP-667	>5.0	>5.0	5.0	5.0	>5.0
BP-660	>5.0	>5.0	5.0	1.25	>5.0
BH-27	1.25	< 0.625	< 0.625	< 0.625	>5.0
BP-446	1.25	< 0.625	< 0.625	2.5	>5.0
BP-650	>5.0	>5.0	5.0	< 0.625	>5.0
BP-118	< 0.625	< 0.625	< 0.625	< 0.625	0.625
BP-713	>5.0	< 0.625	2.5	5.0	2.5
BP-132	>5.0	< 0.625	< 0.625	2.5	5.0
BP-652	< 0.625	< 0.625	< 0.625	2.5	2.5
F-39	1.25	< 0.625	< 0.625	< 0.625	>5.0
MIC <sub>50</sub>	1.25	<0.625	<0.625	1.25	>5.0
MIC <sub>90</sub>	>5.0	>5.0	5.0	2.5	>5.0

En Colombia la especie de este género que se destaca por su presencia y uso tradicional es *I. guayusa* Loes., comúnmente conocida como “guayusa” (29). Esta es una planta nativa de la selva amazónica, de la cual tradicionalmente se utilizan las hojas para preparar un brebaje que se toma en la madrugada como un limpiador del sistema digestivo y por sus propiedades antioxidantes (39). En la literatura, son pocos los estudios farmacológicos y químicos reportados para *I. guayusa*, destacándose algunos estudios en actividad antioxidante y algunos compuestos fenólicos (principalmente ácidos cafeoilquínicos) y cafeína (50). Hasta el momento, esta especie no presenta estudios contra *H. pylori*.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *H. pylori* y el perfil químico por CCD de extractos vegetales de *Ilex guayusa* e *Ilex paraguariensis*

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Evaluar la actividad antimicrobiana frente a cepas de referencia de *H. pylori* de diferentes extractos de las especies *Ilex guayusa* e *Ilex paraguariensis*.
2. Analizar cualitativamente los extractos vegetales de *Ilex guayusa* e *Ilex paraguariensis* por medio de Cromatografía en Capa Delgada (CCD).

## METODOLOGÍA.

### 1. Material vegetal:

El material vegetal ya seco y molido de la especie *I. guayusa* fue proporcionado por la Ingeniera Forestal propietaria y responsable técnica de la Finca San Pablo, en la Vereda Brasil (Viotá, Cundinamarca): Mogambo Ltda. Sendero Ambiental, Saberes y Sabores de la Naturaleza; NIT: 900.208.036-4. Aunque se trate de un material vegetal cultivado y adquirido comercialmente, se cuentan con autorización legal, y Permiso de Recolecta de Especies Silvestres con Fines de Investigación de la Pontificia Universidad Javeriana (Resolución No 0546 de 29 de mayo de 2014 del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible – Autoridad Nacional de Licencias Ambientales). El material vegetal ya seco y molido de la especie *I. paraguariensis* fue adquirido comercialmente en la ciudad de Passo Fundo, Brasil, en supermercado local.

### 2. Obtención de los extractos.

Teniendo en cuenta que las aplicaciones en medicina tradicional de estas plantas son principalmente como extractos con base en agua (acuoso o hidroalcohólico), consumidos vía oral, se realizan los siguientes procesos extractivos:

#### *Ilex paraguariensis*:

1. Infusión acuosa, por 10 minutos, relación planta: solvente 1:10 m/v.
2. Maceración, en etanol 96%, por 72 horas, relación planta: solvente 1:10 m/v. (Este extracto no es preparado por el uso popular, fue empleado con el fin de tener un extracto de referencia en relación con los antecedentes).

#### *Ilex guayusa*:

1. Infusión acuosa, por 10 minutos, relación planta: solvente 1:10 m/v.
2. Maceración, en etanol 40%, por 72 horas, relación planta: solvente 1:10 m/v
3. Reflujo, en etanol 40%, por 15 minutos, relación planta: solvente 1:10 m/v

Un total de 25 g de material vegetal de cada especie se utilizaron para realizar los procesos extractivos.

Posteriormente, los extractos que se obtuvieron se filtraron y se procedió a eliminar el etanol de los extractos hidroetanólicos mediante el uso del rotaevaporador. Finalmente, el agua de los extractos se removió por liofilización. (40)(41)

### 3. Cepas Bacterianas.

Se evaluaron 2 cepas de referencia susceptibles a los antimicrobianos (claritromicina, levofloxacina, metronidazol y amoxicilina), las cuales fueron dos cepas de referencia de *Helicobacter pylori* NCTC 11637 y NCTC 11638, depositadas en la Colección de Microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana. Estas cepas han sido completamente caracterizadas morfológica y genotípicamente. Las placas fueron incubadas a 37 °C bajo condiciones microaerófila. El crecimiento e identificación del *H. pylori* fueron determinados por morfología de colonia típica, tinción de Gram, reacciones de ureasa, catalasa y oxidasa. Se preparó un inóculo de cada cepa utilizando transfiriendo colonias frescas de los microorganismos en tubos que contenían solución salina fisiológica estéril y ajustando la turbidez al estándar 2.0 McFarland. equivalente a una concentración de  $6.0 \times 10^8$  UFC / mL de *H. pylori*. (12)

Las pruebas bioquímicas para verificar la identidad de *H. pylori*, se encuentran en la Figura 1. En la figura 1<sup>a</sup> se observa la prueba de ureasa, que evalúa la capacidad de la enzima ureasa de *H. pylori* para descomponer la urea en anhídrido carbónico y amoníaco, lo cual conlleva a un cambio de color que genera el pH básico del amoníaco y que se evidencia mediante el cambio de color del medio de naranja-amarillo a rosa fuerte debido a la acción del indicador de pH, el cual es rojo fenol.. En la sección B se observa la prueba de catalasa, que mide la acción de la enzima catalasa al hidrolizar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas. Esta actividad es esencial para la protección por la muerte que pueden generar los radicales libres de oxígeno en la mucosa. En la sección C de la figura 1 se observa una prueba de oxidasa que consiste en determinar la presencia de la enzima citocromo-oxidasa a través de papeles impregnados con para-amino-N-dimetil-anilina, que al ser oxidados por la enzima generan un cambio de color de la tira a color azul o morado, al virar de color es indicativo de oxidasa positivo. Las pruebas positivas de catalasa, ureasa y oxidasa confirman la identificación de la bacteria como *H. pylori*.(42)

#### **4. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales de las especies *I. guayusa* e *I. paraguariensis* frente a *H. pylori***

Muchas plantas son utilizadas en la medicina tradicional con actividad antimicrobiana, pero sin evidencia científica, por esta razón para poder determinar la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales de las especies *I. guayusa* e *I. paraguariensis* frente a *H. pylori*, se utilizó la técnica de dilución en agar de acuerdo con el Clinical and Laboratory for Standards Institute (CLSI, 2014), que es el estándar de oro para la evaluación de actividad antimicrobiana en microorganismos de crecimiento lento. (15)

En este método se incorpora el antimicrobiano a evaluar a un medio con agar. El antimicrobiano se añade cuando el medio aún está fundido. Para lograr el rango de dilución deseado se prepara una serie de cajas de Petri, cada una con una determinada concentración de antimicrobiano, se inicia con una concentración de 1000ug/mL para lograr un gradiente decreciente de la concentración del antimicrobiano, que generalmente se empieza a diluir al doble. En la mayoría de los casos, el medio de cultivo a emplear es agar Mueller-Hinton, pero en función de los microorganismos y de sus necesidades nutritivas puede ser adecuado o necesario añadir algún suplemento a este medio, o emplear un medio diferente. El medio se obtiene habitualmente de distribuidores comerciales, que indican las condiciones para su preparación. Una vez esterilizado debe dejarse enfriar a unos 50°C antes de añadir suplementos (si es necesario) y las soluciones con antimicrobiano. El pH del medio, una vez sólido y con los suplementos que se requieran, ha de estar entre 7.2 y 7.4. El medio con antimicrobiano, el cual se encuentra en una temperatura 37°C se vierte cuanto antes (para evitar que el agar se solidifique) en cajas de Petri estériles, evitando la formación de burbujas que dificultarían la posterior inoculación de las cajas. Para cajas circulares de 90 mm de diámetro son necesarios 20 ml de medio con antimicrobiano (habitualmente en la proporción 19 ml de medio por 1 ml de solución de la correspondiente concentración de antimicrobiano). Posteriormente se dejan solidificar las cajas, que se usarán inmediatamente o se almacenarán en frigorífico en bolsas de plástico. Para trabajos de referencia las cajas no se deben almacenar más de cinco días. Para cada serie de concentraciones se debe incluir al comienzo y al final de este proceso cajas de medio sin antimicrobiano que servirán para controlar el crecimiento y la posibilidad de contaminación durante el proceso de inoculación.

Con ayuda de un replicador de Steers o pipetas multicanal, las suspensiones estandarizadas bacterianas, se inocula usualmente 1uL en cada placa. Tras la incubación microaerofílica durante 48 horas de las cajas, la concentración más baja de antimicrobiano, capaz de inhibir el crecimiento de un aislado, es la CMI de ese antimicrobiano para esa bacteria. (15)(43)

En consecuencia, se prepararon tubos con la concentración definida de los diferentes extractos de las especies *I. guayusa* e *I. paraguariensis*. Se evaluaron las concentraciones finales de 1000 y 500 ug/mL para cada uno de los extractos. Para la preparación de las soluciones de trabajo de los extractos, se pesó el extracto seco de cada especie para ser diluido en 3mL de DMSO al 20%. Una vez resuspendida la solución en el agitador vórtex, se filtró utilizando un filtro de PTFE de 0,22um. Se realizaron pruebas de esterilidad de las soluciones de los extractos filtrados, sembrando 100uL de estos en agar BHI, e incubado a 37°C por 24 horas. La concentración final de DMSO en el medio de cultivo no superó el 1%. (12)

Posteriormente estas soluciones se mezclaron con un volumen de agar Mueller-Hinton II suplementado al 7% con Sangre y 0.4% con Isovitalex™, manteniendo una relación 1:20, lo que quiere decir que se emplearon 0.25mL de extracto en 4.75mL de medio MH II en cajas de Petri pequeñas con capacidad de 5mL cada una. Obteniéndose el medio MH II con el extracto diluido a una concentración determinada.

Las cajas de Petri se inocularon con 1ul de cada cepa a una concentración de McFarland de 2.0 por triplicado. Posteriormente, las placas se incubaron en condiciones de microaerofilia (11% CO<sub>2</sub>) por 72 horas a 37°C. Posterior al tiempo de incubación, se realizó la lectura de cada una de las diluciones, observando presencia (P) o ausencia (A) de crecimiento de *H. pylori* para determinar la actividad antimicrobiana de cada uno de los extractos a diferentes concentraciones. Los resultados serán expresados en µg/mL. Para el análisis de datos se presentaron tablas las cuales permiten ver de forma clara la correlación entre la concentración del extracto evaluado y la inhibición de la bacteria.

Para poder validar la veracidad de la técnica, se montaron distintos controles, los cuales fueron: control del medio para evaluar viabilidad y pureza en cada montaje, control del vehículo (DMSO al 1%) en el cual se encontraban diluidos los extractos con el objetivo de verificar que el disolvente no adiciona actividad antimicrobiana y no generara actividad citotóxica frente a la bacteria y control con antibiótico, en este caso fue empleado amoxicilina 0,125 ug/mL para poder observar inhibición del microorganismo. ya que es uno de los antibióticos utilizados en la línea de tratamiento de *H. pylori*, y nos permite verificar si la bacteria se está comportando como lo esperado.

## **5. Análisis cualitativo de los extractos vegetales de *Ilex guayusa* e *Ilex paraguariensis* por medio de Cromatografía en Capa Delgada (CCD).**

El análisis por CCD se realizó en colaboración con la estudiante de maestría Daniella Cualla, del Grupo de Investigación Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana, orientado hacia la visualización de metilxantinas (cafeína, teobromina y teofilina), flavonoides (kaempferol), y ácidos fenólicos (ácido cafeico y ácido galico) frente a estándares comerciales.

Para la determinación de metilxantinas, se empleó como fase estacionaria Sílica Gel F254, como fase móvil: acetato de etilo: metanol:agua (5:0,55:0,4), visualización a UV-254nm. Por otro lado, para la determinación de flavonoides y ácidos fenólicos, se empleó como fase estacionaria Sílica Gel F254, y dos distintas fases móviles: la primera, cloroformo: acetato de etilo: ácido fórmico (5:5:0,1); y la segunda, una fase móvil más polar empleándose butanol: ácido acético: agua (6:1:2), y ambos revelados con Reactivo Natural/UV-360nm. Para la detección de saponinas, se empleó como fase estacionaria Sílica Gel F254, como fase móvil: butanol: ácido acético: agua (6:1:2) y revelado con anisaldehido-sulfúrico/visible. (41)(44)

## RESULTADOS/ DISCUSIÓN.

### 1. Obtención de los extractos

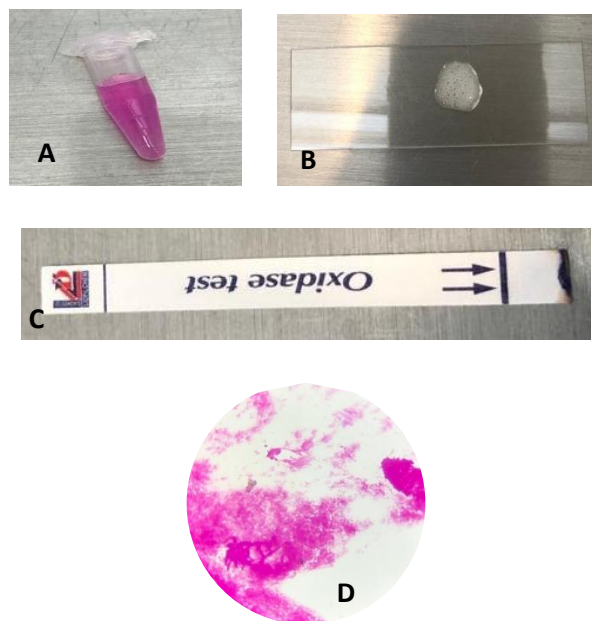
Se obtuvieron dos extractos (un etanólico y uno acuoso) para la especie *I. paraguariensis* y tres extractos (dos hidroetanólicos y uno acuoso) para la especie *I. guayusa* de los cuales se evaluó su actividad antimicrobiana frente a *H. pylori* y el perfil químico cualitativo de estos. Los extractos acuosos presentaron un mayor rendimiento frente a los extractos hidroetanólicos, siendo el extracto de *I. guayusa* (infusión acuosa) el de mayor porcentaje con un valor de 27,5%\*. Mientras que el extracto de menor rendimiento fue *I. guayusa* (maceración en etanol 40%) con un valor 5,9%\*. \*Valor obtenido en relación con la cantidad de material vegetal seco implicado en la extracción.

El propósito de los procedimientos de extracción para plantas medicinales es lograr las porciones terapéuticamente deseadas y eliminar el material no deseado mediante el tratamiento con un disolvente selectivo. Donde la calidad del extracto se ve influenciado por la pieza de la planta utilizada como material vegetal, el disolvente utilizado para la extracción y el procedimiento de extracción. Pero, por otra parte, la cantidad y la composición de un extracto depende del tipo de extracción, temperatura, naturaleza del disolvente, y la polaridad.

Por esto, las condiciones empleadas fueron los procesos extractivos de infusión, maceración en etanol y reflujo en etanol, de acuerdo con los reportes de literatura se han demostrado que las extracciones en etanol son más eficientes en la obtención de compuesto de interés. (45)

### 2. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales de las especies *Ilex guayusa* e *Ilex paraguariensis* frente a *H. pylori*.

El crecimiento de *H. pylori* de las cepas de referencia y en los extractos evaluados se confirmó con tinción de Gram, en el cual se observó morfología típica de la bacteria (bacilo Gram negativo) y con pruebas bioquímicas de ureasa, oxidasa y catalasa positivo. (42) El resultado positivo de estas pruebas se observan en la figura 1.



**Figura 1.** Resultados pruebas bioquímicas donde A corresponde a la ureasa, B catalasa, C oxidasa y D coloración de Gram para las cepas de referencia, siendo positiva en todos los casos.

Los resultados obtenidos en la evaluación de los extractos vegetales de las especies *I. guayusa* e *I. paraguariensis* frente a *H. pylori* se consignaron en la Tabla 3 correspondiente a los extractos de *I. paraguariensis* y la Tabla 4 corresponde a los extractos de *I. guayusa*, donde “+” significa extracto con actividad antimicrobiana frente a *H. pylori* y “-” significa extracto sin actividad antimicrobiana frente a *H. pylori*, evidenciándose presencia de crecimiento de *H. pylori*.

**Tabla 3.** Resultados Ensayos Biológicos de los extractos vegetales de las hojas de la especie *Ilex paraguariensis* frente a *Helicobacter pylori*.

<b>Extractos <i>Ilex paraguariensis</i></b>				
	<b>Maceración en etanol 96%</b>		<b>Infusión 1:10</b>	
	1000 ug/mL	500 ug/mL	1000 ug/mL	500 ug/mL
<b><i>H. pylori</i> NTCT 11638</b>	+	+	-	-

<b><i>H. pylori</i></b> <b>NTCT 11637</b>	+	+	-	-
--	---	---	---	---

\* -: Extracto sin actividad antimicrobiana frente a *Helicobacter pylori*.

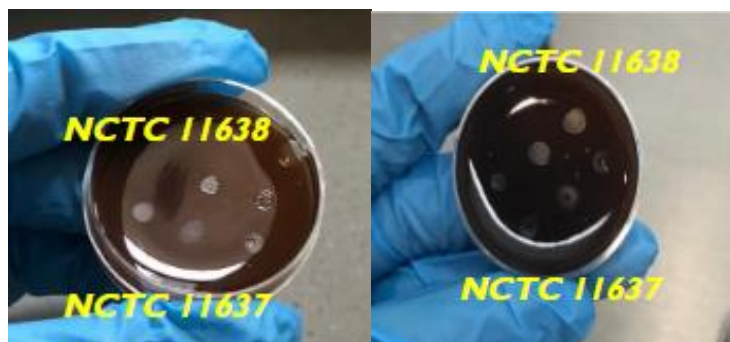
\* +: Extracto con actividad antimicrobiana frente a *Helicobacter pylori*.

**Tabla 4.** Resultados Ensayos Biológicos de los extractos vegetales de las hojas de la especie *Ilex guayusa* frente a *Helicobacter pylori*.

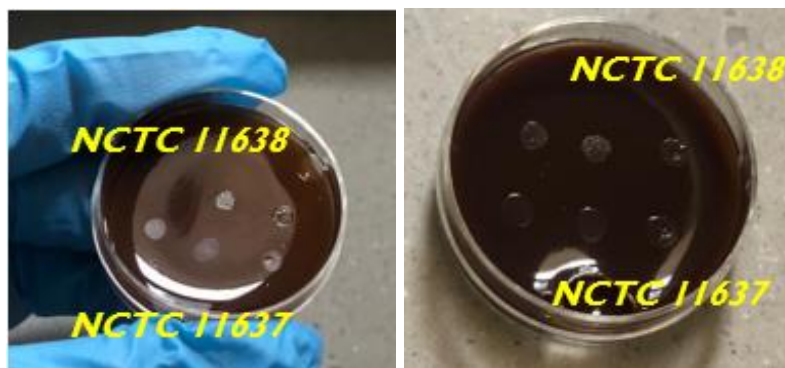
<b>Extractos <i>Ilex guayusa</i></b>						
	<b>Maceración en etanol 40%</b>		<b>Infusión 1:10</b>		<b>Reflujo en etanol 40%</b>	
	1000 ug/mL	500 ug/mL	1000 ug/mL	500 ug/mL	1000 ug/mL	500 ug/mL
<b><i>H. pylori</i></b> <b>NTCT</b> <b>11638</b>	+	-	+	-	+	-
<b><i>H. pylori</i></b> <b>NTCT</b> <b>11637</b>	+	-	+	-	+	-

\* -: Extracto sin actividad antimicrobiana frente a *Helicobacter pylori*.

\* +: Extracto con actividad antimicrobiana frente a *Helicobacter pylori*.



**Figura 2.** Control al lado izquierdo y actividad antimicrobiana al lado derecho de *H. pylori* a causa del extracto hidroetanólicos de 1000 ug/ml de *Ilex guayusa* (reflujo en etanol 40%).



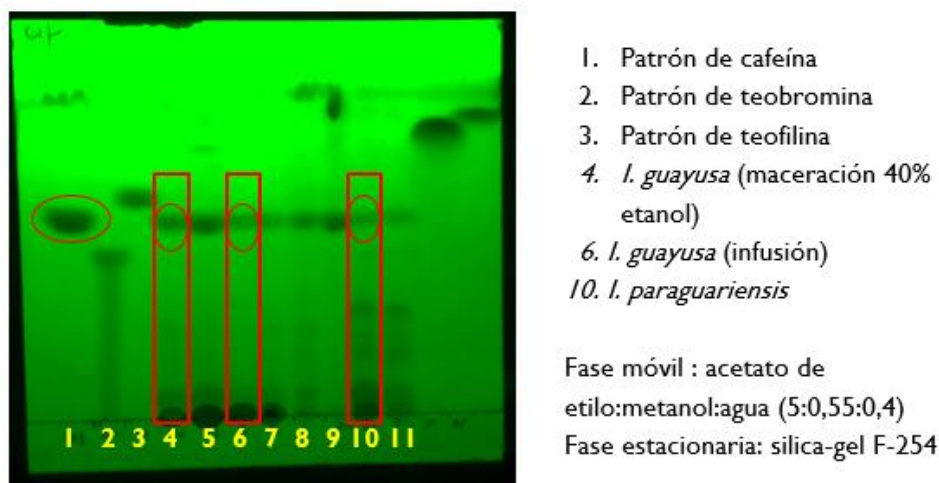
**Figura 3.** Control viabilidad al lado izquierdo y al lado derecho extracto acuoso de 1000 ug/ml de *Ilex paraguariensis* (infusión acuosa) sin presentar actividad antimicrobiana frente a *H. pylori*.

Los resultados de los extractos de la especie vegetal *I. paraguariensis* demostró tener actividad antimicrobiana para el extracto etanólico (maceración en etanol 96%) frente a *H. pylori* en una concentración de 500 ug/ mL. Por lo cual resulta de gran interés, debido a que se encontró actividad antimicrobiana frente a *H. pylori* en una concentración menor a la reportada en la literatura, en el que Cogo et al reporto actividad anti-*H. pylori* de un extracto etanólico de *I. paraguariensis* en una concentración de 0,625 ug/mL frente a cepas de referencia. Mientras que el extracto acuoso no tiene actividad antimicrobiana frente a *H. pylori* (Figura 3). Para los extractos de la especie *I. guayusa* maceración en etanol 40%, reflujo en etanol 40% (Figura 2) e infusión acuosa demostraron tener actividad antimicrobiana frente a *H. pylori* en una concentración de 1000 ug/mL. De acuerdo con Holetz, las concentraciones de 500 y 1000 ug/mL tienen una la actividad inhibitoria débil. Por lo cual, deberían considerarse estudios de toxicidad al ser una concentración alta. Los extractos que tienen actividad inhibitoria superior a 1000 ug/mL, son considerados con actividad nula, como fue observado en el extracto acuoso de *I. paraguariensis*. (46)

### 3. Análisis cualitativo de los extractos vegetales de *Ilex guayusa* e *Ilex paraguariensis* por medio de Cromatografía en Capa Delgada (CCD).

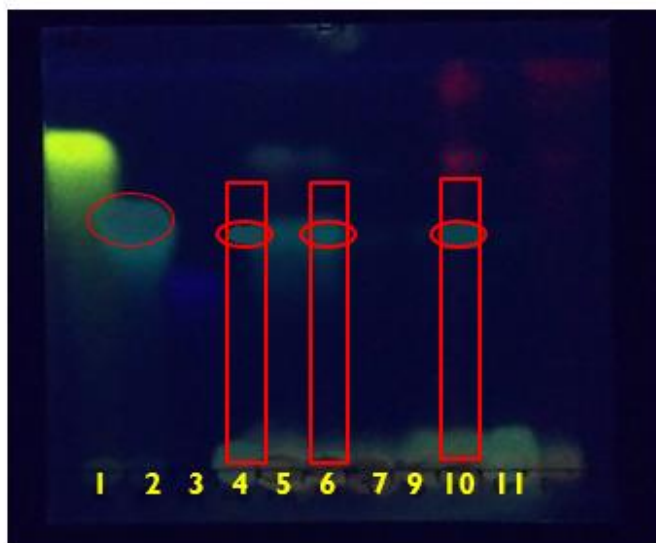
Los extractos se analizaron mediante cromatografía en capa delgada orientado hacia la visualización de metilxantinas y polifenoles de manera comparativa entre las especies y frente a estándares comerciales.

Para la determinación de metilxantinas, se empleó como fase estacionaria Sílica Gel F254, como fase móvil: acetato de etilo: metanol: agua en una proporción (5:0,55:0,4), y un revelador de UV-254nm, donde se emplearon patrón de cafeína, teobromina y teofilina. El resultado final se observa en la **Figura 1**. En el cual podemos observar la presencia de cafeína en destaque para ambas especies *I. guayusa* (maceración en etanol 40% e infusión) e *I. paraguariensis* (infusión acuosa). Por esta técnica en estas condiciones cromatográficas, no fue posible observar la presencia de teobromina o teofilina.



**Figura 4.** Cromatografía en Capa Delgada para visualización de perfiles cromatográficos específicos para metilxantinas. (49)

Por otro lado, para la observación de flavonoides se empleó como patrón el kaempferol, y los patrones de ácido cafeico y ácido gálico para la observación de ácidos fenólicos. El resultado se observa en la **Figura 2**. En el cual se puede observar la presencia de ácido cafeico en ambas especies, pero, no se observa la presencia de kaempferol y ácido gálico en estas.

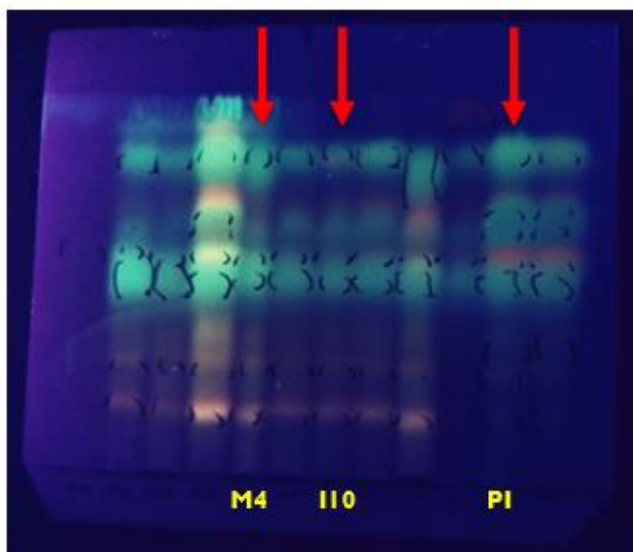


1. Patrón de kaempferol
2. Patrón de ácido cafeico
3. Patrón de ácido gálico
4. *I. guayusa* maceración 40%
6. *I. guayusa* (infusión acuosa)
10. *I. paraguariensis* (infusión acuosa)

Fase móvil: cloroformo: acetato de etilo: ácido fórmico (5:5:0,1)  
 Fase estacionaria: sílica-gel F-254

**Figura 5.** Cromatografía en Capa Delgada para visualización de perfiles cromatográficos específicos para flavonoides y ácidos fenólicos. (49)

Asimismo, se analizó cualitativamente los perfiles cromatográficos de polifenoles de estas especies empleándose como fase móvil butanol: ácido acético: agua (6:1:2). En esta placa, revelada con reactivo natural/UV-360nm, se observan los polifenoles con un color azul fluorescente, como se puede observar en la **Figura 3**. El resultado final de esta cromatografía en capa delgada nos permite observar la riqueza en polifenoles presentes tanto para la especie de *I. guayusa* como para *I. paraguariensis*, con una mayor complejidad para esta segunda especie.



- M4: *I. guayusa* maceración 40%  
 I10: *I. guayusa* infusión  
 PI: *I. paraguariensis*

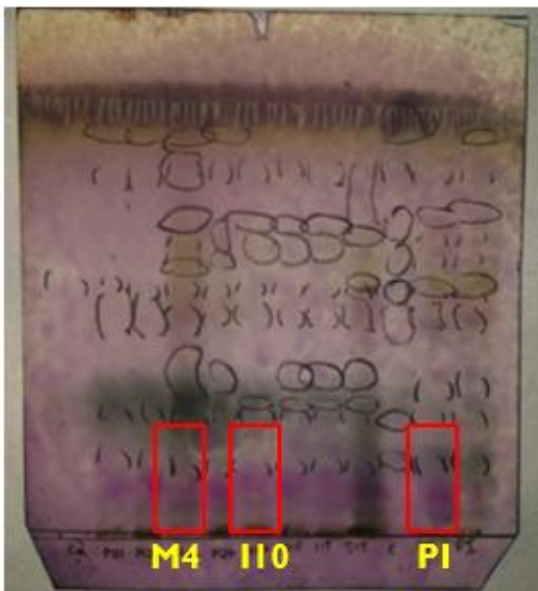
Fase móvil: (BAW) butanol: ácido acético: agua (6:1:2).

Fase estacionaria: Sílica-gel F-254

Revelador: Reactivo Natural/UV-360 nm

**Figura 6.** Cromatografía en Capa Delgada para visualización de perfiles cromatográficos específicos para polifenoles. (49)

Lo cual nos permite analizar que el perfil químico en relación con los compuestos fenólicos no difiere mucho entre especies. Sin embargo, hay varios compuestos que se diferencia entre las especies, entre estos las saponinas, para la visualización de saponinas se empleó como Fase móvil: (BAW) butanol: ácido acético: agua (6:1:2), como fase estacionaria: Sílica-gel F-254 y revelado con Anisaldehido-sulfúrico/visible. El resultado final se encuentra en la Figura 4, donde podemos observar presencia de saponinas en ambas especies. Aunque se ha reportado, que las hojas de yerba mate tienen un contenido de saponina relativamente alto, del 5 al 10% del peso seco total, siendo este uno de los compuestos que se diferencia entre las especies.(47)



M4: *I. guayusa* maceración 40%

I10: *I. guayusa* infusión

PI: *I. paraguariensis*

Fase móvil: (BAW) butanol: ácido acético: agua (6:1:2).

Revelador: Anisaldehido-sulfúrico/visible.

Fase estacionaria: Sílica-gel F-254

**Figura 7.** Cromatografía en Capa Delgada para visualización de perfiles cromatográficos específicos para saponinas. (49)

En la literatura, *I. paraguariensis* contienen una gran variedad de polifenoles, se consideran su principal compuesto bioactivo. Donde también se describen una gran variedad de compuestos químicos, principalmente derivados cafeicos, aminoácidos, flavonoides, saponinas, minerales (K, Ca, Mg P, Na y Fe) y vitaminas (C, B1 y B2). La mayoría de estos compuestos son de carácter hidrofílico lo que facilita su

extracción en medio acuoso. En contraparte son pocos los estudios realizados para la especie *I. guayusa* en relación con la composición química, que hasta el momento solo se ha reportado la presencia de cafeína y teobromina. (27)

Como resultado del perfil químico cualitativo de los extractos vegetales de *I. guayusa* (maceración en etanol 40% e infusión acuosa), se presentan diversos compuestos polifenólicos, con destaque para el ácido cafeico y también la presencia de cafeína como uno de los compuestos predominantes en los extractos. Para el perfil químico de *I. paraguariensis* (infusión acuosa) también se presentaron cafeína, compuestos polifenólicos, y una mayor presencia de saponinas. Si bien no se realizó un análisis químico cualitativo del extracto de *I. guayusa* (reflujo en etanol al 40%), considerando que este extracto es similar en términos de disolvente al extracto en maceración en etanol al 40%, se espera que los mismos compuestos puedan estar presentes en este.

La elección del disolvente está influenciada por lo que se pretende con el extracto, y los compuestos específicos que se desean extraer. En este trabajo se emplearon dos tipos de disolventes:

1. Agua: El agua es un disolvente polar, utilizado para extraer compuestos polares. Sumado a esto, es el disolvente mayormente empleado en la medicina tradicional, y como se mencionó anteriormente, las especies de este trabajo son ampliamente consumidas como una bebida tradicional. Aunque en los extractos de plantas con disolventes orgánicos se han encontrado una actividad antimicrobiana más consistente en comparación con el extracto de agua. Como lo podemos ver en este trabajo, el extracto etanólico de *I. paraguariensis* presento una mayor actividad antimicrobiana frente *H. pylori*, al contrario, el extracto acuoso de *I. paraguariensis* no tiene actividad antimicrobiana frente a *H. pylori*.

2. Alcohol: Muchos de los componentes identificados de plantas activas contra microorganismos son compuestos orgánicos aromáticos o saturados, que se obtienen con mayor frecuencia a través de la extracción inicial de etanol o metanol. Lo cual se ve reflejado en el trabajo, debido a que los extractos hidroalcohólicos, obtenidos por procesos extractivos como la maceración en etanol al 96 y 40%, y reflujo en etanol al 40%, obtuvieron una mejor actividad antimicrobiana frente a *H. pylori* en comparación con los extractos acuosos. En especial, el extracto etanólico de *I. paraguariensis* obtuvo una mejor actividad antimicrobiana frente a *H. pylori*, en comparación con el extracto acuoso de esta misma especie.(45)

La composición química de la yerba mate puede variar tanto cualitativa como cuantitativamente, en función del tipo de material que se analice, tal como la hoja

fresca o la yerba mate elaborada, contenga o no palos y del proceso de elaboración al cual es expuesta, debido a que, en ciertas ocasiones, el procesamiento puede alterar a través de reacciones de oxidación o reducción la composición de las moléculas activas. Otros factores que influyen en la composición química son los factores agronómicos y climáticos y las prácticas culturales. En los últimos años, diferentes investigaciones han revelado que el potencial antimicrobiano está relacionado con la presencia de diferentes clases de compuestos, principalmente fenólicos, cuyos principales representantes son el ácido gálico, siringico, cafeico, ferúlico y p-cumarico. A lo que se le suma la asociación con el solvente utilizado, ya que contienen una mezcla compleja de muchos metabolitos de plantas medicinales, como alcaloides, glucósidos, terpenoides, flavonoides y lignanos, así como de compuestos de mediana polaridad, que aquí no se evaluaron, que podrían explicar la actividad antimicrobiana. Sin embargo, hay pocos estudios sobre la actividad de estos compuestos en extractos crudos. En la investigación realizada por De Biasi et al estudiaron extractos acuosos preparados a partir de las hojas y ramas de *I. paraguariensis* con y sin exposición al sol. Los extractos de las ramas sin exposición al sol produjeron mayores halos de inhibición de crecimiento de los diferentes microorganismos ensayados (*Candida albicans*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*). *S. aureus* fue el microorganismo más sensible a los extractos con exposición al sol, mientras que, *P. mirabilis* fue el más sensible a los extractos sin exposición al sol. Según el análisis comparativo realizado por Darota et al, las hojas cultivadas al sol presentan mayor contenido de derivados de cafeoil, cafeína, teobromina y rutina, en comparación con los cultivados a la sombra. Además, observaron que las hojas procesadas de chimarrão sufren una disminución en la concentración de xantinas, mientras que las oxidadas tienen una menor concentración de fenólicos, en comparación con las hojas verdes. Sin embargo, las hojas sometidas a escaldado y secado (tipo chimarrão), presentan más compuestos fenólicos. (48)

## CONCLUSIONES.

- Los ensayos realizados permitieron conocer una nueva actividad biológica para la especie *Ilex guayusa* frente a *H. pylori*, aun no reportada en la literatura.
- Los extractos de la especie *Ilex guayusa* demostraron tener actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de referencia de *H. pylori* en una concentración de 1000 ug/mL.
- El extracto etanólico de la especie *Ilex paraguariensis* demostró tener actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de referencia de *H. pylori* en una concentración de 500 ug/ mL.
- El perfil químico cualitativo de los extractos de *I. paraguariensis* y *I. guayusa* presentan diversos compuestos polifenólicos, con destaque para el ácido cafeico, y también cafeína, como uno de los compuestos predominantes en los extractos. Así mismo se observaron saponinas en ambas especies, con una mayor complejidad en la yerba mate.

## RECOMENDACIONES.

Se recomienda hacer ensayos con cepas clínicas de *H. pylori*, con el fin de determinar si los extractos activos frente a las cepas control también tienen actividad contra aislamientos clínicos con diferentes perfiles de susceptibilidad.

Se sugiere ensayar un extracto de maceración en etanol al 96% de la especie de *Ilex guayusa* debido a que se puede encontrar una actividad antimicrobiana en una concentración menor a la reportada en este trabajo.

Evaluar la toxicidad de los extractos de las especies de *Ilex guayusa* e *Ilex paraguariensis*, ya que se encontró actividad antimicrobiana en una concentración alta.

Se propone ampliar los análisis cromatográficos: analizar los extractos que no pudieron ser cromatografiados en este trabajo; y también realizar un análisis de *Ilex guayusa* por medio de Cromatografía Líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), con base en los metabolitos ya descritos en la literatura, con el fin de promover un mayor aporte a su perfil químico, del cual todavía se conoce poco.

Se recomienda fraccionar los extractos activos frente al *H. pylori* con el fin de obtener y purificar moléculas que puedan llegar a tener mayor actividad antimicrobiana.

## BIBLIOGRAFÍA.

1. Salehi B, Sharopov F, Martorell M, Rajkovic J, Ademiluyi AO, Sharifi-Rad M, et al. Phytochemicals in *Helicobacter pylori* infections: What are we doing now? *Int J Mol Sci.* 2018;19(8).
2. Vale FF, Oleastro M. Overview of the phytomedicine approaches against *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol.* 2014;20(19):5594–609.
3. Mishra AP, Sharifi-Rad M, Shariati MA, Mabkhot YN, Al-Showiman SS, Rauf A, et al. Bioactive compounds and health benefits of edible *Rumex* species-A review. *Cell Mol Biol.* 2018;64(8):27–34.
4. DUNN BE, COHEN H, BLASER MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(4):720–41.
5. Dong BN, Graham DY. *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance: a WHO high priority? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14(7):383–4.
6. Bravo LE, Cortes A, Carrascal E, Jaramillo R, Garcia LS, Bravo PE, et al. *Helicobacter pylori*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. *Colomb med.* 2003;34:124–31.
7. Dacoll C, Balter H, Varela L, Buenavida G, González N, Silveira A, et al. Evolución de la respuesta al tratamiento de primera línea de la infección por *Helicobacter pylori* en Uruguay. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 2014;44(2):88–93.
8. Wu W, Yang Y, Sun G. Recent insights into antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* eradication. *Gastroenterol Res Pract.* 2012;2012:8.
9. Camargo MC, García A, Riquelme A, Camargo CA, Hernandez-garcía T, Candia R, et al. Systematic Review in Latin America. *Am J Gastroenterol.* 2014;109(4):485–95.
10. Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(4):564–82.
11. Vale FF, Vi JMB. Alternative therapies for *Helicobacter pylori*: probiotics and phytomedicine. *Immunol Med Microbiol.* 2011;63:153–64.
12. Cogo L, Bastos C, Dallarmi M, Gomes O, Machado M, Lima M, et al. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. *Brazilian J Microbiol [Internet].* 2010;41:304–9. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822010000200007&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822010000200007&script=sci_arttext)
13. Villacís J. ETNOBOTÁNICA Y SISTEMAS TRADICIONALES DE SALUD EN ECUADOR. ENFOQUE EN LA GUAYUSA (*Ilex guayusa* Loes). *Etnobiología [Internet].* 2017;15(3):101. Disponible en: <http://asociacionetnobiologica.org.mx/revista/index.php/etno/article/view/217/213>
14. TAMAYO EC. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE POLIFENOLES EN LA EXTRACCIÓN ETANÓLICA DEL

POLVO DE HOJAS DE GUAYUSA (*Ilex guayusa* Loes) DESHIDRATADA. 2017;22.

15. Barros NF, Novais RF, Cardoso JC, Macedo PRO. Institute C and LS. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline-Second Edition. Second Edi. 2014. Inst C LS. 2016;36.
16. Gonzalez M, Pascual C, Hernandez H. HELICOBACTER PYLORI: SU IMPORTANCIA COMO PROBLEMA DE SALUD EN LA COMUNIDAD Dr. Rev Cuba Med Gen Integr. 1998;14(6):611–8.
17. Otero W, Gomez MA, Castro D. Carcinogénesis gástrica Gastric carcinogenesis. Rev Col Gastroenterol. 2009;24(3):314–23.
18. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2015;65(2):87–108.
19. Gómez M, Otero W, Caminos JE, Bogotá C. Cáncer gástrico en pacientes jóvenes en Colombia. Rev Colomb Gastroenterol. 2012;27(3):166–72.
20. Valle U, Eduardo L, Buevas C, Eduardo P, Andrés P, Valle U, et al. Helicobacter pylori: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. Colomb Med. 2003;34(3):124–31.
21. Chey WD, Wong BCY. American College of Gastroenterology guideline on the management of Helicobacter pylori infection. Am J Gastroenterol. 2007;102(8):1808–25.
22. Trespalacios AA, Regino WO, Reyes MM. Resistencia de Helicobacter pylori a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. Rev Col Gastroenterol. 2010;25(1):31–8.
23. Martínez M. JD, Henao R. SC, Lizarazo R. JI. Resistencia antibiótica del helicobacter pylori en América Latina y el Caribe. Rev Colomb Gastroenterol. 2014;29(3):218–27.
24. Arévalo A, Otero WA, Trespalacios AA. Helicobacter pylori: resistencia múltiple en pacientes de Bogotá, Colombia. Biomédica. 2019;39:125–34.
25. Otero W, Gomez M, Trespalacios AA. Helicobacter pylori: ¿cómo se trata en el 2018?. Rev Gastroenterol del Perú [Internet]. 2018;38(1):54–63. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1022-51292018000100009%0Ahttp://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1022-51292008000300007](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292018000100009%0Ahttp://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292008000300007)
26. Bonifácio BV, dos Santos Ramos MA, da Silva PB, Bauab TM. Antimicrobial activity of natural products against Helicobacter pylori: a review. Ann Clin Microbiol Antimicrob [Internet]. el 19 de diciembre de 2014;13(1):54. Disponible en: <http://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12941-014-0054-0>
27. Burris KP, Harte FM, Michael Davidson P, Neal Stewart Jr C, Zivanovic S. Composition and Bioactive Properties of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* A.

- St.-Hil.): A Review. *Chil J Agric Res.* 2012;72(2):268–75.
28. Martin JGP, Porto E, Alencar SM De, Glória EM, Corrêa CB, Cabral ISR. Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St . Hil .) against food pathogens. *Rev Argent Microbiol* 2013;45(2)93-98. 2013;45(2):93–8.
  29. Sequeda-Castañeda LG, Modesti Costa G, Celis C, Gamboa F, Gutiérrez S, Luengas P. *Ilex guayusa* loes (Aquifoliaceae): Amazon and andean native plant. *Pharmacologyonline.* 2016;3:193–202.
  30. Arévalo A, Trespalacios AA, Otero W. Importancia de la proteína CagA en infección por *Helicobacter pylori*. *Rev Colomb Gastroenterol.* 2009;24(4):388–95.
  31. Laserna A, Barahona JE, Alba LH. Manejo de la infección por *Helicobacter pylori* : apreciación crítica de la literatura. *Univ Med.* 2018;59(3):1–13.
  32. Leja M, Grinberga-Derica I, Bilgiler C, Steininger C. Review: Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2019;24(S1):2–6.
  33. Kim SS, Ruiz VE, Carroll JD, Moss SF. *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of gastric cancer and gastric lymphoma. *Cancer Lett.* 2011;305(2):228–38.
  34. Correa P, Piazuelo MB. Cáncer gástrico: El enigma colombiano. *Rev Colomb Gastroenterol.* 2010;25(4):334–7.
  35. Prinz C, Schwendy S, Volland P. *H pylori* and gastric cancer: Shifting the global burden. *World J Gastroenterol.* 2006;12(34):5458–64.
  36. Winther JF, Møller H, Tryggvadottir L, Kler SK. Biological agents. *APMIS, Suppl.* 1997;105(76):120–31.
  37. Hernández DBP, Sabogal IAR, Arenas JDT. Eficacia de la erradicación del *helicobacter pylori* en la prevención del cáncer gástrico: Revisión sistemática y metanálisis. *Rev Colomb Gastroenterol.* 2014;29(3):262–9.
  38. Mascellino MT, Porowska B, De Angelis M, Oliva A. Antibiotic susceptibility, heteroresistance, and updated treatment strategies in *helicobacter pylori* infection. *Drug Des Devel Ther.* 2017;11:2209–20.
  39. Melo VA. Composición y Análisis Químico de la Especie *Ilex guayusa* Loes. 2014;16–25.
  40. Reginatto FH, Athayde ML, Gosmann G, Schenkel EP. Methylxanthines Accumulation in *Ilex* Species - Caffeine and Theobromine in Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*) and Other *Ilex* Species. *J Braz Chem Soc.* 1999;10(6):443–6.
  41. Costa GM. ESTUDIO QUÍMICO DE ESPÉCIES BRASILEIRAS E COLOMBIANAS DO GÊNERO *Passiflora*. 2013;1–125.
  42. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Vol. 29, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2011. 601–608 p.
  43. Alarcón T, Baquero M, Domingo D, López-Brea M, Royo G. Diagnóstico

- microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. Procedimientos en Microbiol Clínica [Internet]. 2004;1–25. Disponible en: [www.seimc.org](http://www.seimc.org)
44. Costa GM, Gazola AC, Zucolotto SM, Castellanos L, Ramos FA, Reginatto FH, et al. Chemical profiles of traditional preparations of four South American *Passiflora* species by chromatographic and capillary electrophoretic techniques. *Brazilian J Pharmacogn* [Internet]. 2016;26(4):451–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.02.005>
  45. Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Int Pharm Sci*. 2011;1(1):98–104.
  46. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez AG, Nakamura CV, Prado B, et al. Screening PI Medicinaiis 2.Pdf. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(October):1027–31.
  47. Buduba C. Mutagénesis y antimutagénesis en extractos acuosos , clorofórmicos y acetónicos de *Ilex paraguariensis* var . *paraguariensis* e *Ilex dumosa* var . *dumosa*. 2011;30–36.
  48. González Coria J, Horianski M. Actividad Antibacteriana in vitro de extractos Hidroalcohólicos secos de Yerba Mate elaborada procedente de Paraguay. *Rev Cienc y Tecnol*. 2018;(30):1–10.
  49. Cualla, D. (2019). Tesis de Maestría. Programa de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
  50. A. García-Ruiz *et al.*, “Guayusa (*Ilexguayusa* L.) new tea: phenolic and carotenoid composition and antioxidant capacity,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 97, no. November 2016, pp. 3929–3936, 2017, doi: 10.1002/jsfa.8255.