

**EFECTO HIPOLIPEMIANTE DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS Y
DEL JUGO DE *Passiflora edulis* EN UN MODELO CELULAR
HEPÁTICO**

TESIS DE GRADO

Para optar al título de DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Presentado por:

JOHANNY AGUILLÓN OSMA

Facultad: CIENCIAS DE LA SALUD

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Armenia – Quindío

2020

**EFECTO HIPOLIPEMIANTE DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS Y
DEL JUGO DE *Passiflora edulis* EN UN MODELO CELULAR
HEPÁTICO**

TESIS DE GRADO

Para optar al título de DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Tutora:

NELSY LOANGO CHAMORRO PhD.

Co-tutora:

PATRICIA LANDAZURI PhD.

Comité Tutorial

MARÍA ELENA MALDONADO CELIS PhD.

LEONARDO PADILLA SANABRIA PhD.

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Armenia- Quindío

2020

Nota de aceptación:

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Armenia, 2020

DEDICATORIA

Este trabajo de grado es dedicado a mi hija María Camila, porque por ella me levanto cada día y es ella quien me motiva a seguir adelante.

También quiero dedicar este trabajo a la memoria de mi Abuelo Arturo Osma, quien me enseñó, lo que la academia no puede, a ser hijo, padre, hermano.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme esta experiencia académica y de vida, por fortaleza para enfrentar cada situación adversa que se me presenta. Así mismo, le agradezco por poner en mi camino personas extraordinarias que me han apoyado, me han animado y me han corregido cada vez que fue necesario, por este motivo, me gustaría expresarles mis agradecimientos a todas ellas.

A mi directora, Nelsy Loango, por el apoyo y respaldo que me brindó durante todo el proceso, porque más que mi tutora, es mi gran amiga.

A Minciencias, por el apoyo económico a través del crédito-beca de la convocatoria 727 de 2015, doctorados nacionales.

A los integrantes del grupo de investigación GECAVYME, especialmente a mis estudiantes Johan Villada y Sebastián León y en general a todos los integrantes del laboratorio.

Al Instituto Tecnológico Metropolitano de Medellín, en particular al grupo de Investigación Biomédica e Innovación, por acogerme en la realización de la pasantía nacional y los conocimientos brindados en el manejo del cultivo celular.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, en especial al Departamento de investigación y Posgrado en Alimentos, por permitirme la realización de mi pasantía internacional, y por todos los conocimientos adquiridos.

A mi pareja, Jenny Paola, quien me ha soportado y ha estado a mi lado, en todo este transcurrir, en las alegrías, pero en especial en las tristezas y en las frustraciones.

A mi familia, especialmente a mi madre, que han sido la fuente de motivación y razón para avanzar en mis estudios.

A mis docentes y compañeros, en especial al Dr. Jhon Carlos Castaño y a Carlos Andrés, por su constante colaboración; y a todas las personas que de una u otra forma aportaron para la realización de este proyecto.

Tabla de contenido

	Pag.
Lista de figuras	IX
Lista de tablas	X
Lista de Anexos	XI
Resumen	XII
Capítulo I.	
Introducción	1
Metabolismo del colesterol	1
Metabolismo de triglicéridos	4
Medicina tradicional	5
<i>Passiflora edulis</i> (maracuyá)	5
Modelos celulares	6
Bibliografía	8
Artículo 1.	
Modelos celulares hepáticos para el estudio del metabolismo de los lípidos	11
Capítulo II.	
Objetivos de la investigación	12
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
Capítulo III.	
Componentes fenólicos y oligosacáridos de los extractos de <i>Passiflora edulis</i>	14
Introducción	14
Metodología	15
Obtención del material vegetal	15
Preparación de los extractos etanólicos de las hojas de <i>Passiflora edulis</i>	16
Preparación del jugo del fruto de <i>Passiflora edulis</i>	16
Determinación del contenido fenólico total	17
Determinación del contenido sacárido total	17

Determinación del contenido flavonoide total	17
Determinación del contenido total de taninos	17
HPLC del contenido fenólico	18
HPLC del contenido sacárido	18
Resultados	19
Discusión	21
Conclusiones	25
Bibliografía	25

Capítulo IV.

Citotoxicidad y actividad apoptótica de los extractos de hojas y de jugo

de <i>Passiflora edulis</i>	29
Introducción	29
Bibliografía	30

Artículo 2.

Citotoxyc and apoptotic activity of extracts from leaves and juice of <i>Passiflora edulis</i>	31
--	----

Capítulo V.

Bioaccesibilidad y actividad antioxidante de los componentes del extracto de

hojas y jugo de <i>Passiflora edulis</i>	32
Introducción	32
Bibliografía	33

Artículo 3.

Impact of in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility and antioxidant capacity of bioactive compounds from Passion fruit (<i>Passiflora edulis</i>) leaves and juices extracts	33
--	----

Capítulo VI.

Efecto de los extractos de *Passiflora edulis* sobre la actividad de la enzima

α-glucosidasa	34
Introducción	34
Metodología	37
Obtención del material vegetal	37
Preparación de los extractos etanólicos de las hojas de <i>Passiflora edulis</i>	37
Preparación del jugo del fruto de <i>Passiflora edulis</i>	38

Análisis fitoquímico de los extractos de <i>P. edulis</i>	38
Evaluación de la actividad antioxidante	40
Evaluación de la inhibición de la enzima α -glucosidasa	40
Resultados	41
Discusión	43
Conclusiones	47
Bibliografía	47

Capítulo VII.

Efecto de los extractos de *Passiflora edulis* sobre la concentración de lípidos en

células HepG2	52
Introducción	52
Metodología	53
Evaluación cualitativa – Tinción Oil Red	54
Evaluación cuantitativa – Cuantificación de colesterol y triglicéridos	55
Cálculos para la cuantificación de lípidos	56
Resultados	57
Evaluación cualitativa de lípidos	57
Evaluación cuantitativa de lípidos	59
Discusión	65
Conclusión	68
Bibliografía	68

Capítulo VIII.

Conclusiones generales	71
Recomendaciones	72
Anexos	73

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1.	Metabolismo de colesterol	2
Figura 2.	Metabolismo de triglicéridos	4

Capítulo VI

Figura 1.	Mapa con coordenadas geográficas globales del corregimiento Tierra-blanca (Roldanillo – Valle del Cauca)	37
Figura 2.	Porcentaje de inhibición α -glucosidasa de los extractos de <i>P. edulis</i>	43
Figura 3.	Porcentaje de inhibición del radical DPPH de los extractos de <i>P. edulis</i>	44

Capítulo VII

Figura 1.	Inhibición de la acumulación lipídica de los extractos de <i>P. edulis</i>	57
Figura 2.	Fotografías de las células HepG2 (40X) tratadas con los extractos de <i>P. edulis</i>	59
Figura 3.	Concentración de triglicéridos en las células HepG2 tratadas con extracto de jugo de <i>P. edulis</i>	61
Figura 4.	Concentración de colesterol en las células HepG2 tratadas con extracto de jugo de <i>P. edulis</i>	62
Figura 5.	Concentración de triglicéridos en las células HepG2 tratadas con extracto de hojas de <i>P. edulis</i>	63
Figura 6.	Concentración de colesterol en las células HepG2 tratadas con extracto de hojas de <i>P. edulis</i>	65

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Capítulo III		
Tabla 1.	Contenido fitoquímico de los extractos de <i>P. edulis</i> .	19
Tabla 2.	HPLC-DAD de los componentes polifenólicos de los extractos de <i>P. edulis</i>	20
Tabla 3.	HPLC-DAD de los componentes sacáridos de los extractos de <i>P. edulis</i>	21
Capítulo VI		
Tabla 1.	Contenido polifenólico, polisacárido y flavonoide de los extractos de <i>P. edulis</i> .	42

LISTA DE ANEXOS

		Pág.
Anexo 1.	Certificado de tutoría de estudiante de maestría (IV)	73
Anexo 2.	Certificado de tutoría de estudiante de maestría (continuidad)	74
Anexo 3.	Certificado tutor pregrado	75
Anexo 4.	Otros artículos publicados	76
Anexo 5.	Participación en eventos internacionales	77
Anexo 6.	Participación en eventos nacionales	81
Anexo 7.	Reconocimientos	82

RESUMEN

Los cambios en los estilos de vida y en la rutina dietaria de la población mundial parecen ser responsables del incremento observado de las enfermedades metabólicas como el hígado graso, asociada al desarrollo de otras enfermedades como diabetes mellitus tipo II e hiperlipidemia. Su prevalencia está aumentando incluso en niños y adolescentes, convirtiéndose en un serio problema de salud pública. El uso de plantas medicinales, es investigado debido a que compuestos bioactivos como los polifenoles o los sacáridos han mostrado efectos significativos sobre la regulación del metabolismo lipídico. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto hipolipemiente de los extractos de hojas y del jugo de *Passiflora edulis* en las células HepG2.

Se obtuvo extracto etanólico de hojas (EEH) y del jugo (EJ) de *P. edulis*; caracterizando sus componentes fitoquímicos, se avaluó la viabilidad celular y la reducción de la acumulación de lípidos en las células HepG2 estimuladas con ácido oleico; finalmente se determinó la bioaccesibilidad de los componentes de los extractos y la inhibición de la enzima α -glucosidasa.

Como resultados, se evidenció un mayor contenido fenólico y flavonoide en EEH y mayor contenido sacárido en el EJ, los componentes fenólicos y ácido ascórbico de ambos extractos presentan una bioaccesibilidad considerable con coeficientes de permeabilidad altos. Los extractos a 200 μ g/mL no afectan la viabilidad de las células. En ensayos cualitativos, ambos extractos presentan reducción significativa de la acumulación de lípidos, siendo el extracto EJ el que mostró una reducción del 77% de la acumulación de triglicéridos intracelulares a 24 horas. Finalmente, se observó que ambos extractos tienen la capacidad de inhibir la actividad de la enzima α -glucosidasa y el extracto EEH presenta una actividad antioxidante del 93%. En conclusión, los extractos de *P. edulis* poseen compuestos bioactivos con importancia biomédica; siendo el extracto EJ el que posee actividad hipolipemiente.

Palabras claves: *P. edulis*, hipolipemiente, polifenoles, triglicéridos.

ABSTRACT

Changes in lifestyles and dietary routines of the world population seem to be responsible for the observed increase in metabolic diseases such as fatty liver, associated with the development of other diseases such as type II diabetes mellitus and hyperlipidemia. Its prevalence is increasing even in children and adolescents, becoming a serious public health problem. The use of medicinal plants is being investigated because bioactive compounds such as polyphenols or saccharides have shown significant effects on the regulation of lipid metabolism. The objective of this work was to evaluate the lipid-lowering effect of the *Passiflora edulis* leaf extracts and the juice on HepG2 cells.

Ethanol extract of leaves (EEH) and juice (EJ) of *P. edulis* was obtained; characterizing its phytochemical components, the cell viability and the reduction of lipid accumulation in HepG2 cells stimulated with oleic acid were evaluated; finally, the bioaccessibility of the extract components and the inhibition of the α -glucosidase enzyme were determined.

As results, a higher phenolic and flavonoid content was evidenced in EEH and a higher saccharide content in EJ, the phenolic components and ascorbic acid of both extracts present considerable bioaccessibility with high permeability coefficients. Extracts at 200 $\mu\text{g/mL}$ do not affect the viability of the cells. In qualitative tests, both extracts showed a significant reduction in lipid accumulation, with the EJ extract showing a 77% reduction in intracellular triglyceride accumulation at 24 hours. Finally, it was observed that both extracts have the ability to inhibit the activity of the α -glucosidase enzyme and the EEH extract has an antioxidant activity of 93%. In conclusion, *P. edulis* extracts have bioactive compounds with biomedical importance; the EJ extract being the one with hypolipidemic activity.

Key words: *P. edulis*, hypolipidemic, polyphenols, triglycerides

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Los lípidos son un componente fundamental de la dieta, aportan energía necesaria para desarrollar las actividades propias del organismo y las derivadas de la actividad física; son un componente importante en la estructura y funcionamiento de las células del organismo y además participan en la regulación metabólica de hormonas, vitaminas, prostaglandinas, entre otras moléculas. Sin embargo, se convierten en un problema de salud cuando se encuentran en exceso (1).

Los cambios en los estilos de vida y en la rutina dietaría de la población mundial parecen ser responsables del incremento observado de las enfermedades metabólicas como la hiperlipidemia, con demostrada incidencia en la generación de otras enfermedades como diabetes, hipertensión arterial y enfermedades cardiovasculares (infarto al miocardio, accidente cerebrovascular, entre otras) (2).

Metabolismo de Colesterol

El hígado juega un papel importante en la homeostasis lipídica, en especial en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos (TG) y en la producción de lipoproteínas plasmáticas que aseguran el transporte de lípidos endógenos y exógenos entre los órganos (3). Una de las funciones del hígado es la síntesis de colesterol a través de una amplia serie de reacciones, entre las cuales se generan interacciones con los tejidos periféricos y el intestino; su equilibrio es regulado por mecanismos de retroalimentación entre las vías endógena y exógena (4). La inhibición de absorción de colesterol intestinal aumenta la actividad de la hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoAR) intensificando su síntesis en el hígado. En cambio, una captación intestinal elevada de colesterol inhibe la HMGCoAR, reduce la síntesis hepática y produce una regulación negativa de los receptores de las lipoproteínas de baja densidad (LDLr), lo que reduce la captación de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Por el contrario, cuando existe una disminución en las concentraciones de colesterol, los LDLr son regulados al alza y dan lugar a un aumento de la eliminación de partículas de LDL de la sangre (5).

Los lípidos plasmáticos (TG, ésteres del colesterol, fosfolípidos y colesterol libre) deben ser transportados por lipoproteínas. Los lípidos de la dieta (vía exógena) son absorbidos en el intestino por los quilomicrones; luego, los quilomicrones se someten a lipólisis rápida por parte de la lipoproteína lipasa (LPL), un proceso que elimina algunos de los TG y deja pequeños remanentes de

quilomicrones que internalizan el resto de los lípidos de la dieta al hígado. En la vía endógena, el hígado utiliza los remanentes de quilomicrones, lípidos y colesterol endógeno para producir las partículas de VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad) (Figura 1). Las VLDL son lipoproteínas ricas en TG que contienen entre 10-15% del colesterol plasmático, fosfolípidos y un conjunto característico de apolipoproteínas: Apo B-100, Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III y Apo E. Estas lipoproteínas son transportadas por la sangre desde el hígado hasta el músculo y el tejido adiposo, donde la LPL se activa gracias a la Apo C-II, hidrolizando los TG de las VLDL y liberando ácidos grasos libres que pueden ser almacenados por los adipocitos (6). Las LDL que han sido sintetizadas en el hígado tienen una concentración alta de colesterol y moderada de fosfolípidos y no contienen TG. Su apolipoproteína asociada de mayor importancia es Apo B-100, indispensable para unirse al LDLr. El desequilibrio entre estas vías de síntesis y degradación se encuentra asociado con el desarrollo de diferentes enfermedades cardiovasculares y metabólicas (7).

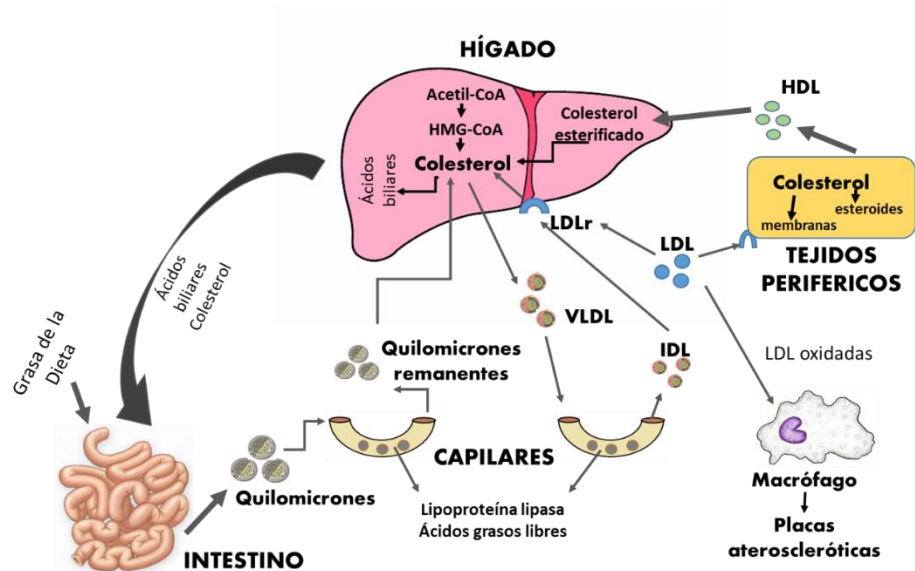


Figura 1. Metabolismo de colesterol. Fuente elaboración propia

Metabolismo de triglicéridos

En circunstancias normales, a diario, el hígado procesa grandes cantidades de ácidos grasos (FA), pero almacena solo pequeñas cantidades en forma de TG, siendo estos contenidos de TG inferiores al 5% (8). Las tres fuentes principales de ácidos grasos hepáticos (FA) son los lípidos de la dieta, los ácidos grasos derivados del tejido adiposo y los ácidos grasos sintetizados de *novo*; las tasas de adquisición de FA por captación del plasma y de síntesis de *novo* dentro del hígado se equilibran con las tasas de oxidación y secreción de FA en plasma como lipoproteínas de muy baja densidad

enriquecida con TG 60% (VLDL-TG). Las cantidades relativamente pequeñas de TG almacenadas en el hígado se localizan en goticas de lípidos citoplasmáticos (9).

Después de una comida, los lípidos de la dieta se hidrolizan dentro del lumen intestinal. Tras la absorción intestinal, los FA se reesterifican para formar moléculas de TG, que se empaquetan en quilomicrones y se distribuyen principalmente al tejido muscular y adiposo (10). Los TG restantes presentes en los restos de quilomicrones se transportan al hígado donde son introducidos a los hepatocitos a través del mecanismo de endocitosis mediado por receptores para ser procesados intracelularmente, llevando a la liberación de FA. Ya dentro del hepatocito, los FA se esterifican a glicerol-3-fosfato (G3P) y a colesterol para generar TG o ésteres de colesterol, respectivamente. Estos lípidos neutros pueden almacenarse en goticas de lípidos citoplasmáticos (LD) o secretarse al torrente sanguíneo como partículas de VLDL (Figura 2A) (11). Los FA dentro del hígado también se puede utilizar para la síntesis de otros lípidos complejos, incluidos los fosfolípidos (PL). Durante el ayuno, los FA se utilizan como fuente de energía local y como sustrato para la producción de cuerpos cetónicos (Figura 2B) (12).

En condiciones de abundancia de nutrientes, el principal combustible del hígado es la glucosa en lugar de la grasa. Los ácidos grasos no se someten a β -oxidación y, en cambio, se incorporan a los triglicéridos para su almacenamiento en vacuolas de lípidos o su secreción en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Figura 2A). Así entonces, el hígado utiliza la glucosa para lipogénesis de *novo* (DNL) aumentando la producción de FA. El control de la DNL es principalmente transcripcional; la insulina plasmática activa al factor de transcripción unido a la membrana del retículo endoplásmico, la proteína de unión al elemento regulador de esterol 1 (SREBP1), cuyo extremo N terminal se transloca al núcleo y regula al alza todos los genes en la vía de biosíntesis de los FA (13). La captación hepática del exceso de glucosa en plasma promueve la translocación nuclear de la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP), un factor de transcripción que también regula al alza la transcripción de la mayoría de los genes de biosíntesis de los FA, así como de piruvato quinasa, lo que aumenta la disponibilidad de citrato para la síntesis de FA (14).

En el contexto de resistencia a la insulina, los niveles de FA hepáticos aumentan debido al aumento de la lipólisis dentro de los adipocitos, lo que conduce a un aumento de los niveles circulantes de FA en el torrente sanguíneo y un aumento de DNL hepático. El aumento de la captación de FFA y quizás el aumento de la síntesis de *novo* de grasa en el hígado sobrepasa la capacidad de oxidación de ácidos grasos, lo que conduce a la acumulación de grasa y, finalmente, al desarrollo de hepatoesteatosis o hígado graso (15) (Figura 2C).

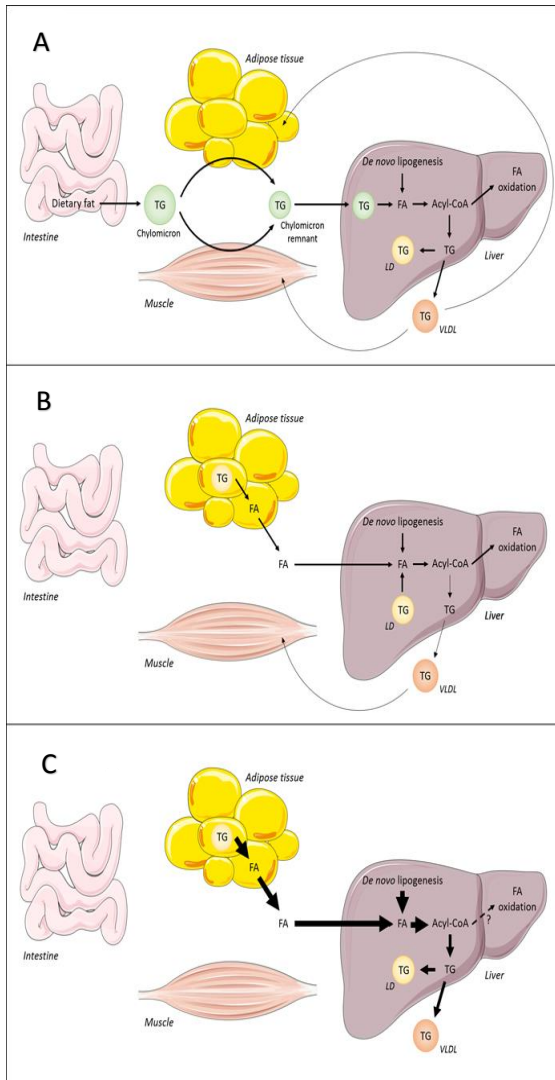


Figura 2. Metabolismo de triglicéridos. A. En ingesta de alimentos. B. En ayuno. C. En hígado graso. Las fechas resaltadas indican aumento del proceso. Alves-Bezerra M (2018).

La enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), es la enfermedad hepática crónica más común, afectando entre el 10 y el 35% de la población mundial, se caracteriza por una acumulación excesiva de TG dentro del hígado. Se asocia con obesidad, diabetes mellitus tipo II y dislipidemia, y ocurre comúnmente en el contexto de resistencia a la

insulina (16). NAFLD abarca un espectro de histopatologías hepáticas desde la esteatosis hepática simple, a menudo denominada hígado graso no alcohólico (NAFL), hasta la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cuya esteatosis hepática se acompaña de inflamación, muerte celular y fibrosis (17). Las complicaciones hepáticas de NASH incluyen cirrosis y desarrollo de carcinoma hepatocelular (7).

Actualmente, no existen terapias efectivas para NAFLD aparte de los cambios en el estilo de vida que conducen a una mejor condición física y pérdida de peso. Para desarrollar terapias farmacológicas efectivas, es esencial el conocimiento detallado de los mecanismos celulares y moleculares que conducen al metabolismo de los lípidos hepáticos alterado (18). La Organización Mundial de la Salud (OMS) (19), proyecta para el año 2020 que las enfermedades crónicas no transmisibles representarán casi el 75 % del total de defunciones, de las cuales un 75 % de las muertes será ocasionadas por accidentes cerebrovasculares. Es por esto que el reconocimiento de la hiperlipidemia, así como la enfermedad de hígado graso no alcohólica, como factores de riesgo, ha conducido al desarrollo de fármacos de naturaleza química que disminuyen la concentración plasmática de lípidos. Con la finalidad de combatir estas patologías y mantener controlados los niveles de lípidos en sangre, se utilizan diversos tratamientos farmacológicos entre los que se

destacan: secuestradores de ácidos biliares, inhibidores de la HMG-CoAR, derivados del ácido fólico, derivados del ácido nicotínico, entre otros; sin embargo, estos presentan efectos secundarios indeseables tales como: flatulencia, distensión abdominal, estreñimiento, diarrea, formación de cálculos vesiculares, insuficiencia renal. Por esta razón, se ha incrementado el estudio de fitofármacos que permitan prevenir el desarrollo de estos trastornos metabólicos, de modo que sea posible revertir o enlentecer el progreso de ellos (20).

Medicina Tradicional

En los últimos años, el tratamiento de las enfermedades con base en los productos obtenidos de las plantas ha tenido un resurgimiento, especialmente en los países desarrollados. Las explicaciones de este fenómeno básicamente se dan debido a: las plantas contienen sustancias que no han podido ser sintetizadas; los efectos secundarios de las drogas de síntesis pueden ser bastante nocivos, y el conocimiento que ofrecen numerosas investigaciones científicas que se han realizado en relación a la composición de las plantas y los metabolitos que participan en el control de las enfermedades.

Con respecto a las dislipidemias o los desequilibrios en la concentración de lípidos; son varias las plantas que se utilizan para contrarrestar o mejorar los desórdenes causados por estas condiciones patológicas. Se destacan el ajo, la manzana, la alcachofa, la cebolla, el jengibre, la mora, el aloe vera, entre otras (21–27). Así mismo se ha observado que *Passiflora edulis* posee ciertos compuestos de naturaleza flavonoide; de los cuales se ha mostrado que presentan propiedades antioxidantes, vasodilatadoras, antihipertensivas, anticancerígenas y hipolipemiantes (28–33); por esta razón esta planta se convierte en un excelente blanco de estudio que permite evidenciar las propiedades hipolipemiantes presentes entre sus componentes.

***Passiflora edulis* (maracuyá)**

El género *Passiflora* comprende cerca de 520 especies y es el más grande en la familia *Passifloraceae*. *Passiflora edulis* es una planta originaria de la Amazonía brasileña, conocida con el nombre común de maracuyá, parchita, o fruto de la pasión. Aproximadamente el 96 % de estas especies están distribuidas en América, aunque hay registros de especies en India, China, Australia y algunas islas del pacífico; pero Brasil y Colombia, en particular, poseen más del 30 % de las especies de las *Passifloras* (34).

Passiflora edulis es una especie cultivada ampliamente en países tropicales y subtropicales; existen dos variedades: *Passiflora edulis* Sims var. *flavicarpa*, cuyos frutos son amarillos, crece desde el nivel del mar hasta 1000 msnm; y, *Passiflora edulis* Sims var. *Purpura*, con frutos color púrpura y que se adapta a zonas altas por encima de 1200 msnm (34). La maracuyá es una planta leñosa perenne,

de hábitos trepador y de rápido desarrollo, que puede alcanzar hasta 10 m de largo; con los tallos huecos leñosos, hojas alternas largamente pecioladas, divididas en tres lóbulos y con el margen finamente dentado; las flores son solitarias y axilares, fragantes y vistosas, con cinco sépalos de color verdoso, corola de cinco pétalos con numerosos apéndices petaloides filiformes de color blanco y rojo púrpura; el fruto es una baya esférica, globosa o elipsoide, que mide hasta 10 cm de diámetro y pesa hasta 190 g, de color amarillo o purpúreo, con una pulpa muy aromática y contiene numerosas semillas. La planta se sujeta a los soportes por medio de unos zarcillos situados en la axila de las hojas (35).

La información etnofarmacológica revela que *Passiflora edulis* ha sido utilizada en medicina tradicional en diversas partes del mundo, con diferentes usos. Sin embargo, no todos estos usos han sido comprobados a través de ensayos científicos. Dentro de los beneficios a la salud de esta planta se puede mencionar: actividad antioxidante (36), actividad ansiolítica y sedativa (37), efecto antihipertensivo (38), efecto anticancerígeno (28,39), actividad antibacterial (40) y reducción de la glicemia (30,41,42).

En Brasil, en los últimos años, se han realizado investigaciones que demuestran el uso de esta planta en la reducción de las concentraciones de lípidos en sangre, tanto en modelos animales como en humanos (32,43–47), encontrando significativas reducciones de colesterol total, triglicéridos, LDL y aumento de las HDL, sin causar toxicidad o daño hepático; sin embargo, se desconoce cuál es el mecanismo molecular que modula tales efectos. Por otra parte, el estudio fitoquímico de *Passiflora edulis* demuestra la presencia de alcaloides, saponinas, fenoles, carotenoides, antocianinas, ácido L-ascórbico, γ -lactonas, aceites volátiles, aminoácidos, carbohidratos y minerales, así como glucósidos, entre ellos passiflorina y glucósidos flavonoides; los cuales podrían ser los responsables de las capacidades para disminuir las concentraciones de colesterol y TG, así como de los efectos hipertensivos y su capacidad antioxidante, como se ha observado en trabajos previos por parte de nuestro grupo de investigación, en los cuales se observó que el jugo de *P. edulis* inhibe la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en un 40 % a una concentración de 0,1 mg/ml (38) y que tanto el extracto etanólico de hojas como el jugo de esta planta presentan una inhibición de la hemólisis por peróxido de hidrógeno del 98 %, así como un EC_{50} para DPPH de 0,096 mg/ml, lo que indica su considerable actividad antioxidante (36).

Modelos Celulares

Los modelos celulares ofrecen la oportunidad de estudiar detalles específicos de los mecanismos bioquímicos, genéticos y fisiológicos de diferentes aspectos como: el metabolismo de lípidos, el

metabolismo de la glucosa o la respuesta toxicológica frente a fármacos, así como los mecanismos moleculares entre los que se destacan, expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo, vías de señalización o inhibición de proteínas a través de ARNs de interferencia (3). En el caso del estudio del metabolismo lipídico en células hepáticas, se ha empleado incubación en los medios de cultivo con ácidos grasos, comparando el efecto causado por la adicción al cultivo de ácidos grasos saturados e insaturados de forma individual o combinados.

Las metodologías de los cultivos celulares aisladas de hígado humano, han sido mejoradas en los últimos años y en la actualidad se tienen una variedad de modelos de líneas celulares inmortalizadas de hepatoma, entre las que se destacan las células HepG2 y las células HepaRG, las cuales tienen la capacidad de biotransformación, situación que es crucial en estudios toxicológicos y metabólicos (48). Entre los modelos celulares más utilizados para el estudio del metabolismo de los lípidos en el hígado se encuentran los hepatocitos primarios y las células HepG2:

El mejor modelo *in vitro* para el estudio de los mecanismos que controlan el metabolismo de los lípidos y la glucosa en humanos son los hepatocitos primarios (49,50). Desafortunadamente, existe una disponibilidad limitada del tejido de hígado humano para el aislamiento celular, además de una amplia variabilidad entre los donantes de este tejido (51). Por otra parte, a pesar de la optimización de las condiciones de cultivo, estas células aisladas pierden irreversiblemente su fenotipo hepático y su capacidad proliferativa es muy limitada (52).

Las líneas celulares de hepatocitos humanos son una buena alternativa de reemplazo con respecto a los hepatocitos primarios; entre ellas podemos mencionar a las células HepG2. Estas son células derivadas de hepatoblastoma humano, las cuales se comportan similar a los hepatocitos humanos normales (3,48). Para algunos investigadores, estas células presentan acumulación de TG cuando se adicionan al medio de cultivo ácidos grasos exógenos (53); mientras que otros autores reportan que la acumulación de TG solo ocurre cuando se utiliza ácido oleico (3).

Entre los procesos metabólicos que han sido estudiados en este modelo celular, se destacan: estudios del metabolismo de las lipoproteínas, la síntesis de ácidos biliares, metabolismo del colesterol, metabolismo de medicamentos, enzimas hepáticas, transporte de glucosa, entre otros; estas vías han sido evaluadas procurando mantener el ambiente de los hepatocitos normales y por lo tanto favoreciendo incluso, aplicaciones más amplias de esta línea celular sobre problemas biológicos, en los cuales está involucrado el funcionamiento hepático (52,53) También se ha demostrado que las células HepG2 tienen la capacidad de sintetizar ácidos biliares a partir de colesterol (54).

La composición de lípidos en cultivo de las células HepG2, es comparable con la encontrada en hígado humano normal (53), en donde a pesar de la reducción de la síntesis de ácidos grasos de *novo*, no se encontraron diferencias significativas entre las células HepG2 con relación a hepatocitos primarios o hepatocitos frescos. Es decir, que las células HepG2 tienen una alta capacidad para la síntesis de TG a partir de ácido oleico, resultando en una alta acumulación a nivel intracelular y muy baja secreción al medio; así mismo, este modelo celular tienen la capacidad de expresar los receptores de insulina, transferrina y los receptores de las lipoproteínas de baja densidad (LDLr) y se ha documentado la capacidad de sintetizar y de excretar lipoproteínas como: VLDL, HDL y en mayor proporción, LDL (51), por esta razón este modelo celular se ha catalogado como un sistema estándar para estudiar el metabolismo y la síntesis de las lipoproteínas, siendo esta una de las conclusiones del artículo de revisión de los modelos celulares utilizados para el estudio del metabolismo lipídico, el cual se anexa al final de este capítulo.

Con base en lo anterior, se planteó como objetivo de esta investigación, evaluar el efecto hipolipemiante de los extractos etanólicos de las hojas y acuosos del jugo de *Passiflora edulis* en el modelo celular hepático HepG2.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lehninger. Principios de bioquímica. Omega 6a Edición. 2015. 1196 p.
2. Miname MH, Santos RD. Reducing cardiovascular risk in patients with familial hypercholesterolemia : Risk prediction and lipid management. *Prog Cardiovasc Dis.* 2019; 62 (5): 414–22.
3. Green CJ, Pramfalk C, Morten KJ, Hodson L. From whole-body to cellular models of hepatic triglyceride metabolism: man has got to know his limitations metabolism: man has got to know his limitations. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014; doi: org/10.1016/j.arteri.00192.2014.
4. Navarro V, Zabala A, Gómez S, Portillo M del P. Metabolismo del colesterol: Bases actualizadas. *Rev Esp Obes.* 2009; 7 (6): 360–84.
5. Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9 (2): 125–38.
6. Lafontan M. Historical perspectives in fat cell biology: the fat cell as a model for the investigation of hormonal and metabolic pathways. *AJP Cell Physiol.* 2012; 302 (2): C327–59.
7. Dewidar B, Kahl S, Pafili K, Roden M. Metabolic liver disease in diabetes – From mechanisms to clinical trials. *Metabolism.* 2020; (154299).
8. Errico TL, Chen X, Martin JM, Julve J, Escolà-gil JC, Blanco-vaca F. Mecanismos básicos : estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas. *Clínica e Investig en Arterioscler.* 2013; 25 (2): 98–103. doi.org/10.1016/j.arteri.2013.05.003
9. Kockx M, Kritharides L. Triglyceride - Rich Lipoproteins. *Cardiol Clin.* 2018; 36 (2): 265–75.
10. Mansbach CM, Siddiqi S, Mansbach Ii CM, Siddiqi S. Control of chylomicron export from the intestine. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2016; 310 (9): G659–68. doi/10.1152/ajpgi.00228.2015
11. Alves-Bezerra M, Cohen DE. Triglyceride metabolism in the liver. *Compr Physiol.* 2018; 8 (1): 1–22.

12. Puchalska P, Crawford PA. Multi-dimensional roles of ketone bodies. *Physiol Behav.* 2019; 176 (3): 139–48.
13. Fang D, Wan Y, Shen W, Cao J, Sun Z, Yu H, et al. Endoplasmic reticulum stress leads to lipid accumulation through upregulation of SREBP-1c in normal hepatic and hepatoma cells. *Mol Cell Biochem.* 2013;381 (1–2): 127–37. doi:10.1007/s11010-013-1694-7
14. Iizuka K, Takao K, Kato T, Horikawa Y, Takeda J. ChREBP reciprocally regulates liver and plasma triacylglycerol levels in different manners. *Nutrients.* 2018; 10 (11): 1–11.
15. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism.* 2019; 92: 82–97. doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.014
16. Younossi Z, Tacke F, Arrese M, Chander Sharma B, Mostafa I, Bugianesi E, et al. Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology.* 2019; 69 (6): 2672–82.
17. Bellentani S. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2017; 37 (6): 81–4.
18. Han E, Lee Y. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: The Emerging Burden in Cardiometabolic and Renal Diseases. *Diabetes Metab J.* 2017; 41: 430–7. doi:x.php?id=10.4093%2Fdmj.2017.41.e28
19. Organización Mundial de la Salud. Plan de acción mundial para la prevención y el control de las enfermedades no transmisibles 2013–2020. 2013. 44 p.
20. Francini-pesenti F, Spinella P, Calò LA. Potential role of phytochemicals in metabolic syndrome prevention and therapy. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther.* 2019; 12: 1987–2002.
21. Sommella E, Badolati N, Riccio G, Salviati E, Bottone S, Dentice M, et al. Cholesterol-Lowering Effect of *Annona muricata* Polyphenols on Hepatic Cells. *Nutrients.* 2019; 11: 163–77.
22. Mocelin R, Marcon M, Santo GD, Zanatta L, Sachett A, Schönell AP, et al. Hypolipidemic and antiatherogenic effects of *Cynara scolymus* in cholesterol-fed rats. *Rev Bras Farmacogn.* 2016; 26 (2): 233–9. doi.org/10.1016/j.bjp.2015.11.004
23. Lee YG, Cho J, Hwang EJ, Jeon T, Moon J. Glu–Phe from onion (*Allium Cepa* L.) attenuates lipogenesis in hepatocytes. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2017; 81 (7): 1409–16. doi/full/10.1080/09168451.2017.1303358
24. Bekkouch O, Harnafi M, Touiss I, Khatib S, Harnafi H, Alem C, et al. In Vitro Antioxidant and In Vivo Lipid-Lowering Properties of *Zingiber officinale* Crude Aqueous Extract and Methanolic Fraction : A Follow-Up Study. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2019; 9: 13.
25. El-shazly SA, Al-harbi MMAMS. Physiological and molecular study on the anti-obesity effects of pineapple (*Ananas comosus*) juice in male Wistar rat. *Food Sci Biotechnol.* 2018; 27 (5): 1429–38.
26. Zeni ALB, Moreira TD, Dalmagro AP, Camargo A, Bini LA, Simionatto EL, et al. Evaluation of phenolic compounds and lipid-lowering effect of *Morus nigra* leaves extract. *An Acad Bras Cienc.* 2017; 89 (4): 2805–15.
27. Shakib Z, Razavi BM. Aloe vera as an herbal medicine in the treatment of metabolic syndrome : A review. 2019; 2649–60.
28. Aguillón J, Arango SS, Uribe DF, Loango N. Cytotoxic and apoptotic activity of extracts from leaves and juice of *Passiflora edulis*. *J Liver Res Disord Ther.* 2018; 4 (2): 67–71.
29. Kanakasabapathi D, Gopalakrishnan VK. Evaluation of Antidiabetic Potential of Aqueous Extract of *Passiflora edulis* Sims on Alloxan Induced Diabetes Mellitus in Wistar Albino Rats. 2015; 34 (27): 171–7.
30. Panchanathan S, Rajendran J. Evidence of Anti-hyperglycemic and Anti-oxidant Effect of *Passiflora edulis* flavicarpa (Sims.) in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Not Sci Biol.* 2015; 7 (4): 383–9.

31. Faveri A De, Faveri R De, Fronza M, Terranova I, Jagielski M, Paulo S, et al. Effects of passion fruit peel flour (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* O . Deg.) in cafeteria diet-induced metabolic disorders. *J Ethnopharmacol.* 2020; 250 (December 2019).
32. do Socorro Fernandes Marques S, Libonati RMF, Sabaa-Srur AUO, Luo R, Shejwalkar P, Hara K, et al. Evaluation of the effects of passion fruit peel flour (*Passiflora edulis* fo. *flavicarpa*) on metabolic changes in HIV patients with lipodystrophy syndrome secondary to antiretroviral therapy. *Rev Bras Farmacogn.* 2016; 1–7. doi.org/10.1016/j.bjp.2016.03.002
33. Kitada M, Ogura Y, Id HM, Sai M. The Effect of Piceatannol from Passion Fruit (*Passiflora edulis*) Seeds on Metabolic Health in Humans. *Nutrients.* 2017; 9: 1142.
34. Pacheco G, Simão MJ, Vianna MG, Garcia RO, Lucia M, Vieira C, et al. In vitro conservation of *Passiflora* — A review. *Sci Hortic (Amsterdam).* 2016; 211: 305–11.
35. Bonilla MM, Aguirre AC, Agudelo OM. Morfología de *Passiflora* : una guía para la descripción de sus especies *Passiflora* morphology : a guide for the description of species *Morfologia da Passiflora* : Uma Guia para a descrição. *Rev Investig Agrar y Ambient.* 2015; 6 (1): 91–110.
36. Aguillón J, Maldonado ME, Loango Chamorro N, Arango SAV. Antioxidant and antiproliferative activity of ethanolic and aqueous extracts from leaves and fruits juice. *Perspect En Nutr Humana.* 2013; 15: 13–25.
37. Ayres ASFSJ, de Araújo LLS, Soares TC, Costa GM, Reginatto FH, Ramos FA, et al. Comparative central effects of the aqueous leaf extract of two populations of *Passiflora edulis*. *Brazilian J Pharmacogn.* 2015; 25 (5): 499–505. doi.org/10.1016/j.bjp.2015.06.007
38. Restrepo RA, Loango N, Moncada M V, Landazuri P. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of *Passiflora edulis* f . *flavicarpa* and *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss. *Br J Pharm Res.* 2013; 3 (4): 776–85.
39. Ramírez V, Arango SS, Uribe D, Maldonado ME, Aguillón J. Effect of the Ethanolic Extract of *Passiflora edulis* F . *Flavicarpa* Leaves on Viability , Cytotoxicity and Apoptosis of Colon Cancer Cell Lines. *J Chem Pharm Res.* 2017; 9 (6):1 35–9.
40. Pereira MG, Maria G, Charles M, Isidoro W, Fabiane H, Hamerski F, et al. Effect of Extraction Process on Composition , Antioxidant and Antibacterial Activity of Oil from Yellow Passion Fruit (*Passiflora edulis* Var . *Flavicarpa*) Seeds. *Waste and Biomass Valorization.* 2018; 7(12):34-41.
41. Chandrasekhar D, Jose SM, Jomy A, Joseph A, Pradeep A, Geoji AS. Antiglycation property of *passiflora edulis* f . *Flavicarpa* deg . foliage in type 2 diabetic patients. *Clin Epidemiol Glob Heal.* 2019; 7 (3): 409–12.
42. Correa B cesar, Da Silva M, Taniguthi L, Ferreira JN, Quintino C, Vilegas W, et al. *Passiflora edulis* leaf extract: evidence of antidiabetic and antiplatelet effects in rats Bruno. *Biol Pharm Bull.* 2020; 43 (1): 169–74.
43. Soares S, Barbalho SM, Vieira M, Rudge C, Campos KE De, Carolina A, et al. Effects of *Passiflora edulis* (Yellow Passion) on Serum Lipids and Oxidative Stress Status of Wistar Rats. *J Med Food.* 2012; 15 (1): 78–82.
44. Janebro, Daniele Idalino; De Queiroz, Maria do socorro; Ramos, Alessandra T; Sabaa-Srur, Armando; Da Cunha M auxiliadora; DM. Efeito da farinha da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg .) nos níveis glicêmicos e lipídicos de pacientes diabéticos tipo 2. *Rev Bras Farmacogn.* 2008; 18: 724–32.
45. Goss MJ, Nunes MLO, Machado ID, Merlin L, Macedo NB, Silva AMO, et al. Peel flour of *Passiflora edulis* Var. *Flavicarpa* supplementation prevents the insulin resistance and hepatic steatosis induced by low-fructose-diet in young rats. *Biomed Pharmacother.* 2018; 102: 848–54. doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.137

46. Ubirajara A, Sabaa O, Pessoa MB. Avaliação das atividades hipoglicemiantes e hipolipemiantes da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*, f. flavicarpa). RBAC. 2009; 41 (2): 99–101.
47. Corrêa EM, Medina L, Barros-Monteiro J, Valle NO, Sales R, Magalães A, et al. the Intake of Fiber Mesocarp Passionfruit (*Passiflora Edulis*) Lowers Levels of Triglyceride and Cholesterol Decreasing Principally Insulin and Leptin. J aging Res Clin Pract. 2014; 3 (1): 31–5.
48. Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, López S, Guzmán C, Castell J V., Donato MT, et al. Human upcyte hepatocytes: Characterization of the hepatic phenotype and evaluation for acute and long-term hepatotoxicity routine testing. Toxicol Sci. 2016; 152 (1): 214–29.
49. Forte TM. Primary Hepatocytes in Monolayer Culture: A Model for Studies on Lipoprotein Metabolism. Annu Rev Physiol. 1984; 46 (1): 403–15. doi/10.1146/annurev.ph.46.030184.002155
50. Samanez CH, Caron S, Briand O, Dehondt H, Duplan I, Kuipers F, et al. The human hepatocyte cell lines IHH and HepaRG: models to study glucose, lipid and lipoprotein metabolism. Arch Physiol Biochem. 2012; 118: 102–11.
51. Aguillón-Osma J, Loango-chamorro N, Landazuri P. Modelos celulares hepáticos para el estudio del metabolismo de los lípidos . Revisión de literatura. Rev la Fac Med Univ Nac. 2019; 67 (1): 109–16.
52. Rowe C, Gerrard DT, Jenkins R, Berry A, Durkin K, Sundstrom L, et al. Proteome-wide analyses of human hepatocytes during differentiation and dedifferentiation. Hepatology. 2013; 58 (2): 799–809. doi.wiley.com/10.1002/hep.26414
53. Liu Y, Zhai T, Yu Q, Zhu J, Chen Y. Effect of high exposure of chlorogenic acid on lipid accumulation and oxidative stress in oleic acid-treated HepG2 cells. Chinese Herb Med. 2018; 10 (2): 199–205.
54. Green CJ, Johnson D, Amin HD, Sivathondan P, Silva MA, Wang LM, et al. Characterization of lipid metabolism in a novel immortalized human hepatocyte cell line. Am J Physiol - Endocrinol Metab. 2015; 309 (6): E511–22. doi/10.1152/ajpendo.00594.2014

ARTÍCULO DE REVISIÓN

DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v67n1.64964>

Modelos celulares hepáticos para el estudio del metabolismo de los lípidos. Revisión de literatura

Liver cell models for studying lipid metabolism. Literature review

Recibido: 15/05/2017. Aceptado: 16/10/2017.

Johanny Aguillón-Osma^{1,2} • Nelsy Loango-Chamorro³ • Patricia Landazuri⁴¹ Universidad del Quindío - Facultad de Educación - Programa de Licenciatura en Ciencias Naturales - Armenia - Colombia.² Escuela Normal Superior del Quindío - Armenia - Colombia.³ Universidad del Quindío - Facultad de Ciencias Básicas y tecnológicas – Programa de Biología - Armenia - Colombia.⁴ Universidad del Quindío - Facultad de Ciencias de la Salud - Programa de Medicina - Armenia - Colombia.

Correspondencia: Johanny Aguillón-Osma. Facultad de Educación, Universidad del Quindío. Carrera 15 Calle 12 Norte, edificio O, piso 1. Teléfono: +57 6 7359300, ext.: 346; celular +57 3117359277. Armenia. Colombia. Correo electrónico: jaguillon@uniquindio.edu.co.

| Resumen |

Introducción. El hígado juega un papel importante en la homeostasis lipídica, especialmente en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos. Una amplia variedad de modelos celulares ha sido utilizada para investigar el metabolismo lipídico hepático y para elucidar detalles específicos de los mecanismos bioquímicos del desarrollo y progresión de enfermedades relacionadas, brindando información para tratamientos que reduzcan su impacto. Los modelos celulares hepáticos poseen un alto potencial en la investigación del metabolismo de lípidos y de agentes farmacológicos o principios activos que permiten la reducción de la acumulación de lípidos.

Objetivo. Comparar algunos modelos celulares hepáticos utilizados para el estudio del metabolismo lipídico, sus características y los resultados más relevantes de investigación en ellos.

Materiales y métodos. Se realizó una búsqueda sistemática en bases de datos sobre los modelos celulares hepáticos de mayor uso para el estudio del metabolismo de lípidos.

Resultados. Se exponen los cinco modelos celulares más utilizados para este tipo de investigaciones, destacando su origen, aplicación, ventajas y desventajas al momento de estimular el metabolismo lipídico.

Conclusión. Para seleccionar el modelo celular, el investigador debe tener en cuenta cuáles son los requerimientos y el proceso que desea evidenciar, sin olvidar que los resultados obtenidos solo serán aproximaciones de lo que en realidad podría suceder a nivel del hígado como órgano.

Palabras clave: Hepatocitos; Triglicéridos; Ácido oleico (DeCS).

Aguillón-Osma J, Loango-Chamorro N, Landazuri P. Modelos celulares hepáticos para el estudio del metabolismo de los lípidos. Revisión de literatura. Rev. Fac. Med. 2019;67(1):109-16. Spanish. doi:

| Abstract |

Introduction: The liver plays an important role in lipid homeostasis, especially in the synthesis of fatty acids and triglycerides. A wide variety of cell models have been used to investigate liver lipid metabolism and to elucidate specific details of the biochemical mechanisms involved in the development and progression of related diseases, providing information for treatments that reduce their impact. Liver cell models have a high potential for the investigation of lipid metabolism, as well as pharmacological agents or active principles that allow the reduction of lipid accumulation.

Objective: To compare some liver cell models used for studying lipid metabolism, their characteristics and the most relevant research results.

Materials and methods: A systematic search of databases was performed on the most commonly used liver cell models for the study of lipid metabolism.

Results: The five most commonly used cell models for this type of research are presented in this paper, highlighting their origin, application, advantages and disadvantages when stimulating lipid metabolism.

Conclusion: In order to select a cell model, researchers should take into account the requirements and the process they wish to demonstrate, without forgetting that the results obtained will only be approximations of what could actually happen in the liver as an organ.

Keywords: Hepatocytes; Triglycerides; Oleic Acid (MeSH).

Aguillón-Osma J, Loango-Chamorro N, Landazuri P. [Liver cell models for studying lipid metabolism. Literature review]. Rev. Fac. Med. 2019;67(1):109-16. Spanish. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v67n1.64964>.

Introducción

El hígado juega un papel importante en la homeostasis lipídica, en especial en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos (TG) y en la producción de lipoproteínas plasmáticas que aseguran el transporte de lípidos endógenos y exógenos entre los órganos (1,2).

Una de las funciones del hígado es la síntesis de colesterol a través de una amplia serie de reacciones, entre las cuales se generan interacciones con los tejidos periféricos y el intestino; su equilibrio es regulado por mecanismos de retroalimentación entre las vías

endógena y exógena (3). La inhibición de absorción de colesterol intestinal aumenta la actividad de la hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoAR) intensificando su síntesis en el hígado (4). En cambio, una captación intestinal elevada de colesterol inhibe la HMG-CoAR, reduce la síntesis hepática y produce una regulación negativa de los receptores de las lipoproteínas de baja densidad (LDLr), lo que reduce la captación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (5). Por el contrario, cuando existe una disminución en las concentraciones de colesterol, los LDLr son regulados al alza y dan lugar a un aumento de la eliminación de partículas de LDL de la sangre (3,5) (Figura 1).

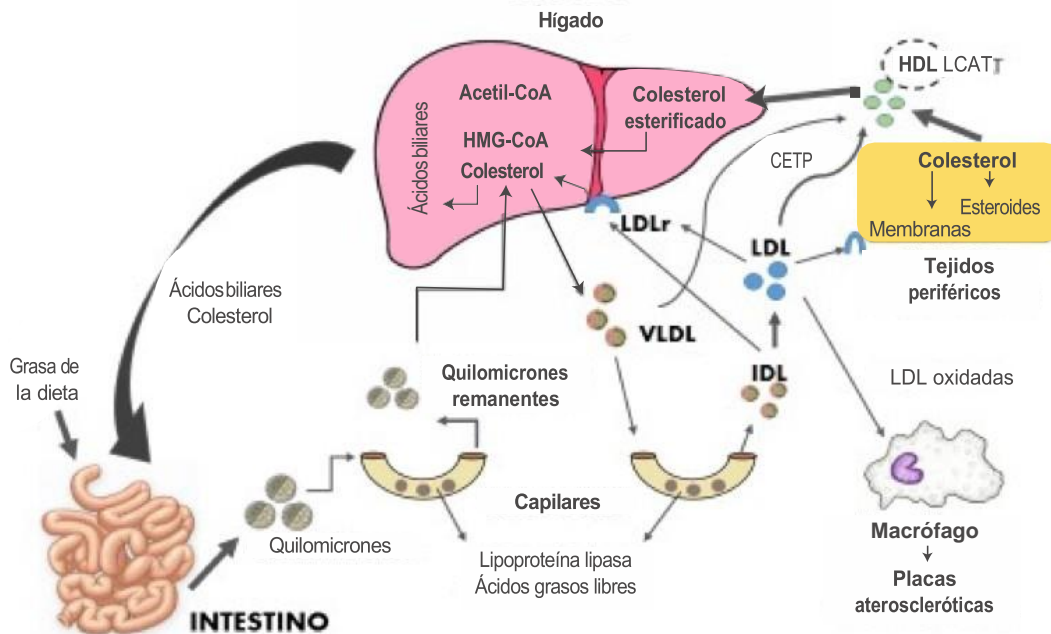


Figura 1. Metabolismo de lípidos.
Fuente: Elaboración propia.

Los lípidos plasmáticos (TG, ésteres del colesterol, fosfolípidos y colesterol libre) deben ser transportados por lipoproteínas. Los lípidos de la dieta (vía exógena) son absorbidos en el intestino por los quilomicrones; luego, los quilomicrones se someten a lipólisis rápida por parte de la lipoproteína lipasa (LPL), un proceso que elimina algunos de los TG y deja pequeños remanentes de quilomicrones que internalizan el resto de los lípidos de la dieta al hígado. En la vía endógena, el hígado utiliza los remanentes de quilomicrones, lípidos y colesterol endógeno para producir las partículas de VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad) (Figura 1). Las VLDL son lipoproteínas ricas en TG que contienen entre 10-15% del colesterol plasmático, fosfolípidos y un conjunto característico de apolipoproteínas: Apo B-100, Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III y Apo E. Estas lipoproteínas son transportadas por la sangre desde el hígado hasta el músculo y el tejido adiposo, donde la LPL se activa gracias a la Apo C-II, hidrolizando los TG de las VLDL y liberando ácidos grasos libres que pueden ser almacenados por los adipocitos (6,7). Las LDL que han sido sintetizadas en el hígado tienen una concentración alta de colesterol y moderada de fosfolípidos y no contienen TG. Su apolipoproteína asociada de mayor importancia es Apo B-100, indispensable para unirse al LDLr (3,8). El desequilibrio entre estas vías de síntesis y degradación se encuentra asociado con el desarrollo de diferentes enfermedades cardiovasculares y metabólicas (7,8).

Una amplia variedad de modelos celulares ha sido utilizada para investigar el metabolismo hepático. Estos modelos ofrecen

la oportunidad de estudiar detalles específicos de los mecanismos bioquímicos como el metabolismo lipídico y de glucosa, la respuesta toxicológica frente a fármacos, la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo, el mecanismo de invasión viral, las vías de señalización o la inhibición de proteínas a través de ARN de interferencia (9). Sin embargo, las células primarias son inherentemente desafiantes, en particular en su obtención y su aislamiento (10); a pesar de ello, los hepatocitos primarios son considerados como el mejor modelo *in vitro* para estudiar el metabolismo de lípidos y glucosa (1). Las metodologías de cultivo de células aisladas de hígado humano han sido mejoradas en los últimos años; en la actualidad, una variedad de estrategias de aislamiento, cultivo y criopreservación se han establecido y evaluado. Sin embargo, la viabilidad de estas células sigue siendo baja en contraste con las líneas celulares inmortalizadas de hepatomas; estas últimas tienen capacidad de biotransformación, una característica crucial en estudios toxicológicos y metabólicos (9,11).

El desarrollo de los modelos celulares hepáticos permite explorar el metabolismo de los lípidos en el hígado humano y, con ello, el desarrollo y progresión de las enfermedades relacionadas (12). Se ha trabajado en varias líneas celulares hepáticas para establecer modelos de acumulación de lípidos usando ácidos grasos saturados e insaturados de forma individual o combinados (11,13). En la mayoría de los estudios, el ácido graso que se ha adicionado al medio de cultivo ha sido el ácido oleico (ácido graso monoinsaturado, de 18 carbonos, que presenta la insaturación en el carbono 9, conocido como omega 9 y presente

en alimentos como el aceite de oliva o el aguacate), esencial para la producción de los TG, siendo menos lipotóxico que el ácido palmítico (ácido graso saturado de cadena larga, de 16 carbonos, el principal ácido graso de la dieta y presente en las carnes y en las grasas lácteas) (14).

Las ventajas de los modelos inmortalizados comparados con los cultivos primarios de hepatocitos humanos son: crecen continuamente, tienen vida útil ilimitada y su fenotipo es bastante estable. Además, es fácil disponer de ellos y sus condiciones de cultivo son más simples. Incluso, algunos hepatomas retienen (en parte) un diferenciado fenotipo adulto. De esta forma, los modelos celulares hepáticos poseen un alto potencial para proveer una plataforma de investigación del metabolismo de lípidos, así como de agentes farmacológicos o principios activos que permitan la reducción de la acumulación de TG a nivel intracelular (10).

El objetivo de esta revisión es comparar algunos modelos celulares hepáticos utilizados para el estudio del metabolismo lipídico, sus características y los resultados más relevantes de investigación en ellos, para establecer cuál de ellos ofrece mejores características para posteriores estudios.

Materiales y métodos

Se realizó una búsqueda de artículos científicos relacionados con modelos celulares y metabolismo de lípidos publicados en las bases de datos PubMed, ScienceDirect, Google Scholar y SciELO. La búsqueda fue realizada entre noviembre de 2016 y abril de 2017 y tuvo en cuenta artículos publicados desde enero de 2006 hasta abril de 2017, excepto para los artículos que trataban sobre el origen del modelo celular. Se incluyeron textos completos de investigaciones originales o revisiones, en idioma inglés y español y que contuvieran las siguientes palabras clave y sus posibles combinaciones: “lipid metabolism” and “modelo celular hepático (HepG2, HepaRG, Huh-7, primary hepatocytes, IHH)” and “tipo de sustrato (oleic acid, palmitic acid)”. Los criterios de exclusión para la selección de los artículos fueron: estudios publicados en otros idiomas, estudios que utilizaran otros sustratos de inducción de síntesis de lípidos y estudios donde solo se evaluara la esteatosis hepática. Al final, 51 artículos cumplieron con los requisitos para ser incluidos en la revisión (Figura 2.).

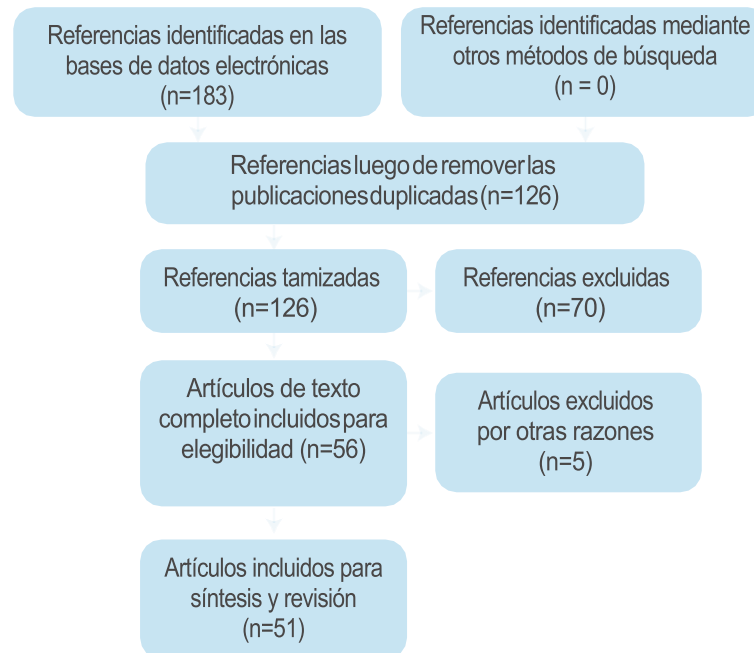


Figura 2. Flujograma de la búsqueda y selección de artículos en la presente revisión. Fuente: Elaboración propia.

Resultados

Se identificaron 51 referencias, de las cuales 36 correspondieron a artículos originales de texto completo y 15 a revisiones bibliográficas. La mayor proporción de los documentos estaban relacionados con el modelo celular HepG2 (62%) y la menor proporción (6%) con el modelo de hepatocitos primarios. De las referencias seleccionadas, 48 estaban escritas en inglés y 3 en español.

En la Tabla 1 se resumen las ventajas y desventajas de los modelos celulares utilizados para el estudio del metabolismo lipídico, notándose que la selección del modelo celular depende de las necesidades de la investigación y de la condición que se desea evaluar. No obstante, podríamos decir que el modelo celular HepG2 presenta la mejor estabilidad y es el más caracterizado en el estudio del metabolismo de los lípidos.

Se evidenció que una considerable variedad de modelos celulares

Discusión

ha sido usada para estudiar el metabolismo de los lípidos a nivel hepático, siendo el metabolismo del colesterol y de las lipoproteínas lo que más ha captado el interés. A pesar de que estos modelos celulares ofrecen la oportunidad de estudiar detalles específicos de un proceso metabólico en particular, no hay que pasar por alto que presentan limitaciones inherentes como la pérdida de capacidades reguladoras de división celular, algunas modificaciones genéticas o fenotípicas que alteraran su capacidad de comunicación celular o su propio metabolismo y el estar en un ambiente aislado y controlado, lo que cambia la capacidad de interacción y respuesta celular. A continuación, se mencionan las características de los modelos celulares hepáticos más utilizados para elucidar el proceso de síntesis, asimilación y excreción de los lípidos encontrados en esta revisión.

Tabla 1. Resumen de los modelos celulares hepáticos utilizados en el estudio del metabolismo lipídico.

Estudios	Modelo celular	Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> Li (10) Guguen-Guillouzo <i>et al.</i> (15) Guguen-Guillouzo & Guillouzo (16) 	Hepatocitos primarios	<ul style="list-style-type: none"> Exhiben el fenotipo y metabolismo de mayor similitud con los hepatocitos maduros Se pueden estimular a la acumulación de lípidos con ácidos grasos exógenos Realizan síntesis <i>de novo</i> de TG Se han utilizado en el estudio de la regulación de síntesis de proteínas y su catabolismo 	<ul style="list-style-type: none"> Tienen una disponibilidad limitada Poseen amplia variedad entre las células debido a los donantes No se reproducen en cultivo Pierden su fenotipo hepático con el tiempo
<ul style="list-style-type: none"> Green <i>et al.</i> (1) Navarro <i>et al.</i> (4) Ros (6) Anthérieu <i>et al.</i> (17) 	HepaRG	<ul style="list-style-type: none"> Posee características de hepatocito bien diferenciado Presenta expresión conservada de la actividad enzimática del citocromo P450 Se puede reproducir fácilmente en cultivo Presenta expresión estable de las proteínas relacionadas con el metabolismo lipídico Exhibe la mayoría de las funciones propias del hígado Expresa las proteínas relacionadas con el metabolismo de las lipoproteínas Expresa receptores nucleares 	<ul style="list-style-type: none"> Poco se sabe de la acumulación de lípidos en este modelo celular Han sido poco estudiadas No hay síntesis de ácidos biliares No hay interacción celular
<ul style="list-style-type: none"> Green <i>et al.</i> (1) De Gottardi <i>et al.</i> (18) Perttilä <i>et al.</i> (19) Chávez-Tapia <i>et al.</i> (20) 	IHH	<ul style="list-style-type: none"> Secreción de albumina similar a hepatocitos maduros Secreción de lipoproteínas ricas en TG, principalmente LDL Expresan las proteínas relacionadas con el metabolismo de lípidos Responden a la estimulación con ácido oleico 	<ul style="list-style-type: none"> Han sido poco estudiadas Su metabolismo se ve afectado por las concentraciones de glucosa No hay interacción celular No preservan la anatomía propia de los hepatocitos
<ul style="list-style-type: none"> Meex <i>et al.</i> (21) Miyata <i>et al.</i> (22) Shao & Ford (23) Rohwedder <i>et al.</i> (24) 	HuH-7	<ul style="list-style-type: none"> Capacidad de diferenciación Alta producción de apoB 100 Tienen una alta capacidad de acumulación de TG en respuesta a ácidos grasos exógenos Expresan proteínas y enzimas relacionadas con las lipoproteínas 	<ul style="list-style-type: none"> No tienen síntesis de ácidos biliares No hay interacción celular No preservan la anatomía propia de los hepatocitos
<ul style="list-style-type: none"> Navarro <i>et al.</i> (4) Ros (6) Meex <i>et al.</i> (21) Arrol <i>et al.</i> (25) Gdula-Argasińska <i>et al.</i> (26) Gómez-Lechón <i>et al.</i> (27) 	HepG2	<ul style="list-style-type: none"> Amplia referencia de este modelo para el estudio del metabolismo lipídico Responde a la estimulación con ácidos grasos exógenos Sintetizan ácidos biliares Su composición lipídica es comparable a la observada en el hígado humano normal Expresan receptores de insulina Sintetizan y excretan varias lipoproteínas Realizan síntesis <i>de novo</i> de TG y colesterol Son utilizadas para la evaluación de fármacos y toxinas 	<ul style="list-style-type: none"> Presenta diferencias fenotípicas y genotípicas con los hepatocitos maduros Carecen de la expresión funcional de las proteínas del complejo P450 No hay interacción celular

TG: triglicéridos; LDL: lipoproteínas de baja densidad; ApoB 100: apolipoproteína B 100.

Fuente: Elaboración propia.

Hepatocitos primarios

Uno de los modelos *in vitro* para el estudio de los mecanismos que controlan el metabolismo de lípidos y glucosa en humanos es el de hepatocitos primarios (1,28). Desafortunadamente, existe una disponibilidad limitada del tejido de hígado humano para el aislamiento celular, además de una amplia variabilidad entre los donantes de este tejido (15,16,29). A pesar de los esfuerzos en optimizar las condiciones de cultivo, estas células aisladas pierden su fenotipo hepático de forma irreversible y su capacidad proliferativa es bastante limitada (16,30).

Los hepatocitos primarios pueden ser obtenidos de un hígado completo o una porción de este. En la actualidad, los hepatocitos humanos son aislados de hígados no aptos para trasplante y sobre todo de fragmentos de hígados con tumores primarios o con algunas otras enfermedades hepáticas (31). Los hepatocitos aislados frescos exhiben la mayoría de las funciones de los hepatocitos humanos maduros en vivo, pero han perdido los dominios especializados de membrana, tales como los de uniones intercelulares (canalículos biliares), y no sobreviven más de unas pocas horas en suspensión (16).

Los hepatocitos primarios son considerados el modelo celular ideal para el estudio del metabolismo lipídico hepático debido a que muestran un comportamiento similar a las células del hígado

in vivo (10). Estas células muestran una acumulación intracelular de TG similar a la observada en hígado humano *in vivo* cuando se exponen a ácidos grasos (10). La acumulación de estos TG a nivel extracelular está directamente relacionada con la entrada y secreción de los mismos, a la vez que tiene una relación directa con la tasa de secreción de las lipoproteínas encargadas de transportar TG. Se ha demostrado que los hepatocitos humanos responden a la suplementación con ácidos grasos, incrementando la síntesis de TG y la secreción de VLDL sin ningún cambio en la abundancia de la apoB (10), indicando que la síntesis *de novo* es funcionalmente activa en este modelo celular.

Células HepaRG

Estas células son uno de los principales modelos para el estudio del metabolismo lipídico y una línea celular obtenida de tumor de hígado (carcinoma de una paciente femenina quien sufrió de hepatocarcinoma y hepatitis C) (32); además muestran características de un hepatocito bien diferenciado (2). Esta línea se compone de una población celular homogénea con un cariotipo que exhibe pocas alteraciones (17) y tiene la capacidad de proliferación y diferenciación (16). Cuando estas células son sembradas a baja densidad, adquieren una morfología elongada no diferenciada, se dividen activamente

y, después de alcanzar la confluencia, forman colonias como las típicas de hepatocitos rodeadas por células epiteliales similares a las biliares (2); además, expresan una mayor cantidad de enzimas P450, varias enzimas de la fase II (que participan en la conjugación de xenobióticos como: acetiltransferasa, metiltransferasa, glutatión transferasa), transportadores y receptores nucleares importantes. Entre estos últimos se encuentra el receptor adrenostano constitutivo (CAR), el receptor pregado X (PXR) y el receptor activado por el proliferador de perioxosoma (PPAR), que muestran un 85% de identidad con los genes expresados por hepatocitos primarios humanos (16), convirtiendo también a las HepaRG en un modelo útil para el estudio de los mecanismos del metabolismo de medicamentos (33).

En este modelo se ha observado una expresión estable de proteínas relacionadas con el metabolismo lipídico, como lo son proteína de unión de elementos reguladores de esteroides 1 (SREBP-1), sintetasa de ácidos grasos (FAS) y acetil-CoA carboxilasa (ACC), sin observar diferencias en la expresión en medios de cultivo con baja o alta concentración de glucosa (1). Por otro lado, no se han apreciado diferencias en la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo de las lipoproteínas como: apolipoproteína A (apoA), apolipoproteína I (apoI), receptor scavenger clase B miembro 1 (SR-BI), LDLr y proteínas relacionadas con el receptor LDL 1 (LRP1) (1).

Las células HepaRG han sido muy utilizadas en estudios de toxicología y metabolismo de medicamentos, pero poco se ha estudiado acerca de la capacidad para acumular TG cuando son expuestas a ácidos grasos exógenos (10). No obstante, se encuentran reportes de estudios donde se evidencia la secreción de TG y lipoproteínas conteniendo apoB en estas células, incluso de la expresión de genes asociados al metabolismo de lípidos (1,12).

Células IHH

Este modelo de hepatocitos humanos inmortalizados es una línea celular hepática reciente que fue obtenida de tejido de hígado sano; se extrajo quirúrgicamente de un hombre de 59 años de edad y fue inmortalizada por transfección con el plásmido SV40 que expresa el antígeno T (29). Estas células secretan albúmina a un nivel comparable con los hepatocitos primarios humanos, así como lipoproteínas ricas en TG, apoB, apoA1 (29) y apoCIII (34).

En las células IHH se ha observado una expresión considerable de las proteínas relacionadas con el metabolismo de los lípidos, en particular las proteínas SREBP-1, FAS y ACC, pero no se han visto diferencias en las lipoproteínas como apoA, ApoI, SR-BI, LDLr y LRP1 (1). Estas células secretan, en su gran mayoría, lipoproteínas asociadas a LDL (10) y, en presencia de ácido oleico, acumulan TG a nivel intracelular; además, cuando son expuestas a altas concentraciones de glucosa incrementan la secreción de sus lipoproteínas (10,18). En su mayoría aumenta la producción de ApoCIII y de la proteína que contiene el dominio de la fosfolipasa 3 similar a patatina (PNPLA3) (19). Este incremento de los niveles de ApoCIII está correlacionado con una elevada secreción de VLDL y su correspondiente aumento de TG y ApoB.

Bajo condiciones normales de cultivo, la tinción con aceite rojo (del inglés Oil Red) revela que las células IHH contienen muy baja cantidad de lípidos neutros intracelulares; después del tratamiento con ácido oleico, estas células acumulan una gran cantidad de micelas lipídicas en citoplasma (35). En contraste con las células IHH, tanto las HepG2 como las HuH-7 presentan tinción de lípidos intracelulares aún sin inducir la formación de vesículas de lípidos; por esta razón, se considera que este modelo celular tiene un comportamiento muy similar a las células hepáticas maduras de hígado humano (18), además tolera altas concentraciones de ácidos grasos exógenos (20).

Al estudiar la acumulación de lípidos intracelulares a través del método Oil Red, se encontró que las células IHH aumentan 15.8 veces su acumulación de lípidos intracelulares comparado con condiciones basales al ser tratadas con ácido oleico. De Gotardi *et al.* (18) observaron que las células IHH esteatóticas exhiben una expresión diferencial de 30 genes, 12 de los cuales incrementan su expresión mientras que los 18 restantes la disminuyen. Entre los que aumentan la expresión se encuentran acil-CoA sintetasa, ácido graso denaturasa y acetil-CoA aciltransferasa, mientras que los que la reducen son HMGCR y LDLr. En conclusión, se observa que la inducción de esteatosis en células IHH incrementa de manera considerable la biosíntesis de TG, mientras se inhibe la lipogénesis de ácidos grasos y colesterol (18).

Células HuH-7

En este modelo las células derivan de carcinoma hepatocelular, tienen la capacidad de diferenciarse y han sido bastante utilizadas en estudios relacionados con enfermedades virales del hígado. Meex *et al.* (21) demostraron que este modelo celular es muy similar a las células HepG2 con relación al efecto de los lípidos exógenos y los inhibidores del proteosoma de la secreción, la recuperación y la degradación de la ApoB100; sin embargo, no ofrece ventajas sobre las células HepG2 para estudiar el metabolismo lipídico. Existen reportes que señalan que la adición de suero humano en remplazo del suero fetal bovino podría estimular más funciones específicas de hepatocitos humanos, entre ellas la secreción de VLDL (21).

Estas células secretan en mayor proporción la apoB100 (95%) comparada con la secreción de las células HepG2 (70%). También se ha demostrado que en momentos de relativa deficiencia de lípidos degradan la apoB100. Las células HuH-7 tienen la capacidad de acumular más del doble de los TG que acumulan las células HepG2 cuando son expuestas a ácido palmítico, ácido oleico o una combinación de ambos (20). No obstante, la estimulación con el ácido oleico en ambos tipos celulares presenta una mayor acumulación de TG que cuando son estimuladas con ácido palmítico (36). Asimismo, se ha observado que el ácido palmítico es bastante citotóxico para las células HuH-7; en contraste a esto, el ácido oleico es tolerado hasta concentraciones de 1.32 mmol sin inducir la muerte celular (30).

Miyata *et al.* (37) establecieron una variante que expresa el gen de la luciferasa bajo el control del promotor de la enzima FAS (HuH-7/FAS-Luc) y en la que se puede evaluar el efecto de diferentes sustancias sobre el metabolismo de los lípidos, relacionadas con la SREBP y la inhibición de la síntesis de FAS, HMG-CoA sintetasa, HMG-CoA reductasa y esteroil CoA desaturasa. Miyata *et al.* (22), utilizando la misma variante, evaluaron el efecto de alil isotiocianato (AITC) sobre SREBP en otro estudio y encontraron que dicho compuesto tiene la capacidad de inhibir la proteólisis de SREBP en sus diferentes isoformas y afecta el estado maduro de la proteína. Asimismo, observaron una reducción en los niveles de ARNm de las proteínas reguladas por SREBP-1 (ACC, FAS y SCD) y en las reguladas por SREBP-2 (HMG-CoA sintetasa, HMG-CoA reductasa y la escualeno sintetasa); esto indicó que se produce un efecto regulador sobre la lipogénesis, tanto de ácidos grasos como de colesterol (22); Shao & Ford (23) reportaron en 2014 resultados similares.

En este modelo también se realizó seguimiento subcelular del ácido oleico y se observó que la mayoría de este sustrato era utilizado por las células para elaborar ácidos neutros, principalmente fosfolípidos y TG (24).

Células HepG2

Son células derivadas de hepatoblastoma humano que se comportan de forma similar a las células de hígado fetal, lo que las hace

inadecuadas para la investigación del metabolismo de medicamentos (10); no obstante, esta línea celular expresa muchas de las funciones atribuidas a los hepatocitos humanos normales (25,38,39). Para algunos investigadores, estas células presentan acumulación de TG cuando se adicionan al medio de cultivo ácidos grasos exógenos (26,40), mientras que otros autores reportan que la acumulación de TG solo ocurre cuando se utiliza ácido oleico (10). A diferencia de las células primarias, cultivar células HepG2 con solo ácido palmítico no promueve la acumulación de TG (41).

Desde su introducción en 1979, un sin número de investigaciones han utilizado este modelo y una alta proporción de las proteínas específicas del hígado han sido identificadas en los estudios iniciales con estas células, lo que generó expectativas con relación a que esta línea celular se convirtiera en un modelo celular de hígado humano bastante consistente para investigación. Entre los procesos metabólicos que han sido estudiados hasta ahora, se destacan estudios del metabolismo de lipoproteínas, síntesis de ácidos biliares, metabolismo del colesterol, metabolismo de medicamentos, enzimas hepáticas, transporte de glucosa, entre otros; estas vías han sido evaluadas procurando mantener el ambiente de los hepatocitos normales y, por lo tanto, favoreciendo incluso aplicaciones más amplias de esta línea celular sobre problemas biológicos, en los cuales está involucrado el funcionamiento hepático (12,38). También se ha demostrado que las células HepG2 tienen la capacidad de sintetizar ácidos biliares a partir de colesterol (5).

La composición de lípidos en cultivo de las células HepG2 es comparable con la encontrada en hígado humano normal (42), en donde a pesar de la reducción de la síntesis de ácidos grasos *de novo* no se encontraron diferencias significativas entre las células HepG2 con relación a hepatocitos primarios o hepatocitos frescos. Es decir, las células HepG2 tienen una alta capacidad para la síntesis de TG a partir de ácido oleico, resultando en una alta acumulación a nivel intracelular y muy baja secreción al medio (6).

Las células HepG2 tienen la capacidad de expresar los receptores de insulina, transferrina y los LDLr, además se ha documentado la capacidad de sintetizar y excretar lipoproteínas, como VLDL (25), HDL (25) y en mayor proporción LDL (43); por esta razón el modelo celular HepG2 se ha catalogado como un sistema estándar para estudiar el metabolismo y la síntesis de las lipoproteínas. Al estudiar el efecto que puede tener el ácido oleico y la insulina sobre la secreción de lípidos, se ha observado que los TG son los lípidos secretados en mayor proporción seguidos de colesterol esterificado y no esterificado, siendo estas observaciones concordantes con lo encontrado en cultivo primario de hepatocitos (44). La cantidad de colesterol no esterificado no se ve afectada por el ácido oleico o por la insulina; sin embargo, la baja concentración de ésteres de colesterol refleja baja actividad de la lecitin-colesterol aciltransferasa (LCAT) (44).

En varios estudios se ha demostrado que el ácido oleico es un elemento inductor de la lipogénesis en células HepG2, induciendo 1.85 veces la cantidad de lípidos en células expuestas; mientras que los TG aumentan 1.7 veces en células tratadas a nivel intracelular y 3.7 veces a nivel extracelular (25,44,45); también genera el aumento de la acumulación de apoB100 (700%) (21).

La viabilidad de las células HepG2 frente al ácido oleico se mantiene en 95% a concentraciones <1 mmol (concentraciones >1.4 mmol causan muerte celular) (43). Al comparar las células HepG2 con los hepatocitos primarios no se evidencian diferencias significativas en la acumulación de TG cuando son expuestas a ácidos grasos libres exógenos (27).

Kamper *et al.* (46) compararon la producción de apoB y de la proteína microsomal transportadora de triglicéridos (MTP) en células HepG2 y células BeWo (células humanas de placenta originadas de un

criocarcinoma), encontrando que las células HepG2 producen tanto apoB como MTP en muy buena proporción, mientras que las células BeWo solo producen pequeñas cantidades de apoB, por este motivo no se consideran modelos viables para el estudio del metabolismo de los lípidos (46).

Por otra parte, cuando se evalúan metabolitos secundarios como los polifenoles, específicamente el oligonol, se observa que reduce de una forma dosis dependiente la acumulación intracelular de TG en células HepG2 cultivadas con ácido palmítico; además este metabolito no afecta la viabilidad celular (41). Esta reducción está explicada por la supresión de la expresión de proteínas ACC, FAS y SREBP-1 y el receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ); de esta forma inhibe la síntesis *de novo* de ácidos grasos (41). Similares resultados se observaron cuando se evaluaron los extractos de *Moringa olifera* (47), *Zanthoxylum bungeanum* (48), *Sibiraea angustata* (49), *Olea europaea* Linn (50) y *Camellia sinensis* (51).

Una de las desventajas de las células HepG2 es que carecen de la expresión funcional de casi todas las proteínas relevantes P450 de hígado humano (2,30,37), además tienen una limitada capacidad para cargar de lípidos a la apoB100 y secretarla en forma de VLDL (39).

Conclusiones

Las investigaciones con relación a la acumulación de lípidos a nivel hepático en modelos celulares han permitido elucidar y avanzar en el conocimiento de este proceso desde el punto de vista bioquímico y molecular; es así como ya se han identificado cuáles son las rutas metabólicas involucradas en el desarrollo de la esteatosis hepática. Del mismo modo, se han identificado varios compuestos tanto sintéticos como naturales que pueden tener efectos sobre la función de enzimas esenciales en el metabolismo de lípidos o sobre los factores nucleares que permiten la expresión o inhibición de la síntesis de estas enzimas.

Como se notó a lo largo del texto, cada modelo celular ofrece algunas ventajas sobre los otros, pero también presentan limitantes o factores desfavorables al momento de su utilización que puede incluir amplias diferencias a nivel genético y fenotípico con relación a las células hepáticas maduras, que sería el tipo de célula que se pretende simular, como a nivel bioquímico donde las células sobreexpresan el metabolismo lipídico. Es decir, el investigador debe tener en cuenta cuáles son los requerimientos y el proceso que desea evidenciar para poder optar por uno u otro modelo de estudio, sin olvidar que los resultados obtenidos solo serán aproximaciones de lo que realmente podría suceder a nivel del hígado como órgano.

Conflicto de intereses

Ninguno declarado por los autores.

Financiación

Este trabajo fue financiado con los recursos de la Beca Doctorados Nacionales, convocatoria 727 de 2015, Colciencias.

Agradecimientos

A Colciencias.

Referencias

1. Green CJ, Pramfalk C, Morten KJ, Hodson L. From whole body to cellular models of hepatic triglyceride metabolism: man has got to know his limitations. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015;308(1):E1-20.

2. **Samanez CH, Caron S, Briand O, Dehondt H, Duplan I, Kuipers F, et al.** The human hepatocyte cell lines IHH and HepaRG: models to study glucose, lipid and lipoprotein metabolism. *Arch Physiol Biochem.* 2012;118(3):102-11. <http://doi.org/cvgb>.
3. **Donato MT, Lahoza A, Castell JV, Gómez-Lechón MJ.** Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. *Curr Drug Metab.* 2008;9(1):1-11. <http://doi.org/bbz53z>.
4. **Navarro V, Zabala A, Gómez S, Portillo M.** Metabolismo del colesterol: Bases actualizadas. *Rev Esp Obes.* 2009;7(6):360-84.
5. **Ikonen E.** Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(2):125-38. <http://doi.org/dntz3d>.
6. **Ros E.** Doble inhibición del colesterol: papel de la regulación intestinal y hepática. *Rev Esp Cardiol.* 2006;6(Suppl G):52-62. <http://doi.org/ckd5rc>.
7. **Lafontan M.** Historical perspectives in fat cell biology: the fat cell as a model for the investigation of hormonal and metabolic pathways. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012;302(2):C327-59. <http://doi.org/cw2m49>.
8. **Ikonen E.** Mechanisms for Cellular Cholesterol Transport : Defects and Human Disease. *Physiol Rev.* 2006;86(4):1237-61. <http://doi.org/b7cdm4>.
9. **Maldonado-Saavedra O, Ramírez-Sánchez I, García-Sánchez JR, Ceballos-Reyes GM, Mendez-Blainá E.** Colesterol : Función biológica e implicaciones médicas. *Rev Mex Cienc Farm.* 2012;43(2):7-22.
10. **Li AP.** Human hepatocytes: isolation, cryopreservation and applications in drug development. *Chem Biol Interact.* 2007;168(1):16-29. <http://doi.org/cpvq9q>.
11. **Groneberg DA, Grosse-Siestrup C, Fischer A.** In Vitro Models to Study Hepatotoxicity. *Toxicol Pathol.* 2002;30(3):394-9. <http://doi.org/ds8bz4>.
12. **Green CJ, Johnson D, Amin HD, Sivathondan P, Silva MA, Wang LM, et al.** Characterization of lipid metabolism in a novel immortalized human hepatocyte cell line. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015;309(6): E511-22. <http://doi.org/f7r8sb>.
13. **Cui W, Chen SL, Hu KQ.** Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. *Am J Transl Res.* 2010;2(1):95-104.
14. **Ferramosca A, Zara V.** Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. *World J Gastroenterol.* 2014;20(7):1746-55. <http://doi.org/f5thtj>.
15. **Guguen-Guillouzo C, Campion JP, Brissot P, Launois B, Bourel M, Guillouzo A.** high yield preparation of isolated human adult hepatocytes by enzymatic perfusion of the liver. *Cell Biol Int Rep.* 1982;6(6):625-8. <http://doi.org/bcsghr>.
16. **Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A.** General Review on In Vitro Hepatocyte Models and Their Applications. In: Maurel P, editor. *Hepatocytes: Methods in Molecular Biology.* New York: Springer; 2010. p. 1-40.
17. **Anthérieu S, Chesné C, Li R, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A.** Optimization of the HepaRG cell model for drug metabolism and toxicity studies. *Toxicol In Vitro.* 2012;26(8):1278-85. <http://doi.org/f4gwf4>.
18. **De Gottardi A, Vinciguerra M, Sgroi A, Moukil M, Ravier-Dall'Antonia F, Paziienza V, et al.** Microarray analyses and molecular profiling of steatosis induction in immortalized human hepatocytes. *Lab Invest.* 2007;87(8):792-806. <http://doi.org/bgcb2m>.
19. **Perttilä J, Huaman-Samanez C, Caron S, Tanhuanpää K, Staels B, Yki-Järvinen H, et al.** PNPLA3 is regulated by glucose in human hepatocytes, and its I148M mutant slows down triglyceride hydrolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;302(9):E1063-9.
20. **Chávez-Tapia NC, Rosso N, Uribe M, Bojalil R, Tiribelli C.** Kinetics of the inflammatory response induced by free fatty acid accumulation in hepatocytes. *Ann Hepatol.* 2014;13(1):113-20.
21. **Meex SJ, Andreo U, Sparks JD, Fisher EA.** Huh-7 or HepG2 cells: which is the better model for studying human apolipoprotein-B100 assembly and secretion? *J Lipid Res.* 2011;52(1):152-8. <http://doi.org/czqdx4>.
22. **Miyata S, Inoue J, Shimizu M, Sato R.** Allyl isothiocyanate suppresses the proteolytic activation of sterol regulatory element-binding proteins and *de novo* fatty acid and cholesterol synthesis. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2016;80(5):1006-11. <http://doi.org/cvvg>.
23. **Shao F, Ford DA.** Elaidic acid increases hepatic lipogenesis by mediating sterol regulatory element binding protein-1c activity in HuH-7 cells. *Lipids.* 2014;49(5):403-13. <http://doi.org/f5447s>.
24. **Rohwedder A, Zhang Q, Rudge SA, Wakelam MJ.** Lipid droplet formation in response to oleic acid in Huh-7 cells is mediated by the fatty acid receptor PPAR. *J Cell Sci.* 2014;127(Pt 14):3104-15. <http://doi.org/f59zw3>.
25. **Arrol S, Mackness MI, Laing I, Durrington PN.** Lipoprotein secretion by the human hepatoma cell line HepG2: differential rates of accumulation of apolipoprotein B and lipoprotein lipids in tissue culture media in response to albumin, glucose and oleate. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1086(1):72-80. <http://doi.org/b67jv8>.
26. **Gdula-Argasińska J, Garbaciak A, Tyszka-Czochara M, Woźnia-kiewicz J, Paśko P, Czepiel J.** Identification of lipid derivatives in HepG2 cells. *Acta Biochim Pol.* 2013;60(4):811-5.
27. **Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, Jiménez N, Castell JV, O'Connor JE.** A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact.* 2007;165(2):106-16. <http://doi.org/cb676j>.
28. **Forte TM.** Primary hepatocytes in monolayer culture: a model for studies on lipoprotein metabolism. *Ann Rev Physiol.* 1984;46(31):403-15. <http://doi.org/dc94rt>.
29. **Schippers IJ, Moshage H, Roelofsen H, Muller M, Heymans HSA, Ruiters M, et al.** Immortalized human hepatocytes as a tool for the study of hepatocytic (de-)differentiation. *Cell Biol Toxicol.* 1997;13(4-5):375-86. <http://doi.org/b8q6vb>.
30. **Castell JV, Jover R, Martínez-Jiménez CP, Gómez-Lechón MJ.** Hepatocyte cell lines: their use, scope and limitations in drug metabolism studies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006;2(2):183-212. <http://doi.org/db5mq2>.
31. **Gómez-Lechón MJ, Donato T, Ponsoda X, Fabra R, Trullenque R, Castell JV.** Isolation, Culture and Use of Human Hepatocytes in Drug Research. In: Castell JV, Gómez-Lechón MJ. *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research.* London: Academic Press; 1996. 129-153. <http://doi.org/frqwwv>.
32. **Gripon P, Rumin S, Urban S, Le-Seyec J, Glaise D, Cannie I, et al.** Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15655-60. <http://doi.org/fwfw8n>.
33. **Aninat C, Piton A, Glaise D, Le Charpentier T, Langouët S, Morel F, et al.** Expression of Cytochrome P450, conjugating Enzymes and Nuclear Receptors in Human Hepatoma HepaRG Cells. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(1):75-83. <http://doi.org/cjzb3p>.
34. **Caron S, Verrijken A, Mertens I, Samanez CH, Mautino G, Haas JT, et al.** Transcriptional activation of apolipoprotein CIII expression by glucose may contribute to diabetic dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(3):513-9. <http://doi.org/dmk25b>.
35. **Nolan CJ, Larter CZ.** Lipotoxicity: Why do saturated fatty acids cause and monounsaturates protect against it? *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24(5):703-6. <http://doi.org/dnb3w7>.
36. **Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, et al.** Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24(5):830-40. <http://doi.org/dh85dj>.
37. **Miyata S, Inoue J, Shimizu M, Sato R.** 4'-Hydroxyflavanone suppresses activation of sterol regulatory element-binding proteins and *de novo* lipid synthesis. *FEBS Lett.* 2012;586(13):1778-82. <http://doi.org/f33fr9>.
38. **Javitt NB.** HepG2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *FASEB J.* 1990;4(2):161-8. <http://doi.org/cvvg>.
39. **Rowe C, Gerrard DT, Jenkins R, Berry A, Durkin K, Sundstrom L, et al.** Proteome-wide analyses of human hepatocytes during differentiation and dedifferentiation. *Hepatology.* 2013;58(2):799-809. <http://doi.org/f6dccn>.

40. Fang DL, Wan Y, Shen W, Cao J, Sun ZX, Yu HH, *et al.* Endoplasmic reticulum stress leads to lipid accumulation through upregulation of SREBP-1c in normal hepatic and hepatoma cells. *Mol Cell Biochem.* 2013;381(1):127-37. <http://doi.org/f5brn2>.
41. Park JY, Kim Y, Im JA, Lee H. Oligonol suppresses lipid accumulation and improves insulin resistance in a palmitate-induced in HepG2 hepatocytes as a cellular steatosis model. *BMC Complement Altern Med.* 2015;15:185. <http://doi.org/f7g7rh>.
42. Gibbons GF, Khurana R, Odwell A, Seelaenderz MC. Lipid balance in HepG2 cells: active synthesis and impaired mobilization. *J Lipid Res.* 1994;35(10):1801-8.
43. Ellsworth JL, Erickson SK, Cooper AD. Very low and low density lipoprotein synthesis and secretion by the human hepatoma cell line HepG2: effects of free fatty acid. *J Lipid Res.* 1986;27(8):858-74.
44. Dashti N, Wolfbauer G. Secretion of lipids, apolipoproteins, and lipoproteins by human hepatoma cell line, HepG2: effects of oleic acid and insulin. *J Lipid Res.* 1987;28(4):423-36. PMID: 3035039.
45. Gorgani-Firuzjaee S, Khatami S, Adeli K, Meshkani R. SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP2) regulates de-novo lipogenesis and secretion of apoB100 containing lipoproteins in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;464(4):1028-33. <http://doi.org/cvvg>.
46. Kamper M, Manns CC, Plieschnig JA, Schneider WJ, Ivessa NE, Hermann M. Estrogen enhances secretion of apolipoprotein B-100 containing lipoproteins by BeWo cells. *Biochimie.* 2015;112:121-8. <http://doi.org/f7bjfn>.
47. Tabboon P, Sripanidkulchai B, Sripanidkulchai K. Hypocholesterolemic mechanism of phenolics-enriched extract from *Moringa oleifera* leaves in HepG2 cell lines. *Songklanakarin J Sci Technol.* 2016;38(2):155-61. <http://doi.org/cvgh>.
48. Wu T, Zhong L, Hong Z, Li Y, Liu X, Pan L, *et al.* The effects of Zanthoxylum bungeanum extract on lipid metabolism induced by sterols. *J Pharmacol Sci.* 2015;127(3):251-9. <http://doi.org/f69b7z>.
49. Li B, Chen X, Wang Z, Liu H, Liu B, Yu S, *et al.* Two new monoterpenes and one dicaffeic acid ester from *Sibiraea angustata* with hypolipidemic activities in HepG2 cells *in Vitro*. *Phytochemistry Letters.* 2015;13:319-23. <http://doi.org/cvgj>.
50. Kang H. *Olea europaea* Linn (Oleaceae) Fruit Pulp Extract Suppresses Sterol Regulatory Element-Binding Proteins-1c via AMP-Activated Protein Kinase Activation in Human Hepatic Cells. *Trop J Pharm Res.* 2014;13(8):1265. <http://doi.org/cvkg>.
51. Tenore GC, Stiuso P, Campiglia P, Novellino E. *In vitro* hypoglycaemic and hypolipidemic potential of white tea polyphenols. *Food Chem.* 2013;141(3):2379-84. <http://doi.org/f5b3f5>.

CAPITULO II

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

En la actualidad, la población en general cada vez es más propensa al desarrollo de enfermedades metabólicas, como la obesidad debido al incremento del consumo de dietas hipercalóricas de la baja actividad física y sedentarismo en general. Estas grasas, producto de la dieta, son metabolizadas en el hígado, lo que conlleva a la acumulación de lípidos en circulación, hepatotoxicidad por el aumento de residuos cetónicos derivados de su catabolismo, con la consecuente, respuesta inflamatoria (1); desencadenando al desarrollo de síndrome metabólico (2), el cual es un factor de riesgo de múltiples enfermedades como la hipertensión, la dislipidemia, resistencia a la insulina y la obesidad, las cuales comprenden factores de riesgo de otras enfermedades de mayor impacto como enfermedades coronarias, diabetes, hígado graso o esteatosis y factores de riesgo de varios tipos de cáncer (3), de ahí la importancia, del mejoramiento del estilo de vida, empezando por una dieta más balanceada, que favorezca la salud metabólica y prevenga la aparición de las enfermedades mencionadas anteriormente, sin embargo, para la mayoría de la población, debido a su condición económica o laboral, la falta de tiempo y en general, una vida acelerada, son pocas las posibilidades de mantener una alimentación saludable o poder realizar una rutina de ejercicio, lo que conlleva a un aumento de peso debido a la acumulación de lípidos en diferentes tejidos.

Existen varias estrategias farmacológicas para la reducción de los lípidos en sangre, pero algunos no son lo suficientemente efectivos o generan efectos secundarios que afectan la salud del paciente; por otra parte, la reducción de la acumulación de lípidos al interior del hígado sigue siendo un reto en medicina. Por tal motivo, una gran parte de la población acude a otras alternativas terapéuticas para reducir la concentración de los lípidos como lo es, la medicina tradicional o a base de plantas medicinales, sin embargo, es importante tener claro, que la mayoría de estas especies vegetales utilizadas en este tipo de tratamientos, no han sido sometidas a estudios rigurosos que avalen su efectividad y que además descarten un potencial riesgo de toxicidad. Tal es el caso de la *Passiflora edulis*, planta de la cual sus frutos son de consumo cotidiano en jugos, compotas u otras presentaciones alimenticias, pero que también se ha venido utilizando en medicina tradicional como elemento antihipertensivo, en el tratamiento del insomnio, problemas hepáticos, sedante y para reducir los niveles de colesterol. De ahí la necesidad de investigar bajo condiciones experimentales los efectos de los extractos de *Passiflora edulis* en la modulación del metabolismo lipídico en un modelo *in vitro*, dando origen a los objetivos de este proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Perona JS. Membrane lipid alterations in the metabolic syndrome and the role of dietary oils. *BBA - Biomembr.* 2017; 1859(9): 1690–703. DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.04.015.
2. Julibert A, Bibiloni M, Tur JA. Dietary fat intake and metabolic syndrome in adults : A systematic review. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2019; 29(9): 887–905. DOI: 10.1016/j.numecd.2019.05.055.
3. Rutigliano I, Vinci R, De Filippo G, Mancini M, Stoppino L, D'Apollito M, et al. Metabolic syndrome, hepatic steatosis, and cardiovascular risk in children. *Nutrition.* 2017; 36: 1–7. DOI: 10.1016/j.nut.2016.10.017

Objetivo General:

Determinar el efecto hipolipemiante de los extractos de las hojas y del jugo de *Passiflora edulis* en un modelo celular hepático.

Objetivos Específicos:

1. Caracterizar el contenido fenólico y sacárido de los extractos de hojas y de jugo de *Passiflora edulis*.
2. Evaluar la viabilidad de las células HepG2 frente al ácido oleico, el extracto de hojas y del jugo de *P. edulis*.
3. Evaluar la bioaccesibilidad de los componentes y actividad antioxidante del extracto digerido de hojas y del jugo de *Passiflora edulis*.
4. Determinar el efecto del extracto de hojas y jugo de *Passiflora edulis* sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa
5. Determinar el efecto del extracto de hojas y jugo de *P. edulis* sobre la concentración de colesterol y triglicéridos intracelulares y extracelulares de las células HepG2 tratadas con los extractos.

CAPITULO III

COMPONENTES FENÓLICOS Y OLIGOSACARIDOS DE LOS EXTRACTOS DE *Passiflora edulis*.

INTRODUCCIÓN

En el metabolismo de las plantas se producen una amplia variedad de compuestos orgánicos, que, en principio, no están directamente relacionados con su crecimiento o desarrollo; estos compuestos son conocidos como metabolitos secundarios. En la actualidad, se sabe que estos metabolitos secundarios desempeñan funciones cruciales para la planta, como: protección contra patógenos (hongos, insectos, bacterias y virus), protección contra ataques por herbivoría, generar características atractivas (color, olor, sabor) para estimular a los polinizadores, así como para las interacciones planta-planta o planta-microorganismos. Dentro de los metabolitos secundarios, los grupos más estudiados y de mayor impacto económico han sido los polifenóles, los oligosacáridos y los alcaloides (1).

Los polifenóles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en las plantas. Teniendo en cuenta su estructura química se pueden dividir en varios tipos: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos. En los últimos años se ha demostrado que una dieta rica en polifenóles vegetales puede mejorar la salud y disminuir la incidencia de enfermedades cardiovasculares (2). Es bastante amplia la evidencia que los compuestos fenólicos contribuyen a la salud de los seres humanos, actuando como antioxidantes, de esta forma previenen la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), la agregación plaquetaria y el daño en general de los eritrocitos (3). Además, pueden actuar como quelantes de metales, situación que permite inhibir algunas enzimas metaloproteasas como es el caso de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), regulando así la presión arterial (4); como antimutagénicos (5) o anticancerígenos (6); como agentes antimicrobianos (7), entre otras funciones como vasodilatadoras y vasoprotectoras, así como antitrombóticas, antilipémicas, antiateroscleróticas, antiinflamatorias y antiapoptóticas (8).

Se ha demostrado también, que los polifenóles pueden desencadenar cambios en las vías de señalización y, por ende, pueden afectar la expresión de genes. Tal es el caso de la inhibición de la enzima ácido graso sintasa (FAS), enzima que es crucial en la síntesis de colesterol, y por lo tanto su inhibición tendrá efectos directos sobre la disminución de la obesidad y del desarrollo de cáncer; se ha reportado que flavonoides como la quercetina, kaempferol, luteolina, entre otros, tienen la capacidad de inhibir esta enzima, uniéndose irreversiblemente a ella (9,10).

La capacidad de los polifenoles para modular la actividad de diferentes enzimas, y para interferir consecuentemente en mecanismos de señalización y en distintos procesos celulares, puede deberse, al menos en parte, a las características fisicoquímicas de estos compuestos, que les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción (11).

Los efectos beneficiosos de los polifenoles sobre la aterosclerosis se han estudiado ampliamente. Estos compuestos son capaces de atenuar el inicio y la progresión de esta enfermedad debido a su habilidad para atenuar la oxidación de las LDL. Son capaces además de producir un incremento en la concentración de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en el plasma, y también de inhibir la proliferación del músculo liso vascular.

Se ha observado también que los polifenoles procedentes del vino tinto y del zumo de uva reducen la concentración de lípidos plasmáticos (12). Es así que se ha demostrado que la administración crónica de procianidinas en conejos alimentados con dieta hipercolesterolémica, disminuye los niveles plasmáticos de hidroperóxidos lipídicos e incrementa la capacidad antioxidante del plasma de estos animales. De hecho, esta administración previno la aparición de aterosclerosis e inhibió su progresión en los animales (12). También se comprobó que la administración crónica de polifenoles en hámsters que desarrollan depósitos lipídicos aterogénicos similares a los que aparecen en humanos hipercolesterolémicos, reducía los niveles plasmáticos de colesterol, triglicéridos, apolipoproteína B y malondialdehído (MDA), cuando los hámsteres se alimentaban con una dieta hipercolesterolémica. Este efecto se asoció con una disminución en los depósitos de células espumosas en la pared arterial y con una inhibición del desarrollo de la placa aterosclerótica (13).

La administración aguda de procianidinas en ratas normolipémicas alimentadas con dieta estándar, produjo también una disminución drástica de los valores de triglicéridos, ácidos grasos libres y apolipoproteína B, así como un aumento del cociente colesterol-HDL/ colesterol LDL en plasma, lo que representa una situación de lipemia posprandial claramente antiaterogénica.

METODOLOGÍA

Obtención del material vegetal:

Las muestras vegetales de *Passiflora edulis* fueron recolectadas entre las 6:00 am y 8:00 am, en la finca “Los Quingos”, vereda “El Alambrado”, Municipio de Caicedonia, Valle del Cauca, Colombia, en las coordenadas geográficas N 4° 24′ 24″ W 75° 56′ 49″. Un ejemplar fue llevado

al Herbario de la Universidad del Quindío, para su registro e identificación, quedando depositado su registro con código de barras N° 18063.

Para la colecta de las hojas y los frutos de *Passiflora edulis* se verificó que el vegetal se encontrara completamente sano, es decir, que por observación visual directa no se evidenciaran lesiones sobre los tejidos causadas por plagas, enfermedades o el ambiente. El fruto debía presentar madurez para el consumo humano, la cual fue determinada por su coloración amarilla y su cascará dura (basado en su índice de madurez, con valores entre 0,8 y 0,9).

Preparación de los extractos etanólicos de las hojas de *Passiflora edulis*

Las hojas de *Passiflora edulis* fueron inicialmente lavadas con agua de grifo y luego con agua destilada para eliminar partículas no deseables. El material vegetal se desecó en un horno de aire circulante a una temperatura constante de 40 °C hasta alcanzar sequedad a peso constante. Una vez seco, fue pulverizado utilizando un molino.

Para el extracto etanólico, el material pulverizado obtenido fue lixiviado y recirculado durante 8 días usando 500 mL de etanol al 96 %. Luego, se procedió a separar las clorofilas de los extractos mediante una extracción líquido-líquido con etanol-agua (1:7) y finalmente una filtración a 25 µm (14). Después de la separación de las clorofilas; el etanol, fue evaporado a presión reducida (60 mbar) y a temperatura < 40 °C, en un rotavapor marca Heidolph®; el sólido resultante fue pesado para determinar el porcentaje de rendimiento (Ecuación 1). Finalmente, este sólido fue depositado en frasco ámbar y almacenado a 4 °C hasta su utilización en los ensayos.

$$\text{Ecuación 1. Porcentaje de rendimiento} = \frac{\text{gr de extracto}}{\text{gr de material seco}} \times 100 \%$$

Preparación del jugo del fruto de *Passiflora edulis*

El fruto maduro de *Passiflora edulis* fue inicialmente lavado con agua de grifo y posteriormente con agua destilada. El jugo fue extraído por métodos mecánicos, colado para eliminar semillas y filtrado (poro de 1mm) para garantizar su homogeneidad. Posteriormente se evaporó hasta sequedad en el rotavapor y el sólido resultante fue pesado para determinar el porcentaje de rendimiento (Ecuación 1). Luego se depositó en frasco ámbar y se almacenó en nevera a una temperatura de 4 °C, hasta su uso.

Previamente a la realización de cada ensayo, se disolvió en etanol al 10 % y en agua destilada, el sólido del extracto etanólico y el sólido del jugo, respectivamente, a una concentración de 1 mg/mL, para realizar las diferentes pruebas de caracterización bioquímica.

Determinación del contenido fenólico total

El contenido fenólico total de los diferentes extractos fue determinado usando el método del reactivo de Folin-Ciocalteu (15). Brevemente, en un tubo de ensayo se adicionó 50 μL de cada extracto a 1 mg/mL, luego se adicionó 2,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (dilución 1/10 en agua destilada) y 2 mL de Na_2CO_3 al 7,5 % (p/v), se mezcló bien y se incubó a 40 °C durante 15 minutos. La absorbancia de las muestras fue medida por espectrofotometría a 765 nm usando solución de Na_2CO_3 (2 mL de Na_2CO_3 al 2 % en 2,55 mL de agua destilada) como blanco. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg GAE/ g extracto), de acuerdo a una curva de calibración usando el ácido gálico como compuesto fenólico estándar del ensayo.

Determinación de contenido sacárido total

Se usó el método fenol – ácido sulfúrico para medir el contenido polisacárido total (16). Los extractos fueron diluidos en los respectivos solventes y luego serán filtrados en papel filtro de poro 0,22 μm , previo al tratamiento. Brevemente, 100 μL del extracto, 100 μL de fenol (5 %) y 500 μL de H_2SO_4 (95 %) fueron mezclados y luego se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. La absorbancia fue medida a 490 nm. Diferentes concentraciones de glucosa (0, 10, 30, 50, 70 y 90 $\mu\text{g/ml}$) fueron usadas como estándar. Los datos fueron expresados como mg equivalentes de glucosa por gramo de extracto (mg GE/ g extracto).

Determinación de contenido flavonoide Total

Para este ensayo se utilizó una alícuota (150 μL) de cada extracto en tubos eppendorf y se agregó 45 μL de nitrato sódico (NaNO_3) al 5 %. En el minuto quinto y sexto respectivamente, se agregó 90 μL de cloruro de aluminio (AlCl_3) al 10 % y 300 μL de hidróxido de sodio (NaOH) 1 M. El volumen final de la mezcla se aforó con agua destilada hasta completar 1,5 mL. Finalmente se dejó reposar la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 510 nm. Se usó la catequina para trazar la curva de calibración. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de catequina por gramo de extracto seco (mg CAE/ g extracto) (17).

Determinación de Contenido Total de Taninos

Se tomó una alícuota de 250 μL de extracto (1 mg/mL) y se adicionó 500 μL de solución de albumina de suero bovino en tampón acético 0,2 M con pH 5.0 (se ajustó el pH con NaCl al 0,17 M), se mezcló cuidadosamente y se dejó reposar por 15 minutos. Luego se centrifugó a 5000 g por 15 minutos. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y el precipitado fue diluido con 1 mL de solución acuosa que contenía dodecilsulfato sódico (SDS) al 1% y trietanolamina al 4%.

Finalmente, se agregó 250 uL de cloruro férrico (FeCl_3) al 0,01 M en ácido clorhídrico (HCL) al 0,01 M y se dejó reposar por 30 minutos. Se realizó la lectura a una longitud de onda de 510 nm. Como blanco se utilizó 1 mL de solución acuosa (SDS al 1% y trietanolamina al 4%) en 250 uL de la solución de FeCl_3 al 0,01 M en HCL al 0,01 M. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido tánico por gramo de extracto seco (mg EAT/g ES) (17). Se utilizó ácido tánico como estándar a concentraciones de 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 y 0,8 mg/mL para elaborar la curva de regresión.

HPLC del contenido fenólico

Los componentes fenólicos de los extractos fueron analizados de acuerdo a Luzardo *et al* (18). Un análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a detector de diodos (HPLC-DAD) se llevó a cabo en un sistema Agilent HPLC serie 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) usando una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, 4,6 x 250 mm). La columna fue termostáticamente controlada a $35 \pm 0,6$ °C con una proporción de flujo 1 mL/min. La fase móvil consistió de dos solventes: solvente A, que fue agua destilada ajustada con ácido acético 0,1 % y solvente B que fue acetonitrilo. Un gradiente lineal fue usado de la siguiente manera: 80-83 % de solvente A llevado a cabo durante 7 minutos, 83-60 % durante 5 minutos, 60-50 % por 1 minuto y 50-85 % durante 2 minutos. La detección fue llevada a cabo a 280 nm con una velocidad de adquisición de 1 segundo. Un volumen de 20 μL fue inyectado y las muestras fueron analizadas por triplicado. La cuantificación se llevó a cabo usando el método de estándar externos, con estándares comerciales de catequina, quercetina, ácido ascórbico, kaempferol, ácido clorogénico, ácido elágico, ácido caféico, ácido gálico y ácido p -cumarico.

HPLC del contenido de sacárido

Un análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a detector de índice de refracción (HPLC-RID) fue realizado en un sistema Agilent HPLC serie 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). usando una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, 4,6 x 250 mm). La columna fue termostáticamente controlada a $35 \pm 0,6$ °C con una proporción de flujo 1 mL/min. Agua ajustada con acetonitrilo al 50 % fue usada como fase móvil a 1 mL/min (18). Las curvas estándar fueron determinadas con el uso de monosacáridos como xilosa, manosa y arabinosa; y oligosacáridos como: rafinosa, estaquiosa y verbascosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.).

RESULTADOS

Se colectaron 12 kg de fruto de maracuyá, de los cuales se obtuvieron 2300 mL de jugo y luego del proceso de concentración, resultaron 700 g de peso seco, por lo tanto, se tiene un porcentaje de rendimiento del 30 %. En cuanto al extracto etanólico de hojas de *P. edulis* (EEH) se inició el proceso con 475 g de hoja pulverizada, finalmente luego de la lixiviación y la separación de las clorofilas, se obtuvo 9,5 g de extracto seco, es decir, que se tuvo un porcentaje de rendimiento del 2 %.

El contenido polisacárido total del extracto de jugo (EJ) fue de 358,2 mg GE, siendo el doble de lo encontrado en el extracto EEH (151,5 mg GE) (Tabla 1.). Por otra parte, tanto el contenido polifenólico total como el contenido flavonoide, fueron mayores en el extracto EEH con 150,7 mg GAE y 73,2 mg CAE, respectivamente (Tabla 1.).

Tabla 1. Contenido fitoquímico de los extractos de *P. edulis*.

			Extracto del jugo de <i>P. edulis</i>	Extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i>
Contenido (mg GAE)	Polifenólico	Total	30,2 ± 11,8	152,5 ± 20,8
Contenido (mg GE)	Polisacárido	Total	358,2 ± 18,1	151,5 ± 16,4
Contenido (mg CAE)	Flavonoide	Total	12,6 ± 3,3	73,2 ± 3,8
Contenido Total de Taninos (mg TAE)			47,1 ± 6,6	52,0 ± 7,9

mg GAE: miligramo equivalente de ácido gálico/ gramo de extracto; mg GE: miligramo equivalente de glucosa/ gramo de extracto; mg CAE: miligramo equivalente de catequina/ gramo de extracto; mg TAE: miligramo equivalente de ácido tánico/ gramo de extracto.

De los nueve componentes evaluados en HPLC-DAD, se evidenció presencia de 4 de ellos en el extracto de jugo. El ácido ascórbico fue el de mayor concentración con 10,92 mg/g de extracto y el componente polifenólico de mayor concentración fue el ácido ρ -cumárico con 0,55 mg/g de extracto (Tabla 2.). Para el extracto EEH se observó una mayor diversidad, ya que se evidenciaron 8 de los 9 compuestos evaluados, todos con una concentración mayor a la observada en el extracto

de jugo, siendo el ácido ascórbico el que presentó una mayor concentración con 20,96 mg/g de extracto y el componente polifenólico de mayor concentración fue el ácido caféico con 1,55 mg/g de extracto, seguido del ácido elágico con 0,78 mg/g de extracto; en este extracto no se evidenció ácido *p*-cumárico (Tabla 2).

Tabla 2. HPLC-DAD de los componentes polifenólicos de los extractos de *P. edulis*.

	Extracto del jugo de <i>P. edulis</i>	Extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i>
Ácido Ascórbico	10,92 ± 0,145	20,96 ± 1,96
Ácido Clorogénico	ND	0,15 ± 0,003
(+) – Catequina	ND	0,35 ± 0,003
Ácido <i>p</i> -Cumárico	0,55 ± 0,002	ND
Ácido Caféico	ND	1,55 ± 0,001
Rutina	ND	0,19 ± 0,005
Ácido Elágico	ND	0,78 ± 0,002
Quercetina	0,005 ± 0,001	0,34 ± 0,010
Kaempferol	0,010 ± 0,001	0,03 ± 0,003

Los datos se expresan como la media ± SD de tres replicas independientes. Los valores son expresados como mg/g de extracto. **ND:** compuesto no detectado

Por último, a través de la técnica de HPLC-RID, se observaron 5 de los 6 componentes sacáridos evaluados en el extracto de jugo, siendo la manosa y la xilosa los monosacáridos de mayor concentración con 5,116 mg/ g de extracto y 0,106 mg/ g de extracto, respectivamente. Así mismo, se evidenció a la estaquiosa como el oligosacárido de mayor concentración en este extracto con 0,0783 mg/ g de extracto. No se detectó arabinosa (Tabla 3.). En cuanto al extracto EEH, también se observaron 5 de los 6 compuestos analizados, siendo la estaquiosa el compuesto que no fue detectado. Los monosacáridos arabinosa y manosa fueron los que se presentaron en mayor concentración para este extracto con 0,971 mg/ g de extracto y 0,514 mg/ g de extracto, respectivamente; mientras que el oligosacárido de mayor concentración fue la rafinosa con 0,232 mg/ g de extracto (Tabla 3.).

Tabla 3. HPLC-DAD de los componentes sacáridos de los extractos de *P. edulis*.

	Extracto del jugo de <i>P. edulis</i>	Extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i>
Xilosa	0,106 ± 0,007	0,384 ± 0,044
Manosa	5,116 ± 0,297	0,514 ± 0,098
Arabinosa	ND	0,971 ± 0,004
Rafinosa	0,033 ± 0,003	0,232 ± 0,02
Estaquirosa	0,0783 ± 0,001	ND
Verbascosa	0,008 ± 0,00003	0,009 ± 0,0009

Los datos se expresan como la media ± SD de tres replicas independientes. Los valores son expresados como mg/g de extracto. **ND:** compuesto no detectado

DISCUSIÓN

Los componentes bioactivos que obtenemos a través de la dieta, son aislados gracias a los procesos digestivos; dependiendo de su estructura química, cada compuesto tendrá una estabilidad y actividad antioxidante diferentes, no obstante, hay otros factores que afectan su acción biológica en pro del mejoramiento de la salud, como: la matriz en la que se encuentran contenidos, los cambios de pH, de temperatura, la presencia de inhibidores o potencializadores de la absorción, la actividad enzimática propia del organismo, entre otros (19).

Gómez *et al* 2017 (20), señalan que el porcentaje de rendimiento para el extracto de hojas de diferentes pasifloras, oscila entre 11,07 % hasta 54,26 %, siendo factores como la temperatura, la concentración del solvente y el número de ciclos de extracción, determinantes para la obtención de una óptima concentración de metabolitos; en nuestro estudio el porcentaje de rendimiento estuvo por debajo de tal rango, posiblemente debido a que en nuestro ensayo, se retiran inicialmente las clorofilas, metabolitos que representan más de un 85 % del total del extracto. Por otra parte, si comparamos las condiciones reportadas por estos autores, las cuales se asemejaban a las realizadas en nuestra investigación, las cuales eran: temperatura de 40 °C, altas concentraciones de etanol y pocos ciclos de extracción; estas condiciones mostraron los porcentajes de rendimiento más bajos 11,07 %; sin embargo, el contenido flavonoide total se presentó en mayor concentración.

En la revisión realizada por Gadioli *et al* 2018 (21), sobre investigaciones en plantas de género *Passiflora*, se señala que la mayoría de estudios sobre estas plantas han sido realizados en Suramérica, específicamente en Brasil y que la especie *Passiflora edulis*, representa un 30,8 % del total de los estudios, siendo la especie más estudiada del género. El contenido fenólico de estas plantas se encuentra presente principalmente en las partes más externas de las plantas; permitiendo las propiedades sensoriales tales como pigmentación, aroma y el sabor. La mayoría de los estudios realizados en las plantas de pasiflora, reportan que los componentes fenólicos se encuentran principalmente en las hojas (53,7 %) seguido de las cascarras (12,2 %), semillas (8,5 %) y la pulpa (6,1 %). Además, encontraron que, para obtener los extractos, principalmente se utilizan las hojas secadas (84 % de los estudios), mientras que las pulpas se utilizan frescas o liofilizadas. Por otra parte, cuando se trata de los extractos de pulpa, el solvente más utilizado es el metanol (66 % de los estudios) y más de 20 flavonoides han sido identificados, entre ellos Kaempferol; además de cinco ácidos fenólicos como ácido caféico, ácido cumárico, ácido elágico, ácido gálico y ácido siríngico (21).

La caracterización de los componentes fenólicos en las plantas está influenciada por el método de extracción y separación, sus características químicas y el tamaño del compuesto. Patonay *et al.* (22), reportan que la solubilidad de los componentes fenólicos presentes en las plantas es específico de cada especie, así como, la distribución en el tejido y los niveles celulares y subcelulares no son uniformes. Algunos componentes fenólicos están presentes en las paredes celulares o en las vacuolas, que pueden proporcionar compuestos solubles o insolubles característicos. También teniendo en cuenta el tipo de solvente se encuentran diferencias en el rendimiento de extracción de los compuestos fenólicos o los metabolitos en general, siendo los solventes de carácter alcohólico, los que presentan un mayor rendimiento (23). La caracterización fitoquímica de las Pasifloras es amplia, pero *Passiflora edulis* es la especie más analizada en cuanto al perfil de sus componentes fenólicos. En ella se han identificado en total, 52 componentes fenólicos, distribuidos en: 35 componentes flavonoides, 11 ácidos fenólicos, 4 estilbenos y dos cumarinas (24).

Es importante tener en cuenta que la concentración de los componentes bioactivos en plantas (así como sus efectos biológicos) dependen de factores medioambientales como: las condiciones del suelo, la geografía, los fotoperiodos y la temperatura. Se ha reportado que estas diferencias influyen sobre la biosíntesis de la mayoría de los metabolitos secundarios como los flavonoides y esto puede conllevar a las variaciones en el potencial o efectividad antioxidante (25). Es por estos motivos, que los contenidos polifenólicos de la misma planta, pueden variar considerablemente, dependiendo del lugar, año y periodo climático, del cual se haya obtenido la

muestra. Es así como los contenidos polifenólicos de *P. edulis* varían según los reportes y las partes de las plantas evaluadas, tal es el caso reportado por Domínguez *et al* 2019 (26), quienes encontraron un contenido polifenólico de 24,96 mg GAE en las hojas de *P. edulis*, valor bastante menor comparado a lo observado en nuestro estudio (150,7 mg GAE), o lo reportado por Gómes *et al* 2017 (20), con un reporte de 452,8 mg GAE. Otros estudios como el realizado por Zainol *et al* 2018 (27), señalan que las hojas de la maracuyá tiene un contenido polifenólico relativamente bajo de 57,5 mg GAE; o contenidos bastante altos con 470 mg GAE (28).

Un comportamiento similar se observa en el contenido polifenólico del fruto de *P. edulis*, encontrando reportes que van desde contenidos muy bajos como 0,09 mg GAE (29), a reportes de altas concentraciones de contenido fenólico como el realizado por Delvar *et al* 2019 (30), quienes reportan un contenido polifenólico en fruto de maracuyá de 299,8,7 mg GAE. También hay reportes con valores muy similares a los nuestros como los señalados por Rotta *et al*, 2019 (31), quienes reportan un contenido fenólico de 41,5 mg GAE. Así mismo, se ha reportado el contenido polifenólico presente en otras partes de *P. edulis* como en semillas con valores de 250 mg GAE (32), o en cascaras con 24,96 mg GAE (26), siendo estos resultados comparables con los observados en semillas de arándanos, frambuesas y mora.

En cuanto al contenido flavonoide, observamos que el extracto de hojas presenta una mayor concentración de este tipo de metabolitos. De la misma forma se reportan valores altos de contenido flavonoide en hojas de *P. edulis* con valores de 110,9 mg QE (miligramo equivalente de quercetina, por gramo de extracto)(20), estos mismos autores evaluaron a través de HPLC, varios componentes, entre ellos, rutina, el cual no fue evidenciado en las hojas, pero en nuestro estudio a través de esta técnica si se evidencio este flavonoide (0,19 mg/ g de extracto). En el extracto del jugo de *P.edulis* observamos valores menores de contenido flavonoide comparado con el encontrado en el extracto de hojas; sin embargo, los resultados observados en jugo, son mayores a los reportados en otros estudios para esta misma planta y extracto, con valores de 0,04 mg QE (29). El contenido flavonoide también es reportado en extractos de semillas y cascara, con valores de 5,32 mg QE y 5,56 mg QE, respectivamente (33).

La composición química de los extractos de hojas de *P. edulis* ha sido ampliamente estudiada en las últimas décadas, mostrando predominancia de alcaloides, saponinas, pero principalmente polifenoles. Los extractos de hojas de *P. edulis* son ricos en polifenoles, especialmente derivados C-glucosil de apigenina y luteína, tales como vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina (20). Se debe tener en cuenta que la liberación de polifenoles desde extractos de partes de la planta estará influenciada por la solubilidad de estos compuestos fenólicos en el solvente utilizado para el proceso de extracción.

Generalmente se ha asociado la capacidad antioxidante con la concentración de polifenoles; sin embargo, no se puede predecir esta actividad biológica solo sobre la base del contenido de compuestos fenólicos, ya que, hay varias razones que podrían explicar la relación ambigua entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales encontrados en artículos publicados. Estas diferencias pueden deberse a un alto contenido de agentes reductores como el ácido ascórbico presente en los frutos y a factores genéticos, agronómicos y ambientales, propios de cada planta.

En cuanto al contenido de azúcares, en los extractos de la cascara de *P. edulis* se han reportado azúcares neutros tales como: arabinosa (118 mg/g de muestra); glucosa (118 mg/g de muestra), rhamnosa 106 mg/g de muestra), manosa (90 mg/g de muestra), fucosa (16 mg/ g de muestra), Xilosa (36 mg/g de muestra) y ribosa (13 mg/g de muestra); estos resultados obtenidos en la cascara de la maracuyá, son mucho mayores que los encontrados en nuestros extractos de hojas y jugo, posiblemente debido al alto contenido de polisacáridos, principalmente almidón y pectina, los cuales durante el proceso de cuantificación son reducidos a sus componentes monoméricos, debido a la hidrólisis ácida (34). Estudios han reportado varias actividades farmacológicas de los extractos; los azúcares de *P. edulis* incluyendo actividad ansiolítica (35), antihipertensiva (33), antitumoral (36) y efectos en la prevención de los procesos inflamatorios en el colon (37). Los polisacáridos aislados de *P. edulis* poseen actividad antiinflamatoria debido a la inhibición de la síntesis o liberación de importantes mediadores inflamatorios tales como: histamina, serotonina, PGE2 y los niveles de IL-1 β (34). Así mismo, se reportan altos contenidos de azúcares reductores y no reductores en fruto con valores de 65,7 mg/g de muestra para glucosa, 58,6 mg/g de muestra para fructosa y 15,3 mg/g de muestra para sacarosa (38) .

La concentración de azúcar presente en la pulpa de la maracuyá es usualmente alta en comparación con los otros parámetros (39). Los valores de glucosa fueron de 14,3 mg/g y para fructosa de 14,7 mg/g. estos contenidos son dependientes del estado de madurez de la fruta y de las condiciones de crecimiento y medioambientales. Otro parámetro importante para determinar el valor nutricional de un alimento, en este caso del jugo de maracuyá, es el contenido de ácido ascórbico, el cual varía dependiendo de la localización del cultivo, el estado de desarrollo y la madurez del fruto, así como del fotoperiodo y las temperaturas de almacenamiento final del fruto. El valor promedio encontrado en este estudio fue de 0,18 mg/g (40).

En el jugo de varias especies de pasifloras, el contenido de ácido ascórbico ha sido reportado como alto, similar a lo observado en nuestro estudio (10,9 mg), se reportan valores de 0,12 mg/g de extracto fresco para *P. edulis var flavicarpa* y 0,15 mg/ g de extracto fresco para *P. edulis var edulis* (29); es importante aclarar que los valores que reportamos están mg/ g de extracto, es decir,

que ha sufrido un proceso previo de concentración de los metabolitos. También Sathyan *et al* 2019 (41), reporta valores bajos de ácido ascórbico en fruto, con 0,12 mg/g de extracto.

CONCLUSIONES

- Se observó un alto contenido polifenólico y flavonoide en el extracto de hojas de *P. edulis*.
- El mayor contenido sacárido se observó en el extracto de jugo de *P. edulis* con relación al extracto de hojas
- Se evidenciaron compuestos de importancia biomédica como: ácido ascórbico, quercetina y kaempferol, presentes en ambos extractos evaluados.
- Los extractos de hojas de *P. edulis* exhiben altos niveles de contenidos polifenólicos y flavonoides, lo que podría suponer que este tipo de extractos podría ser una opción para mejorar el suministro de antioxidantes para proteger al organismo contra el estrés oxidativo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tiago O, Maicon N, Ivan RC, Diego NF, Vinícius JS, Mauricio F, et al. Plant secondary metabolites and its dynamical systems of induction in response to environmental factors: A review. African J Agric Res. 2017; 12; 12 (2): 71–84.
2. Santhakumar AB, Battino M, Alvarez-suarez JM. Dietary polyphenols : Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. Food Chem Toxicol. 2018; 113 :49–65.
3. Croft KD. Dietary polyphenols: Antioxidants or not? Arch Biochem Biophys. 2016; 595: 120–4. DOI.org/10.1016/j.abb.2015.11.014
4. Santos MC, Toson NSB, Pimentel MCB, Bordignon SAL, Mendez ASL, Henriques AT. Polyphenols composition from leaves of *Cuphea* spp . and inhibitor potential, in vitro, of angiotensin I-converting enzyme (ACE). J Ethnopharmacol. 2020; 255: 112781.
5. Kouka P, Tekos F, Valta K, Mavros P, Aristidis S. Olive tree blossom polyphenolic extracts exert antioxidant and antimutagenic activities in vitro and in various cell lines. Oncol Rep. 2019; 42: 2814–25.
6. Majidinia M, Bishayee A, Yousefi B. Polyphenols : Major regulators of key components of DNA damage response in cancer. DNA Repair (Amst). 2019; 82: 102679.
7. Olszewska MA, Gędas A, Simões M. Antimicrobial polyphenol-rich extracts : Applications and limitations in the food industry. Food Res Int. 2020; 134: 109214.

8. Khalifa I, Zhu W, Li K, Li C. Polyphenols of mulberry fruits as multifaceted compounds: Compositions, metabolism, health benefits, and stability — A structural review. *J Funct Foods*. 2018; 40: 28–43.
9. Rafiei H, Omidian K. Dietary Polyphenols Protect Against Oleic Acid-Induced Steatosis in an *In Vitro* Model of NAFLD by Modulating Lipid Metabolism and Improving Mitochondrial Function. *Nutrients*. 2019; 11: 541.
10. Gómez-Zorita S, Lasa A, Abendaño N, Fernández-Quintela A, Mosqueda-Solís A, Garcia-Sobreviela MP, et al. Phenolic compounds apigenin, hesperidin and kaempferol reduce *in vitro* lipid accumulation in human adipocytes. *J Transl Med*. 2017; 15 (1): 237.
11. Mileo AM, Miccadei S. Polyphenols as Modulator of Oxidative Stress in Cancer Disease: New Therapeutic Strategies. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016: 1–17.
12. Rong S, Zhao S, Kai X, Zhang L, Zhao Y, Xiao X, et al. Procyanidins extracted from the litchi pericarp attenuate atherosclerosis and hyperlipidemia associated with consumption of a high fat diet in apolipoprotein-E knockout mice. *Biomed Pharmacother*. 2018; 97: 1639–44.
13. Carnuta MG, Deleanu M, Barbalata T, Toma L, Raileanu M, Sima AV, et al. Zingiber officinale extract administration diminishes steroyl-CoA desaturase gene expression and activity in hyperlipidemic hamster liver by reducing the oxidative and endoplasmic reticulum stress. *Phytomedicine*. 2018; 48: 62–9. DOI:10.1016/j.phymed.2018.04.059
14. Aguillón J, Maldonado ME, Loango Chamorro N, Arango SAV. Antioxidant and antiproliferative activity of ethanolic and aqueous extracts from leaves and fruits juice. *Perspect En Nutr Humana*. 2013; 15: 13–25.
15. Muñoz-Bernal ÓA, Torres-Aguirre GA, Núñez-Gastélum JA, de la Rosa LA, Rodrigo-García J, Ayala-Zavala JF, et al. Nuevo Acercamiento a La Interacción Del Reactivo De Folin-Ciocalteu Con Azúcares Durante La Cuantificación De Polifenoles Totales. *Rev Espec en Ciencias Químico-Biológicas*. 2017; 20 (2): 23–8. DOI:10.1016/j.recqb.2017.04.003
16. López-legarda X, Taramuel-gallardo A, Arboleda- C. Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales. *Rev Cuba Química*. 2017; 29 (2): 180–98.
17. Armentano MF, Bisaccia F, Miglionico R, Russo D, Nolfi N, Carosino M, et al. Antioxidant and Proapoptotic Activities of *Sclerocarya birrea* [(A. Rich.) Hochst.] Methanolic Root Extract on the Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG2. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:1–11.
18. Luzardo-Ocampo I, Campos-Vega R, Gaytán-Martínez M, Preciado-Ortiz R, Mendoza S, Loarca-Piña G. Bioaccessibility and antioxidant activity of free phenolic compounds and oligosaccharides from corn (*Zea mays* L.) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) chips during *in vitro* gastrointestinal digestion and simulated colonic fermentation. *Food Res Int*. 2017; 100: 304–11. DOI:10.1016/j.foodres.2017.07.018
19. Campos-Vega R, Vázquez-Sánchez K, López-Barrera D, Loarca-Piña G, Mendoza-Díaz S, Oomah BD. Simulated gastrointestinal digestion and *in vitro* colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): Bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Res Int*. 2015; 77: 156–61. DOI:10.1016/j.foodres.2015.07.024
20. Gomes SVF, Portugal LA, dos Anjos JP, de Jesus ON, de Oliveira EJ, David JP, et al. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species. *Microchem J*. 2017; 132: 28–35. DOI:10.1016/j.microc.2016.12.021

21. Gadioli IL, da Cunha M de SB, de Carvalho MVO, Costa AM, Pineli L de L de O. A systematic review on phenolic compounds in *Passiflora* plants: Exploring biodiversity for food, nutrition, and popular medicine. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018; 24; 58 (5): 785–807. DOI: 10.1080/10408398.2016.1224805
22. Patonay K, Szalontai H, Csugány J, Szabó-Hudák O, Kónya EP, Németh ÉZ. Comparison of extraction methods for the assessment of total polyphenol content and in vitro antioxidant capacity of horsemint (*Mentha longifolia* (L.) L.). *J Appl Res Med Aromat Plants.* 2019; 15(September).
23. Oliveira DA, Angonese M, Gomes C, Ferreira SRS. Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: Sustainable recovery and biological activities. *J Supercrit Fluids.* 2016; 111: 55–62. DOI: 10.1016/j.supflu.2016.01.010
24. Sakalem ME, Negri G, Tabach R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. *Rev Bras Farmacogn.* 2012; 22 (6): 1219–32.
25. Li Y, Kong D, Fu Y, Sussman MR, Wu H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiol Biochem.* 2020; 148:80–9. DOI: 10.1016/j.plaphy.2020.01.006
26. Domínguez-rodríguez G, Concepción M, Plaza M, Luisa M. Revalorization of *Passiflora* species peels as a sustainable source of antioxidant phenolic compounds. *Sci Total Environ.* 2019; 696: 134030. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134030
27. Zainol K, Zin ZM, Kamarudin KS, Danish-daniel M. Effect of ethanol in ultrasonic assisted extraction technique on antioxidative properties of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves. *Malays, Appl Biol.* 2018; 47 (6): 19–27.
28. Gunathilake KDPP, Ranaweera KKDS, Rupasinghe HPV. Change of phenolics, carotenoids, and antioxidant capacity following simulated gastrointestinal digestion and dialysis of selected edible green leaves. *Food Chem.* 2018; 245: 371–9. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.10.096
29. Charan SM, Gomez S, Sheela KB, Pushpalatha PB, Suman KT. Effect of storage conditions and duration on quality of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) nectar. *Asian J Dairy Food Res.* 2017; 6;36 (02): 161–5.
30. Delvar A, de Caro P, Candy L, Caro Y, Cheong Sing AS, Raynaud C. Integrated process for extraction and formulation in emulsions of active molecules from fresh passion fruits (*Passiflora edulis* Sims). *J Food Eng.* 2019; 263: 388–97.
31. Rotta EM, Rodrigues CA, Jardim ICSF, Maldaner L, Visentainer JV. Determination of phenolic compounds and antioxidant activity in passion fruit pulp (*Passiflora* spp.) using a modified QuEChERS method and UHPLC-MS/MS. *Lwt.* 2019; 100:397–403.
32. Rotta EM, Giroux HJ, Lamothe S, Bélanger D, Sabik H, Visentainer JV, et al. Use of passion fruit seed extract (*Passiflora edulis* Sims) to prevent lipid oxidation in dairy beverages during storage and simulated digestion. *Lwt.* 2020; 123.
33. González L, Álvarez A, Murillo E, Guerra C, Méndez J. Potential Uses of the Peel and Seed of *Passiflora Edulis* F. *Edulis* Sims (Gulupa) From Its Chemical Characterization, Antioxidant and Antihypertensive Functionalities. 2019; 12 (10). DOI:10.22159/ajpcr.2019.v12i10.33828
34. Silva RO, Damasceno SRB, Brito T V., Dias JM, Fontenele AM, Braúna IS, et al. Polysaccharide fraction isolated from *Passiflora edulis* inhibits the inflammatory response and the oxidative stress in mice. *J Pharm Pharmacol.* 2015; 67 (7): 1017–27. DOI: wiley.com/10.1111/jphp.12399

35. Otify A, George C, Elsayed A, Farag MA. Mechanistic evidence of *Passiflora edulis* (Passifloraceae) anxiolytic activity in relation to its metabolite fingerprint as revealed via LC-MS and chemometrics. *Food Funct.* 2015; 6 (12): 3807–17.
36. Ramírez V, Arango SS, Uribe D, Maldonado ME, Aguillón J. Effect of the Ethanolic Extract of *Passiflora edulis* F . *Flavicarpa* Leaves on Viability, Cytotoxicity and Apoptosis of Colon Cancer Cell Lines. *J Chem Pharm Res.* 2017; 9 (6): 135–9.
37. Cristina Lopes do Carmo M, Mateus Martins I, Elisa Ramos Magalhães A, Roberto Maróstica Júnior M, Alves Macedo J. Passion fruit (*Passiflora edulis*) leaf aqueous extract ameliorates intestinal epithelial barrier dysfunction and reverts inflammatory parameters in Caco-2 cells monolayer. *Food Res Int.* 2020; 133(March).
38. Xiong F, Li X, Zheng L, Hu N, Cui M, Li H. Characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *Passiflora edulis* Sims peel under different degradation methods. *Carbohydr Polym.* 2019; 218: 46–52.
39. Oliveira-Folador G, Bicudo M de O, de Andrade EF, Renard CM-GC, Bureau S, de Castilhos F. Quality traits prediction of the passion fruit pulp using NIR and MIR spectroscopy. *LWT.* 2018 ;95: 172–8.
40. Pertuzatti PB, Sganzerla M, Jacques AC, Barcia MT, Zambiasi RC. Carotenoids, tocopherols and ascorbic acid content in yellow passion fruit (*Passiflora edulis*) grown under different cultivation systems. *LWT - Food Sci Technol.* 2015; 64 (1): 259–63.
41. Sathyan A, Vincent L, Krishna BA, Pradeepan V, Dileep AC, Ntroduction II. A Study on the Antioxidant and Anti-Microbial Properties of Juices of Four Varieties of Passion Fruit (*Passiflora Edulis*, *Passiflora Foetida*, *Passiflora Edulis* F . *Flavicarpa* and *Passiflora Quadrangularis*). 2019; 7 (5): 473–83.

CAPITULO IV

CITOTOXICIDAD Y ACTIVIDAD APOPTÓTICA DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS Y JUGO DE *Passiflora edulis*

INTRODUCCIÓN

Este capítulo es el resultado del trabajo realizado durante la pasantía Nacional en el Grupo de Investigación e Innovación Biomédica de la Facultad de Ciencias Exactas y Aplicadas del Instituto Tecnológico Metropolitano, de la ciudad de Medellín; bajo la tutoría de la MSc Sandra Sulay Arango y el Dr. Diego Fernando Uribe Yunda.

Esta pasantía de investigación tenía como finalidad adquirir conocimientos en las técnicas de cultivo celular, así mismo, adquirir destrezas para el trabajo con las células modelo de mi investigación, las células HepG2. Para un mayor aprovechamiento de tiempo y recursos se procedió a evaluar la viabilidad del modelo celular expuesto a los tratamientos con los extractos de hojas y jugo de *P. edulis*, así como, frente a la toxicidad que podría causar el ácido oleico; ácido graso que se utilizaría en la investigación para estimular la síntesis de lípidos por parte de las células HepG2.

Como el modelo celular objeto de estudio proviene de un hepatocarcinoma humano, se procedió a evaluar el efecto citotóxico y actividad apoptótica de los extractos en mención y con los resultados de este trabajo, participamos en el **IV Congreso Internacional de Ciencia, Tecnología e Innovación para la Sociedad, CITIS 2017**, realizado en Guayaquil, Ecuador; con la ponencia titulada “Actividad citotóxica y apoptótica de los extractos de hojas y de jugo de *Passiflora edulis*”. Sumado a esto; los resultados fueron publicados en el artículo titulado “**Citotoxyc and apoptotic activity of extracts from leaves and juice of *Passiflora edulis***” en la revista *Journal of Liver Research, Disorders & Therapy*, documento publicado en el 2018, el artículo está articulado al presente capítulo.

En relación al modelo celular utilizado, se ha reportado que la tasa de mortalidad debida a hepatocarcinoma ha incrementado significativamente durante la última década.

Desafortunadamente, un tratamiento exitoso para este tipo de cáncer aún no se ha resuelto; a pesar de que existen varios protocolos que se han implementado actualmente, en los que se incluyen, extracción quirúrgica o ablación, quimioterapia y embolización; métodos que se ven limitados debido a sus efectos secundarios, los riesgos de la cirugía y en especial el mal o tardío pronóstico de la enfermedad. El uso de la medicina tradicional a base de plantas medicinales, ha venido retomando fuerza para el tratamiento de diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer hepático; debido principalmente a los bajos costos, menor toxicidad del producto, efectos biológicos de mayor duración y reducidos efectos adversos (1). La protección que pueden brindar los compuestos fitoquímicos al hígado pueden variar entre: bloqueo o eliminación de virus, inhibición de la fibrogénesis, reducción de procesos oxidativos y la inhibición o supresión de la tumorigénesis (2).

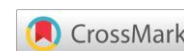
Passiflora edulis, mejor conocida como maracuyá o fruta de la pasión, pertenece a la familia Passifloraceae; es usada como alimento en diferentes presentaciones culinarias, y tiene un alto uso en la medicina tradicional para el tratamiento de dolencias, entre ellas se destaca el uso en afecciones de tipo nervioso. Así mismo, también se utiliza en la prevención del cáncer y se ha demostrado que posee efectos anticancerígenos sobre diferentes líneas celulares; por citar, el trabajo realizado por De Neira (3) quien encontró que diferentes fracciones del jugo de *P. edulis* inhiben el crecimiento de la leucemia de células T humanas MOLT-4 e induce citotoxicidad. Además, Silva (4) señaló que los polisacáridos de esta planta tienen la capacidad de inhibir la proliferación de la línea celular de adenocarcinoma de colon humano HCt-8; del mismo modo, hemos observado el efecto antiproliferativo de los extractos de hojas y fruto sobre las líneas celulares de cáncer de colon, SW480 y sus derivadas metastásicas SW620 (5).

Los resultados de esta investigación señalan que los extractos de hojas y jugo de *Passiflora edulis* poseen efectos proapoptóticos sobre las células HepG2, lo que permite considerar a esta planta como una especie promisoriosa para la obtención de compuestos bioactivos que permitan la quimioprevisión del hepatocarcinoma humano. Estos resultados cobran importancia, toda vez que, la acumulación excesiva de lípidos al interior del hepatocito, conocida como enfermedad de hígado graso no alcohólica, si no es controlada puede llegar a convertirse en patologías de mayor riesgo como lo son la esteatohepatitis, cirrosis, incluso un hepatocarcinoma (6).

BIBIOGRAFÍA

1. Abdel-hamid NM, Abass SA, Mohamed AA, Muneam D. Herbal management of hepatocellular carcinoma through cutting the pathways of the common risk factors. Biomed Pharmacother .

- 2018;107:1246–58. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.104>
2. Hong M, Li S, Tan HY, Wang N, Tsao S, Feng Y. Current Status of Herbal Medicines in Chronic Liver Disease Therapy: The Biological Effects , Molecular Targets and Future Prospects. 2015;28705–45.
 3. De Neira CM. The effects of yellow passion fruit, *Passiflora edulis* Flavicarpa, phytochemicals on cell cycle arrest and apoptosis of Leukemia Lymphoma MOLT-4 cell line. Thesis for master Science. University of Florida. 2003.
 4. Silva DC, Freitas ALP, Barros FCN, Lins KOAL, Alves APNN, Alencar NMN, et al. Polysaccharide isolated from *Passiflora edulis*: Characterization and antitumor properties. *Carbohydr Polym* . 2012;87(1):139–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.029>
 5. Aguilón J, Maldonado ME, Loango Chamorro N, Arango SAV. Antioxidant and antiproliferative activity of ethanolic and aqueous extracts from leaves and fruits juice. *Perspect En Nutr Humana*. 2013;15:13–25.
 6. Mundi, M. S., Velapati, S., Patel, J., Kellogg, T. A., Abu Dayyeh, B. K., & Hurt, R. T. (2020). Evolution of NAFLD and Its Management. *Nutrition in Clinical Practice*, 35(1), 72–84. <https://doi.org/10.1002/ncp.10449>



Citotoxic and apoptotic activity of extracts from leaves and juice of *passiflora edulis*

Abstract

Liver cancer has become as the second cause of cancer related death worldwide, with hepatocellular carcinoma being the most frequent type of liver cancer; this is caused by hepatocyte transformation, being common in patients with cirrhosis, hepatitis, metabolic syndrome such as obesity or dyslipidemia, which has favored an increase in their incidence and mortality rates. Some phytochemicals derived from different parts of plants have shown antiproliferative and proapoptotic activity; however, few advances in research on promising bioactive substances has been reported. In the present work, it was evaluated the effect of leaf and juice extracts of *P. edulis* var. *flavicarpa* on the viability, cytotoxicity and induction of apoptosis, in an *in vitro* model of liver cancer (HepG2 cell). Phytochemical analysis of the extracts was based on the quantification of polyphenolic and polysaccharide content, metabolites to which antitumor properties have been attributed.

In this way, it was found that the leaf extract had higher polyphenolic content, whereas in the juice extract more polysaccharide content was observed. On the other hand, a significant decrease in viability was observed with juice extract at 400µg/ml and a significant increase in cytotoxicity by leaf extract at 25µg/ml; finally, both extracts significantly increased proapoptotic activity. The results suggest that *P. edulis* is a potential source of phytochemical compounds with anticancer properties in the cellular model evaluated.

Keywords: *passiflora*, liver cancer, cytotoxicity, apoptosis

Volume 4 Issue 2 - 2018

Aguillón J,¹ Arango SS,² Uribe DF,³ Loango N⁴

¹Master in Biomedical Sciences, University of Quindío,

Colombia, ²Master in Biotechnology, Metropolitan Technological Institute, Chile

³Doctor in Biomedical Basic Sciences, Metropolitan Technological Institute, Chile

⁴Doctor of Biomedical Sciences, University of Quindío, Colombia

Correspondence: Johanny Aguillón Osma, Master in Biomedical Sciences, Bachelor of Biology and Environmental Education, Teacher in University of Quindío, Colombia, Email jaguillon@uniquindio.edu.co

Received: March 14, 2018 | **Published:** March 26, 2018

Introduction

Liver cancer is the fifth most frequent neoplasm in men and the ninth in women, with 782,000 new cases of cancer diagnosed in 2012, is the second cause of death associated with cancer in the world, with 746,000 deaths in 2012.¹ Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common type of liver cancer. It is produced by the transformation of hepatocytes and is common in patients with cirrhosis, considered the pre-neoplastic state.² Among the main risk factors are infection with hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), alcohol intake, dietary exposure to Aflatoxin B1 (AFB1) and tobacco, among others³ Likewise, in recent years it has been shown that diabetes mellitus and other factors associated with the metabolic syndrome such as obesity or dyslipidemias, favor the increase in the incidence and mortality rates of HCC.⁴ del CHC.

Throughout history, traditional medicine has been used for the treatment of cancer; practice adopted due to the advantages they have shown in terms of efficiency, few side effects, easy availability and improvement in quality of life. Numerous investigations have identified a diversity of components in these medicinal plants with chemopreventive and or chemotherapeutic potential, being the family of polyphenols a group of great interest.⁵

Among the best characterized polyphenols are the flavonoids, which are a group of secondary metabolites, with variable phenolic structure and found in different parts of the plant; More than 5,000 flavonoids have been extracted from medicinal plants and their chemical structures have been elucidated. Some of these have been reported with biological activity for the treatment of various conditions such as cardiovascular diseases,⁶ diabetes,⁷ cancer,⁸⁻¹⁰ viral

infections, as well as their protective potential against liver damage.⁵

The species *Passiflora edulis* known with the common name of passion fruit, passion fruit, or passion fruit, is cultivated in tropical and subtropical countries; the variety *P. edulis* Sims var. *flavicarpa*, has yellow fruits and grows from sea level to 1,000 masl,¹¹ different parts of the plant have been used in traditional medicine for the treatment of nervous, cardiovascular, muscle relaxant and cancer (intestinal tumors).¹²⁻¹⁴ Additionally, different studies have demonstrated the ability of their extracts to inhibit MMP-2 and MMP-9 proteins, two metallo-proteases involved in tumor invasion, metastasis and angiogenesis,¹⁵ ethanolic and aqueous extracts of *P. edulis* have shown antioxidant activity, and its effect on the reduction of the viability of colon cancer cell lines was demonstrated.¹⁶ This plant is promising for the search of bioactive compounds for the prevention and control of carcinogenic processes. In the present work, the cytotoxic and apoptotic activity of extracts of *P. edulis* Sims var. *Flavicarpa* on the line of HepG2 hepatocellular carcinoma.

Methodology

Obtaining the samples

Leaves and fresh fruits of *Passiflora edulis* F. *flavicarpa* were collected in the Municipality of Caicedonia, Valle del Cauca, Colombia (4.2424 °N, 75.5649 °W at 1100msnm). The specimens were identified in the Herbarium of the University of Quindío (Collection: 18063).

Obtaining extracts of *P. edulis*

The ethanolic extract of leaves was obtained by leaching with



96% ethanol for 8 days. Then a chlorophyll separation was carried out. The extract of the juice was obtained from fruits with a degree of maturation for human consumption. A filtration of the fruit pulp was performed and then centrifuged at 2400rpm for 1 minute. Both extracts were concentrated in a rotary evaporator (Heidolph™) until dry, to be stored protected from light at -20 °C until use.¹⁶

Determination of the total phenolic content

The total phenolic content of both extracts was determined through the Folin-Ciocalteu method.¹⁷ The absorbance of the assays was measured at 765nm, using as a target a 2% Na₂CO₃ solution. The results were expressed as mg equivalents of gallic acid per gram of extract (mg equiv/g extract), according to a calibration curve previously made, taking as a standard the gallic acid.

Determination of the total polysaccharide content

The phenol-sulfuric acid method was used to measure the total polysaccharide content.¹⁸ Absorbance was measured at 490nm. A calibration curve was previously made with glucose; the results are expressed as mg equivalents of saccharide per gram of extract.

Cell culture

HepG2 liver cancer cell line was used for the assays. Cells were cultured in DMEM medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100U/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin (Life Technologies), maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. The cells were cultured in 96-well dishes (1x10⁴ cells/well) and settled for 24 hours before starting treatments.

Determination of cell viability: MTT assay

The evaluation of the cytotoxicity of the extracts was evaluated with the MTT assay [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma Aldrich), following the methodology of Ramírez.¹⁹ After 24 hours of cell establishment, treatments were started with different concentrations of the extracts (25µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml, 200µg/ml and 400µg/ml), for 24, 48 and 72 hours. At the end of the time, 20µl of MTT (5mg/ml in PBS) was added and incubated for 4 hours at 37°C in the dark. Finally, the absorbance at 560nm was measured using the Glomax™ multidetection system (Promega). Cells without treatment were used as a negative control. The assays were performed in quintuplicate for each of the concentrations evaluated.

The viability percentage was determined with the following equation: % viability = (DOt/DOc) x 100

Where, DOt is the optical density of the cells treated with the extracts and DOc is the optical density of the cells without treatment.

Evaluation of effect of treatments on viability, cytotoxicity and apoptosis

To determine the viability, cytotoxicity and apoptosis induced by the treatments, the ApoTox-Glo™ Triplex Assay commercial kit (Promega) was used following the manufacturer's recommendations. For the assay, 1 x 10⁴ cells were seeded per well, with the extracts at concentrations of 25µg/ml, 100µg/ml and 400µg/ml and incubated at 37°C for 72 hours. All measurements were made in triplicate in the Glomax multidetection system (Promega) and the results were presented as relative fluorescence units (URF) and as relative units of luminescence (URL).

Statistic analysis

For all trials, a completely randomized experimental design was used. The means and the comparison of the differences of the means between treated and untreated cells, with confidence intervals of 95%±SD were obtained using Graph Pad Prism® 6.0 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, United States). The two-tailed Student's t test was used for unpaired analysis to compare the results between treated and untreated cells. Likewise, a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed. Values p<0.05 were considered statistically significant. All experiments were carried out at least in triplicate.

Results

The yield percentages of each of the extracts of *P. edulis* were calculated, finding that for the leaf extract the yield was 2% and for the Juice extract of 39%. Regarding the polyphenolic content, the leaf extract presented a higher content with 150.3 mg equiv acid/g of extract, while for the polysaccharide content it was the Juice extract which had the highest proportion with 365 mg equiv/g of extract (Table 1).

Table 1 Polyphenolic and polysaccharide content of the extracts

Extract	Polyphenolic Content		Polysaccharide Content	
	(mg equiv. gallic/g of extract)		(mg equiv./g of extract)	
Etanolic Leaves	150,3±22,5		154,7±16,9	
Aqueous Juice	28,2±12,4		365,5±18,8	

With the MTT assay it was observed that for the ethanolic extract of leaves, as the concentration of the extract was increased, cell viability increased; however, by increasing the exposure time in all the concentrations evaluated, viability decreased (Figure 1). It is important to note that none of the concentrations evaluated presented a viability lower than 92%.

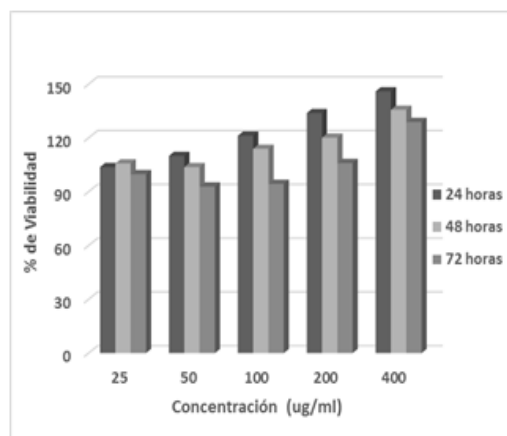


Figure 1 Cell viability with the ethanolic extract of *P. edulis* leaves.

For the extract of Juice of *P. edulis* the behavior was different, since no significant changes were obtained in the viability percentages in the first 48 hours of treatment. However, after 72 hours, a reduction in viability was observed for the first three concentrations (25µg/ml, 50µg/ml and 100µg/ml) (Figure 2). The greatest decrease in viability at 81% was with the concentration of 100µg/ml at 72.

When evaluating the viability of the HepG2 cells against the extracts with the ApoTox-Glo™ Kit, it was found that for the leaf

extract the viability increased to the concentrations of 25 and 100µg/ml, this increase being significant with respect to the control (Figure 3). On the side of the Juice extract, a decrease in viability was observed at 400µg/ml ($p \leq 0.001$) (Figure 4).

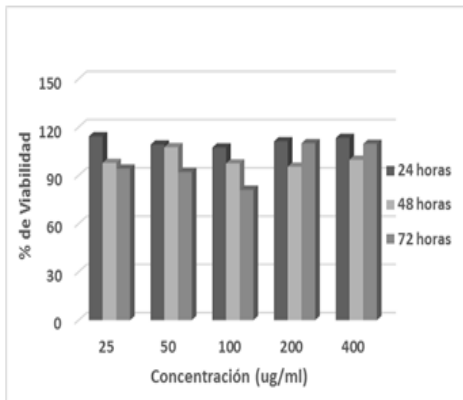


Figure 2 Cell viability with Juice extract of *P. edulis*.

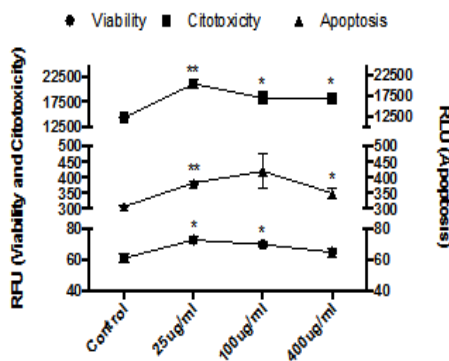


Figure 3 Feasibility, cytotoxicity and cellular apoptosis with the leaf extract of *P. edulis*.

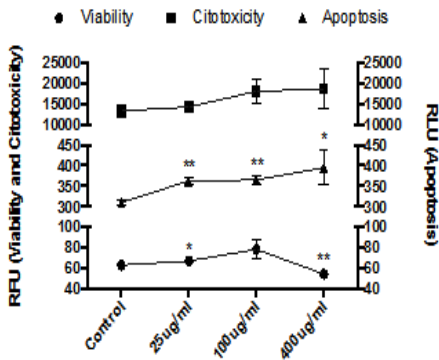


Figure 4 Viability, cytotoxicity and cellular apoptosis with Juice extract of *P. edulis*.

On the other hand, the cytotoxicity caused by the leaf extract increased significantly compared to the control, being the concentration of 25µg/ml the one that caused the greatest toxicity (Figure 3). In the case of the Juice extract, although the levels of cytotoxicity increased as the concentration of the extract increased, this increase was not statistically significant (Figure 4). Finally, the results of the apoptosis inducing effect indicate that both the leaf extract and the Juice extract significantly increase the activity of caspases 3 and 7, with the effect of the Juice extract causing the most proapoptotic activity (Figure 3 (Figure 4).

Discussion

The development of cancer depends to a great extent on the alteration in the mechanisms that regulate cell proliferation, as well as on the components involved in the suppression of apoptosis; therefore, these cellular processes represent obvious objectives for intervention in any type of therapeutic strategy against cancer. In this sense, several studies have focused on the cytotoxic and or antiproliferative properties of natural extracts, with high polyphenolic or polysaccharide contents, demonstrating their significant potential as anticancer agents.²⁰

At present, polysaccharides are considered a group of great interest because of their potential to inhibit tumor growth or to induce apoptosis, as has been demonstrated in *in vitro* studies and in animal models;^{21,22} In addition, it has been observed that polysaccharides derived from plants are relatively safe compared to other immunomodulators due to their low toxicity. Likewise, polyphenols are another group of compounds, which have been shown in various studies to have biological activity, associated with the prevention of different types of cancer.^{9,23,24} The chemopreventive effect of polyphenols is due to the potential to regulate the cell cycle, ability to induce apoptosis, antioxidant activity, and induction of enzymatic detoxification, regulation of the immune system, anti-inflammatory activity and effects on cell signaling.²⁵ In the specific context of liver cancer, its antimutagenic and anticancer activity has been validated.^{9,20,26} For these reasons, it can be said that the effects observed on the part of the extracts of both leaves and Juice of *P. edulis*, may be due to the high content of both polysaccharides and polyphenols.

If a comparison of the observed results with leaf and juice extracts is made in other cell lines (SW480, SW620, Caco-2, Vero), a difference with respect to the cytotoxic response and in the induction of apoptosis is presented.^{16,27,28} These differences may be due to the intrinsic variation linked to the origin of each cell line, which raises the need to evaluate the extracts in the greatest diversity of cell lines possible, since the cellular response is mediated by several factors such as the metabolism of each cell. Cell line, the presence of specific membrane receptors, genomic instability and the diversity of cellular phenotypes.

In comparison with other cell lines, HepG2 cells have shown greater resistance to the biological activity of both polyphenols and polysaccharides.²² For example, in the study by Kuete et al.²⁹ the cytotoxic effect of the juice extract of *P. edulis* on CCRF-CEM leukemia cells presented an LD50 of 8.2µg/ml, whereas for HepG2 cells the maximum concentration evaluated (80µg/ml) did not generate toxicity. Similarly, Ramos³⁰ reported a low cytotoxic effect of passion fruit juice on MCF-7 breast cancer cells, since the LD50 was > 500µg/ml; However, this same author reports that the type of extraction by which the extract is obtained will determine the purity of the metabolites and therefore their cytotoxic effect.

One of the possible explanations of the effect on apoptosis observed in our results, could be given by the action of the polysaccharides of the extracts on the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), which is an important factor of survival in the regulation of cell proliferation and the development of cancer. Shen et al.³¹ suggest that the inactivation of STAT3, mediated by the polysaccharides present in the fruits of *Curcubita moschata*, is responsible for the apoptosis-inducing effect.

On the other hand, in all parts of *P. edulis*, with the exception of

the roots, the presence of β -carbonyl alkaloids has been found.³² This type of metabolites has been shown to have anticancer activity due to its ability to inhibit topoisomerase I and II, telomerase and CDKs (cyclin dependent kinases), among others, which was evidenced when this type of alkaloids was evaluated in HepG2 cells, demonstrating its potent cytotoxic capacity on this cellular model of liver cancer.³³

Similar to that reported by Rowe,³⁴ who evaluated the antitumor activity of *P. edulis* Juice, we can point out that the phytochemical components present in both extracts have activity on the regulation of the activation of apoptosis, specifically on the activity of the caspases, but little is its effect on the reduction in cell proliferation. Likewise, in experiments carried out with polysaccharides extracted from *P. edulis*, inhibition of tumor growth has been demonstrated, which is not related to the inhibition of cell proliferation; however, it was observed that this inhibition would be related to necrotic processes, according to the histopathological analysis.³⁵

Conclusion

This study showed that both leaf extracts and juice of *P. edulis* have proapoptotic activity in the *in vitro* model of liver cancer evaluated. In addition, the results suggest that due to its high content of secondary metabolites such as polyphenols and polysaccharides, *P. edulis* can be considered as a promising species for the search for compounds that allow the chemoprevention of this type of cancer.

Acknowledgements

We thank for the support to COLCIENCIAS, the Metropolitan Technological Institute (ITM) and the University of Quindío.

Conflict of interest

There is no conflict of interest.

References

1. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
2. <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/liver-cancer>
3. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2557–2576.
4. Forner A, Reig M, Varela M, et al. Diagnóstico y tratamiento del carcinoma hepatocelular. Actualización del documento de consenso de la AEEH, SEOM, SERAM, SERVEI y SETH. *Med Clin*. 2016;146(11):511.e1–511. e22.
5. Xia JF, Gao JJ, Inagaki Y, et al. Flavonoids as potential anti-hepatocellular carcinoma agents: Recent approaches using HepG2 cell line. *Drug Discov Ther*. 2013;7(1):1–8.
6. Testai L, Calderone V. Nutraceutical value of citrus flavanones and their implications in cardiovascular disease. *Nutrients*. 2017;9(5): E502.
7. Dłudla PV, Joubert E, Muller CJF, et al. Hyperglycemia induced oxidative stress and heart disease cardioprotective effects of rooibos flavonoids and phenylpyruvic acid-2-O- β -D-glucoside. *Nutr Metab*. 2017; 14:45.
8. Wang D, Sun Q, Wu J, et al. A new Prenylated Flavonoid induces G0/G1 arrest and apoptosis through p38/JNK MAPK pathways in Human Hepatocellular Carcinoma cells. *Sci Rep*. 2017;7:5736–5748.
9. Desta KT, Kim GS, El-Aty AMA, et al. Flavone polyphenols dominate in Thymus schimperi Ronniger: LC-ESI-MS/MS characterization and study of anti-proliferative effects of plant extract on AGS and HepG2 cancer cells. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2017;1053:1–8.
10. Olugbami JO, Damoiseaux R, France B, et al. A comparative assessment of antiproliferative properties of resveratrol and ethanol leaf extract of *Anogeissus leiocarpus* (DC) Guill and Perr against HepG2 hepatocarcinoma cells. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17:381–392.
11. Castro JA, Neves CG, de Jesus ON, et al. Definition of morpho-agronomic descriptors for the characterization of yellow passion fruit. *Sci Hortic*. 2012;145:17–22.
12. Dhawan K, Dhawan S, Sharma A. Passiflora: A review update. *J Ethnopharmacol*. 2004;94(1):1–23.
13. Abhilash ES, Parayil SP, Raju AR, et al. A study on the medicinal value and distribution of climbers of Nattika, India. *Asia Pacific J Environ Ecol Sustain Dev*. 2013;1(1):36–39.
14. Karunyal JS, Andrews B. Traditional medicinal plant wealth of Pachalur and Periyur hamlets Dindigul district, Tamil Nadu. *Indian J Tradit Knowl*. 2010;9(2):264–270.
15. Puricelli L, Dell'Aica I, Sartor L, et al. Preliminary evaluation of inhibition of matrix-metalloprotease MMP-2 and MMP-9 by Passiflora edulis and P. foetida aqueous extracts. *Fitoterapia*. 2003;74(3):302–304.
16. Aguillón JO, Maldonado ME, Loango NC, et al. Antioxidant and antiproliferative activity of ethanolic and aqueous extracts from leaves and fruits juice. *Perspect En Nutr Humana*. 2013;15(1):13–25.
17. Guha G, Rajkumar V, Ashok Kumar R, et al. Therapeutic potential of polar and non-polar extracts of *Cyanthillium cinereum in vitro*. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2011;1–10.
18. Albalasmeh AA, Berhe AA, Ghezzehei TA. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydr Polym*. 2013;97(2):253–261.
19. Ramirez V. Actividad anticancerígena de extractos de maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) en células de cáncer de colon humano, Tesis de Maestría, Departamento de Biomedicas, Colombia: Universidad de Antioquia; 2015.
20. Armentano MF, Bisaccia F, Miglionico R, et al. Antioxidant and proapoptotic activities of sclerocarya birrea [(A. Rich.) Hochst.] methanolic root extract on the hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *Biomed Res Int*. 2015;561–589.
21. Nazeam JA, Gad HA, Esmat A, et al. Aloe arborescens Polysaccharides: *In Vitro* Immunomodulation and Potential Cytotoxic Activity. *J Med Food*. 2017;20(5):491–501.
22. Ahmed OM, Ahmed RR. Anti-proliferative and apoptotic efficacies of ulvan polysaccharides against different types of carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *J Cancer Sci Ther*. 2014;6(6):202–208.
23. Amawi H, Ashby CR, Samuel T, et al. Polyphenolic nutrients in cancer chemoprevention and metastasis: Role of the epithelial-to-mesenchymal (EMT) pathway. *Nutrients*. 2017;9(8):911–924.
24. Curti V, Di Lorenzo A, Dacrema M, et al. *In vitro* polyphenol effects on apoptosis: an update of literature data. *Semin Cancer Biol*. 2017;46:119–131.
25. Zhang H, Tsao R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr Opin Food Sci*. 2016;8:33–42.
26. Kumar N, Biswas S, Mathew AE, et al. Pro-apoptotic and cytotoxic effects of enriched fraction of *Elytranthe parasitica* (L.) Danser against HepG2 Hepatocellular carcinoma. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16(1):420.
27. Ramírez V, Arango SS, Uribe D, et al. Effect of the Ethanolic Extract of *Passiflora edulis* F. *Flavicarpa* Leaves on Viability, Cytotoxicity and Apoptosis of Colon Cancer Cell Lines. *J. Chem Phram Res*. 2017;9:135–139.

Citation: Aguillón J, Arango SS, Uribe DF, et al. Cytotoxic and apoptotic activity of extracts from leaves and juice of *passiflora edulis*. *J Liver Res Disord Ther*.

28. Montoya Y, Orozco P, Arango S, et al. Evaluación de la actividad citotóxica del extracto acuoso del maracuyá (*Passiflora edulis*) sobre grupos de líneas celulares. *Pan Am Heal Care Exch.* 2013;463–467.
29. Kuete V, Dzotam JK, Voukeng IK, et al. Cytotoxicity of methanol extracts of *Annona muricata*, *Passiflora edulis* and nine other Cameroonian medicinal plants towards multi-factorial drug-resistant cancer cell lines. *Springerplus.* 2016;5(1):1666-1678.
30. Ramos NS. Efeito antitumoral dos extractos hidroalcoólico e supercrítico da semente de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener (*Passifloraceae*). Tesis de Maestría, Departamento de Post grado en Bioquímica, Universidad Federal de Santa Catarina; Brasília: Florianópolis; 2015.
31. Shen W, Chen C, Guan Y, et al. A pumpkin polysaccharide induces apoptosis by inhibiting the JAK2/STAT3 pathway in human hepatoma HepG2 cells. *Int J Biol Macromol.* 2017;104(Pt A):681–686.
32. Zeraik ML, Pereira CAM, Zuin VG, et al. Maracujá: Um alimento funcional?, *Brazilian J Pharmacogn.* 2010;20(3):459–471.
33. Sarkar S, Pandya P, Bhadra K. Sequence specific binding of beta carboline alkaloid harmalol with deoxyribonucleotides: Binding heterogeneity, conformational, thermodynamic and cytotoxic aspects. *PLoS One.* 2014;9(9):e108022.
34. Rowe CA, Nantz MP, Deniera C, et al. Percival, Inhibition of neoplastic transformation of benzo[*a*]pyrene-treated BALB/c 3T3 murine cells by a phytochemical extract of passionfruit juice. *J Med Food.* 2004;7(4):402–407.
35. Silva DC, Freitas ALP, Barros FCN, et al. Polysaccharide isolated from *Passiflora edulis*: Characterization and antitumor properties. *Carbohydr Polym.* 2012;87(1):139–145.

CAPITULO V

BIOACCESIBILIDAD Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS COMPONENTES DEL EXTRACTO DE HOJAS Y JUGO DE *Passiflora edulis*.

INTRODUCCIÓN

Este capítulo es el resultado del trabajo realizado durante la pasantía doctoral en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, México; bajo la tutoría de la Dra Rocío Campos Vega.

Durante la estancia de investigación se evaluó la digestión gastrointestinal *ex vivo* de los componentes fenólicos y oligosacáridos de los extractos etanólico de hojas de *Passiflora edulis*, y el extracto del zumo del fruto de esta planta. A través de este ensayo se logró evaluar la bioaccesibilidad de los componentes bioactivos de los extractos, así como su capacidad antioxidante. Como resultado de este trabajo se escribió el artículo titulado “**Impact of in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility and antioxidant capacity of bioactive compounds from Passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves and juice extracts.**” en la revista Journal of Food Biochemistry, publicado en mayo del 2019.

Es claro que el consumo de frutas ha sido relacionado con la reducción del riesgo de desarrollar enfermedades crónicas no trasmisibles tales como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (1). A pesar de que un alimento o un extracto, pueda poseer un alto contenido de compuestos bioactivos, las condiciones fisiológicas en el proceso digestivo podrían afectar considerablemente su bioaccesibilidad y su potencial benéfico para la salud, al momento de su consumo. El objetivo de esta investigación fue evaluar la bioaccesibilidad *in vitro* y la capacidad antioxidante de los componentes bioactivos tales como polifenoles, ácido ascórbico y oligosacáridos, de los extractos de hojas y zumo de *P. edulis*. Se evidenció que el extracto de hojas de *P. edulis* presenta una mayor variedad y cantidad de componentes fenólicos. Tanto los componentes del extracto etanólico como los del zumo presentaron una bioaccesibilidad considerable, siendo el ácido ascórbico y el kaempferol los que presentaron una mayor bioaccesibilidad, así mismo estos componentes mostraron la mayor permeabilidad. Por otra parte, compuestos como el ácido clorogénico, la xilosa y la quercetina

mostraron una alta correlación con la capacidad antioxidante, medida durante todas las etapas de la digestión gastrointestinal.

Los resultados de esta investigación indican que los extractos de hojas y jugo de *Passiflora edulis* poseen compuestos bioactivos con una capacidad antioxidante y de bioaccesibilidad considerable, lo que proporciona nuevos conocimientos sobre el potencial que posee esta planta para contribuir de forma benéfica a la salud humana, en la prevención y tratamiento de diferentes enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bondonno CP, Blekkenhorst LC, Liu AH, Bondonno NP, Ward NC, Croft KD, et al. Vegetable-derived bioactive nitrate and cardiovascular health. *Mol Aspects Med* . 2018;61:83–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.08.001>

FULL ARTICLE

Impact of in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility and antioxidant capacity of bioactive compounds from Passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves and juice extracts

Johanny Aguillón-Osma¹ | Iván Luzardo-Ocampo²  | Mardey Liceth Cuellar-Nuñez² |

María Elena Maldonado-Celis³ | Nelsy Loango-Chamorro^{1,4} | Rocio Campos-Vega² 

¹Grupo de Enfermedades Cardiovasculares y Metabólicas (GECAYME), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

²Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República (PROPAC), Research and Graduate Studies in Food Science, School of Chemistry, Universidad Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro, México.

³Escuela de Nutrición y Dietética, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

⁴Programa de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Tecnologías, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

Correspondence

Rocio Campos-Vega, Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República (PROPAC), Research and Graduate Studies in Food Science, School of Chemistry, Universidad Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro, México.
Email: chio_cve@yahoo.com.mx

Nelsy Loango-Chamorro, Grupo de Enfermedades Cardiovasculares y Metabólicas (GECAYME), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.
Email: neloango@uniquindio.edu.co

Funding information

Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Grant/Award Number: 278375, 384201 and FOMIX-QRO-279751

Abstract

The fruits consumption is highly associated with a lessening in the risk of the chronic noncommunicable diseases. Despite their content of bioactive compounds, physiological conditions might affect their bioaccessibility and biological potential. Hence, the purpose of this research was to evaluate the bioaccessibility and in vitro antioxidant capacity of bioactive compounds (polyphenols, ascorbic acid, and mono/oligosaccharides) from passion fruit (*Passiflora edulis*) juice and leaves extracts (PJE and PLE, respectively) during an in vitro gastrointestinal digestion. PLE exhibited the highest overall bioaccessibility of phenolics and mono/oligosaccharides. Ascorbic acid and kaempferol were the most bioaccessible (up to 12- and 13-fold, respectively) compounds and showed the highest net permeabilities ($0.32\text{--}34.65 \times 10^{-5}$). Chlorogenic acid, quercetin, and xylose showed the highest correlation with the antioxidant capacity (ABTS/DPPH methods). These results indicated the ability of digestion to improve bioaccessibility and antioxidant capacity of bioactives compounds from *P. edulis* extracts.

Practical applications

Several international organizations, World Health Organization (WHO) among them, are actively encouraging an increase in the fruit and vegetable intake worldwide in response to the global rise in noncommunicable diseases, among other actions. Fruits and processed foods are increasingly used in the European food industry. Additionally, exotic and tropical fruits cannot be produced in the European Union, which opens up a variety of opportunities for our Colombian tropical fruits such as mango or exotic fruits such as passion fruit. Evaluating parameters such as bioaccessibility and intestinal permeability of these bioactives derived from both *P. edulis* juice and leaves extracts contributes with new evidence regarding their stability along the gastrointestinal tract and their consumption as a source of health-promoting compounds. The results

Abbreviations: ABTS, 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); AE, aqueous extract; ARA, antiradical activity; DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; DEF, digested extract fraction; DPPP, diphenyl-1-pyrenylphosphine; FRAP, ferric reducing ability of plasma; NDEF, non-digested extract fraction; P_{app} , apparent permeability coefficient; PJE, *Passiflora edulis* juice extract; PLE, *Passiflora edulis* leaves extract; TEAC, trolox equivalent antioxidant capacity; USP, United States Pharmacopeia; WF, water flux.

of this research are an important achievement on the way to make the transition from basic to applied research. Informing the health benefits of this tropical fruit can stimulate its demand.

KEY WORDS

bioaccessibility, in vitro antioxidant capacity, in vitro gastrointestinal digestion, leaves extract, *Passiflora edulis*, passion fruit, phenolic compounds, oligosaccharides

1 | INTRODUCTION

Dietary intervention suggesting a high intake of fruits and vegetable of them have proven to be sources of several phytochemicals, such as polyphenols and carbohydrate derivatives, that can further produce several metabolites, end products with the ability to promote health benefits inducing significant metabolic changes (Gunathilake, Ranaweera, & Rupasinghe, 2018; Pan et al., 2015). Yet, it is still necessary to improve the fruit and vegetable supply system, as well as high quality of products that provide enough content of bioactive compounds (Aguilera, Martin-Cabrejas, & González de Mejia, 2016), thus consumers and providers are continuously demanding new fruit and vegetable products. Within this context, exotic fruits from South America are gaining popularity in the marketplace due to their nutritional value. Passion fruit (*Passiflora edulis*) is a South American quite consumed tropical fruit, with a promising content of bioactive compounds. Both the juice and leaves have been investigated considering their richness in antioxidant phytochemicals. Recently, da Silva et al. (2013) evaluated both in vitro and in vivo antioxidant potentials of an aqueous extract of *P. edulis* leaves, reporting a lower phenolic content than commercial samples of black and green tea, but a higher antioxidant capacity (ABTS: 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid/DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl/FRAP: Ferric reducing activity of plasma) that some passion fruit species. *Passion fruit* methanolic extracts have also shown anti-inflammatory effect via the inhibition of myeloperoxidase activity in equine neutrophils, effect partially associated with its flavonoids content (Zeraik et al., 2011).

Despite the beneficial effects attributed to bioactive compounds, those derived from total phenolics, oligosaccharides, and other bioactive compounds are not always equivalent to the total amount that is absorbed and exert a potential benefit. Since the different physiological conditions, such as pH and enzymes among others, significantly affect the bioaccessibility of food components (Campos-Vega et al., 2015), evaluating their biological significance through digestion might help to understand their biological significance within functional products (Rodríguez-Roque, Rojas-Graü, Elez-Martínez, & Martín-Belloso, 2013; Tenore, Campiglia, Ritieni, & Novellino, 2013). Our research group previously informed about the effect of an in vitro gastrointestinal digestion in the bioaccessibility of phenolic compounds and oligosaccharides as well the antioxidant capacity of berry juices (Agudelo, Luzardo-Ocampo, Campos-Vega, Loarca-Piña, & Maldonado-Celis, 2018) and *Moringa oleifera* leaves (Caicedo-Lopez et al., 2018). The results showed that monitoring bioactive compounds through digestion is essential for evaluating

their further biological effect as well as provide valuable information about the compounds' permeability and their potential interactions with the food matrix.

More recently, Gunathilake et al. (2018) reported the in vitro digestion of selected edible green leaves, including *P. edulis*, however, this intestinal digestion was conducted using an artificial system of dialysis tubing cellulose membrane which hardly mimics the in vivo approach that an ex vivo segment might give. Also, there were no reports of the apparent permeability coefficients, which are critical in the assessment of bioaccessibility parameters and further biological effects (Gunathilake et al., 2018; He et al., 2017). Taking into consideration all of this, the objective of this study was to evaluate the bioaccessibility and in vitro antioxidant capacity of bioactive compounds (ascorbic acid, polyphenols, and mono/oligosaccharides) from *P. edulis* juice and leaves extracts during an in vitro gastrointestinal digestion.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Chemicals and reagents

Acetic acid, acetonitrile, ethanol, pentobarbital sodium salt, HCl, NaCl, KCl, KH₂PO₄, NaHCO₃, glucose, CaCl₂, pepsin (≥ 2,500 units/mg protein), and pancreatin (8xUSP: United States Pharmacopeia), ox gall; (+)-catechin, quercetin, rutin, kaempferol, *p*-coumaric, ellagic, caffeic, chlorogenic, and ascorbic acids, ABTS, DPPH, xylose, mannose, arabinose, raffinose, stachyose, and verbasco were acquired either Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) or J. T. Baker Co. (Mexico City, Mexico). For the gastrointestinal digestion, 24 male Wistar rats (age: 6-8 weeks) were purchased in the "Instituto de Neurobiología" (UNAM Campus Juriquilla, Queretaro, Mexico). The procedures that involved both human or animals were approved by the Ethic Committee of the School of Chemistry from Universidad Autonoma de Queretaro (approval code: CBQ17/094), following the Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals provided by the National Institute of Health (NIH).

2.2 | Extracts preparation

Healthy *P. edulis* leaves and fruits (fruits with ripeness suitable for consumption) were collected between 6:00 and 8:00 a.m. from the

municipality of Caicedonia (Valle del Cauca, Colombia) (4.2424° N, 75.5649° W), 1,165 meters above the sea level. The plant specimens were identified in the Herbarium of Universidad del Quindío (collection number: 18,063). The ethanolic extraction and subsequently drying of both juice and leaves were conducted as previously reported (Aguillón-Osma, Maldonado, Loango-Chamorro, Arango-Varela, & Landázuri, 2013).

2.3 | Free phenolic compounds and ascorbic acid extraction and quantification

A high-performance liquid chromatography analysis coupled with a diode array detection (HPLC-DAD) was conducted in order to identify and quantify the free phenolic compounds. For this, an Agilent 1,100 HPLC System with a Zorbax Eclipse XDB-C18 column (4.6 × 250 mm, 5 μm) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was used. The compounds were extracted and identified using acidified water with acetic acid (0.1% v/v) and acetonitrile (100%) isocratically with the same reported gradients and conditions of Ramírez-Jiménez, Reynoso-Camacho, Mendoza-Díaz, and Loarca-Piña (2014). Due to previous phytochemicals screening performed in both extracts where flavonoids were found as the main contributors to the total polyphenolic content (Aguillón-Osma et al., 2013; Ramirez et al., 2019), commercial standards of phenolic compounds (hydroxybenzoic acids and flavonoids), and ascorbic acid were tested to build linear standard curves to quantify the free phenolics from the sample, which were expressed as micrograms equivalents of each compound per gram of sample.

2.4 | Antioxidant capacity (DPPH/ABTS)

For the in vitro antioxidant capacity of the samples, two radical scavenging methods were used: the modified procedure of Fukumoto and Mazza (2000) for DPPH inhibition and the ABTS inhibition assay (Nenadis, Wang, Tsimidou, & Zhang, 2004). The results of both assays were expressed in percentage of antiradical activity (% ARA) and the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) in μmol equivalents or Trolox per gram of the sample (μmol Trolox/g sample) following a Trolox standard curve.

2.5 | Oligosaccharides extraction and quantification

For the extraction of mono- and oligosaccharides, a thermal conditioning of the extracts was conducted using the reported procedure of Díaz-Batalla, Widholm, Fahey, Castaño-Tostado, and Paredes-López (2006). The conditioned extracts and the nonthermally conditioned digestion extracts were submitted to an HPLC analysis coupled to a refractive index detector (RID) using a Zorbax Carbohydrate Column (4.6 × 250 mm) (Agilent Technologies), thermostatically controlled (35 ± 0.6 °C) and using the same reported conditions of Muzquiz, Burbano, Pedrosa, Folkman, and Gulewicz (1999), following a isocratic HPLC sequence with 50:50 water:acetonitrile as mobile phase. Similar to the free phenolic

compounds, standard curves of selected mono (xylose, mannose, arabinose) and oligosaccharides (raffinose, stachyose and verbas-cose) were prepared for comparison and quantification purposes, aiming to express the quantity of this bioactives in micrograms equivalents of each one per gram of sample.

2.6 | In vitro gastrointestinal digestion

The simulation of the human physiological conditions followed the procedure described by Campos-Vega et al. (2015). Four subjects provided a written consent before their participation in the experiment. In summary, the extracts (100 mg of either juice or leaves) were homogenized with distilled water and human saliva, which was also used alone as blank. After a 4-min incubation at 37 °C in an oscillating bath for the simulation of the human chewing, the samples were acidified to pH 2, previously dissolved pepsin in HCl (20 mM) was added, and the samples were incubated during 2 hr at 37 °C using the same masticatory conditions for mimicking the gastric environment. For the intestinal conditions, the samples were placed in test tubes containing a pH-adjusted (7.0–7.4) mixture of ox gall and pancreatin (Campos-Vega et al., 2015). Everted gut sacs surgically removed from male Wistar rats and filled with Krebs-Ringer buffer were added to the test tubes in to assess intestinal permeation at four different times (15, 30, 60, and 120 min). All the procedures were conducted using anaerobic conditioned samples and reagents (CO₂). At each incubation time aliquots of samples from the inner side of the sac (digested extract fraction or DEF) and the outer side of the sacs (nondigested extract fraction or NDEF) were collected and stored at –80 °C for further HPLC quantification or antioxidant capacity evaluation.

2.7 | Bioaccessibility measurement

The bioaccessibility of free phenolic compounds, ascorbic acid and mono/oligosaccharides was measured in the collected samples using the equation: $B = [(C_0 - C_f) / C_f] * 100$ where B is the bioaccessibility value in percentage (%) of the selected bioactive compound, C_0 is the initial concentration of the compound at a specified incubation time period (15, 30, 60, or 120 min) and C_f the final concentration of the compound at the same time of incubation.

2.8 | Calculations of the apparent permeability coefficients

The apparent permeability coefficients (P_{app}) (10⁻⁵ cm/s) were calculated accordingly to the equation of Lassoued, Khemiss, and Sfar, (2011): $P_{app} = (dQ/dt)(1/A \times C_0)$, where P_{app} (cm/s) is the apparent permeability coefficient, dQ/dt (g/s) is the amount of bioactive compound transported across the membrane per unit time, A (cm²) is the cross surface area of the everted gut segment available for permeation and C_0 (mg/mL) is the initial concentration of the bioactive compound outside the everted gut sacs. The net apparent permeability coefficient (P_{appNet}) was calculated as the absolute subtraction

Among $P_{app A to B}$ and $P_{app B to A}$. The efflux ratio was computed as the ratio between $P_{app B to A}$ and $P_{app A to B}$.

2.9 | Water flux measurement

The water flux during the intestinal absorption was assessed using the reported equation of Khemiss et al. (2009): $WF = (W3 - W2) / W1$, considering WF as the water flux (in grams of water per gram of fresh intestine), $W3$ is the everted sac weight after a specific incubation time, $W2$ the everted sac weight before the same incubation time (filled with the Krebs-Ringer buffer) and $W1$ is the initial small intestine weight (with no buffer filling).

2.10 | Statistical analysis

Two independent experiments, with at least three replicates were considered for each measurement of each bioactive compound. The JMP v. 8.0 software (SAS Institute, Cary, NC) was used for performing a one-way analysis of variance (ANOVA) and post-hoc Tukey-Kramer Test for multiple comparisons where the differences were considered significant at $p < 0.05$. All the correlations among antioxidant capacity and the bioactives were assessed through Spearman's correlation method.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | Effect of the in vitro gastrointestinal digestion on ascorbic and phenolic acids

The bioaccessibility of phenolic compounds, and ascorbic acid is shown in Table 1. The *P. edulis* juice extract (PJE) had a lower concentration, and variety, of phenolic compounds than *P. edulis* leaves extract (PLE). Ascorbic acid, the most abundant compound identified in both samples and all gastrointestinal phases, was found within the interval previously informed for the fruit extract (10.92 $\mu\text{g/g}$) (Pertuzatti et al., 2015), while in PLE the content was twofold higher than in PJE. The ascorbic acid, a potent antioxidant compound, might be contributing to *P. edulis* antioxidant and antiproliferative activity, should be further studied (Aguillón-Osma et al., 2013).

The phenolic compounds content was significantly affected by the gastrointestinal digestion throughout the gut tract. Ascorbic acid and kaempferol from PJE were bioaccessible at all the evaluated stages (Table 1a). Salivary enzymes' activity in molecules such as starch and associated sugars, favors the oral release of ascorbic acid, thus its bioaccessibility (up to 9-fold) (Owczarek-Fendor et al., 2012). Although several phenolic acids and quercetin were not detected at the small intestine stages, the low content of chlorogenic acid in the juice of *P. edulis* detected at 120 min might indicate its metabolization into other compounds such as *o*-methylation, leading to the synthesis of phenolic acids such as ferulic acid from chlorogenic and caffeic acids (Lafay, Morand, Manach, Besson, & Scalbert, 2006). Furthermore, kaempferol increased its bioaccessibility at the stomach stage, which coincides with

the acid degradation of the typical food matrices at which phenolic compounds are naturally bounded, favoring their releasing (He et al., 2017).

Ascorbic acid (which among evaluated compounds exhibited the highest bioaccessibility), kaempferol, and quercetin were found at all the evaluated stages for PJE (Table 1b). These values are higher than those reported by Gunathilake et al. (2018), which found a decreasing of 75% in the total polyphenolic content of a digested *P. edulis* leave extract. The lack of biologic transporters in the cellulose dialysis membranes used in this study might explain the retention of several compounds. Recent studies have associated the low bioaccessibility of polyphenols with their interaction with dietary fiber, because it provides them a physical barrier against the acidic gastric conditions, but their strong associations with cell walls avoid its absorption at the small intestine stage. However, this allows their retention in the nondigestible fraction, exhibiting further beneficial effects for their potential fermentation by human gut microbiota and the production of diverse metabolites with implications in the human health (Domínguez-Avila et al., 2017).

3.2 | Apparent permeability coefficients (P_{app}) for free phenolic compounds and ascorbic acid from *Passiflora edulis* juice and leaves extracts

A major situation in natural drug research is that the biological activity of these compounds relies on a variety of factors, where permeability of the target bioactive compounds across the intestinal wall is a crucial factor describing the compound bioavailability and its biological activity (Ma et al., 2014). Table 2 shows the apparent permeability coefficients and efflux ratios from selected phenolic compounds from both juice (Table 2a) and leaves extracts (Table 2b). Considering the proposed values for low and high permeation of pure compound ($P_{app} < 5 \times 10^{-6}$ and $P_{app} > 14 \times 10^{-6}$, respectively) (Volpe et al., 2007), in this study the permeability coefficients from both samples were high (Table 2a and b), where a decrease in the P_{app} values is produced as long as the incubation time increase. In addition, a stabilization of the flow of the phenolic compounds in both intestinal sides was observed, explained in their increasing permeability and subsequent decreasing, a trend that have been observed for other food matrices subjected to the same in vitro digestion procedure (Agudelo et al., 2018; Luzardo-Ocampo et al., 2017).

The efflux ratio (ER) of compounds has been used as a predictive value for defining whether active or absorption mechanisms might occur ($ER < 0.5$ or $ER > 2.0$) (Hubatsch, Ragnarsson, & Artursson, 2007). Based on this range, kaempferol possibly crosses the intestinal barrier through passive transport, while ascorbic acid displayed an active transport mechanism. Despite the scarce literature about permeability coefficients for bioactive compounds from passion fruit, these values were lower than those reported for a digested berry juice following the same procedure (Agudelo et al., 2018), which might be explained for the processing methods and different interactions with the food matrix.

TABLE 1 Bioaccessibility of free phenolic compounds and ascorbic acid from (a) *Passiflora edulis* juice extract (PJE) and (b) *Passiflora edulis* leaves extract (PLE) submitted to in vitro gastrointestinal digestion

Sample/Stage	Ascorbic acid	Phenolicacids (µg/g)			Flavonoids (µg/g)	
		Gallic acid	Chlorogenic acid	Caffeic acid	Quercetin	Kaempferol
(a)						
PJE	10.92 ± 0.14 ^f (100)	nd	nd	nd	0.005 ± 0.001 ^c (100)	0.01 ± 0.001 ⁱ (100)
Mouth	96.55 ± 0.31 ^b (884.16)	6.64 ± 0.02 ^a	0.11 ± 0.001 ^b	4.80 ± 0.11 ^a	0.016 ± 0.004 ^b (320)	0.11 ± 0.006 ^b (1,100)
Stomach	130.60 ± 0.24 ^a (1,195.97)	nd	nd	nd	0.02 ± 0.002 ^a (400)	0.13 ± 0.002 ^a (1,300)
Small intestine (<i>nondigestible fraction</i>)						
15 min	11.26 ± 0.20 ^f (103.11)	1.26 ± 0.02 ^c	nd	0.48 ± 0.01 ^b	nd	0.02 ± 0.001 ^{fg} (200)
30 min	22.54 ± 0.61 ^{de} (206.4)	nd	nd	nd	nd	0.02 ± 0.003 ^f (200)
60 min	31.46 ± 8.24 ^d (288.09)	nd	nd	nd	nd	0.03 ± 0.004 ^d (300)
120 min	13.98 ± 2.73 ^{ef} (128.02)	nd	0.031 ± 1.46 ^b	nd	nd	0.04 ± 0.001 ^c (400)
Small intestine (<i>digestible fraction</i>)						
15 min	13.38 ± 3.19 ^{ef} (122.53)	2.62 ± 0.001 ^b	0.03 ± 0.002 ^b	nd	nd	0.016 ± 0.001 ^{gh} (160)
30 min	11.48 ± 0.16 ^{ef} (105.13)	nd	1.19 ± 0.05 ^a	nd	nd	0.013 ± 0.001 ^h (130)
60 min	25.45 ± 0.40 ^d (233.06)	0.31 ± 0.002 ^d	0.03 ± 0.01 ^b	nd	nd	0.026 ± 0.001 (260)
120 min	47.97 ± 1.39 ^c (439.28)	nd	nd	nd	nd	0.020 ± 0.001 ^f (200)
(b)						
PLE	20.96 ± 1.96 ^h (100)	nd	0.15 ± 0.003 ^d (100)	0.35 ± 0.003 ^b (100)	0.34 ± 0.01 ^b (100)	0.03 ± 0.003 ^{cd} (100)
Mouth	614.47 ± 9.88 ^a (2,931.63)	10.69 ± 0.74 ^a	0.11 ± 0.01 ^d (73.33)	3.86 ± 0.02 ^a (1,102.86)	0.50 ± 0.07 ^a (147.06)	0.06 ± 0.003 ^b (200)
Stomach	130.60 ± 0.24 ^e (623.09)	nd	nd	nd	0.02 ± 0.001 ^d (5.88)	0.13 ± 0.003 ^a (433.33)
Small Intestine (<i>Nondigestible fraction</i>)						
15 min	282.38 ± 1.39 ^b (1,347.23)	3.83 ± 0.005 ^b	nd	nd	0.22 ± 0.01 ^c (64.70)	0.020 ± 0.001 ^{fg} (66.67)
30 min	212.06 ± 1.25 ^d (1,011.74)	nd	nd	nd	0.19 ± 0.003 ^c (55.88)	0.024 ± 0.001 ^{de} (80)
60 min	238.88 ± 0.01 ^c (1,139.69)	nd	0.06 ± 0.002 ^d (40)	nd	0.23 ± 0.002 ^c (67.65)	0.03 ± 0.001 ^c (100)
120 min	232.32 ± 0.01 ^{cd} (1,108.40)	nd	0.16 ± 0.002 ^d (106.67)	nd	0.16 ± 0.002 ^c (47.06)	0.02 ± 0.002 ^{ef} (66.67)
Small Intestine (<i>Digestible fraction</i>)						
15 min	49.65 ± 1.57 ^{fg} (236.88)	nd	1.64 ± 0.01 ^c (1,093.33)	nd	0.011 ± 0.001 ^d (3.23)	0.013 ± 0.001 ^g (43.33)
30 min	31.72 ± 0.20 ^{gh} (151.33)	nd	1.77 ± 0.01 ^{bc}	nd	0.010 ± 0.001 ^d (2.94)	0.012 ± 0.001 ^g (40)
60 min	46.46 ± 2.31 ^g (221.66)	nd	2.22 ± 0.02 ^b (1,480)	nd	0.018 ± 0.001 ^d (5.29)	0.015 ± 0.001 ^{fg} (50)
120 min	69.99 ± 1.93 ^f (333.92)	nd	4.21 ± 0.34 ^a (2,806.67)	nd	0.07 ± 0.01 ^d (20.59)	0.02 ± 0.001 ^{de} (66.67)

Note. Data are the means ± SD of two independent experiments, by triplicate. The results are expressed as micrograms equivalents of each compound/g sample (dry basis matter). The numbers in parenthesis express bioaccessibility (%). nd: not detected. Different letters by columns express significant differences by Tukey—Kramer's Test ($p < 0.05$).

3.3 | Effect of the in vitro gastrointestinal digestion in the bioaccessibility of individual monosaccharides and oligosaccharides

Considering that a previous phytochemical screening of the *Passiflora edulis* juice extract showed a high presence of carbohydrates and glycosides (Aguillón-Osma et al., 2013), the quantification of monosaccharides and oligosaccharides was conducted for both the

nondigested and the samples subjected to in vitro gastrointestinal digestion. Table 3a and b show the bioaccessibility of monosaccharides/oligosaccharides from PJE and PLE, respectively. For the PJE, xylose (Table 3a) displayed a low bioaccessibility that significantly increased at the small intestine incubation, but subsequently decreased at the end of the digestion procedure. Stachyose was the most abundant oligosaccharide, while none of them were found in the intestinal stage, suggesting their potential to pass into the colon.

TABLE 2 Apparent permeability coefficients from selected free phenolic compounds from (a) *Passiflora edulis* juice and (b) *Passiflora edulis* leaves extract at intestinal incubation times

Compound	Time (min)	$P_{app A to B} (\times 10^{-5})$	$P_{app B to A} (\times 10^{-5})$	$P_{app net} (\times 10^{-5})$	Efflux ratio (B to A/A to B)
(a)					
Ascorbic acid	15	1.99 ± 0.47 ^a	1.67 ± 0.03 ^b	0.32 ± 0.17 ^c	0.84 ± 0.15 ^b
	30	0.85 ± 0.01 ^{bc}	2.35 ± 0.06 ^a	1.50 ± 0.05 ^a	2.77 ± 0.04 ^a
	60	0.95 ± 0.01 ^b	0.52 ± 0.11 ^c	0.43 ± 0.10 ^c	0.55 ± 0.11 ^c
	120	0.89 ± 0.03 ^{bc}	0.26 ± 0.05 ^d	0.63 ± 0.02 ^b	0.29 ± 0.34 ^c
Kaempferol	15	2.44 ± 0.01 ^a	2.79 ± 0.01 ^a	0.35 ± 0.01 ^b	1.14 ± 0.01 ^d
	30	1.04 ± 0.02 ^b	1.49 ± 0.03 ^b	0.45 ± 0.01 ^a	1.43 ± 0.04 ^b
	60	1.01 ± 0.01 ^b	1.25 ± 0.02 ^c	0.24 ± 0.01 ^c	1.24 ± 0.01 ^c
	120	0.38 ± 0.02 ^c	0.79 ± 0.01 ^d	0.41 ± 0.01 ^a	2.08 ± 0.08 ^a
(b)					
Ascorbic acid	15	7.39 ± 0.20 ^a	42.04 ± 0.21 ^a	34.65 ± 0.01 ^a	5.69 ± 0.12 ^b
	30	2.36 ± 0.01 ^b	15.78 ± 0.01 ^b	13.42 ± 0.01 ^b	6.69 ± 0.03 ^a
	60	1.73 ± 0.08 ^c	8.89 ± 0.49 ^c	7.16 ± 0.41 ^c	5.14 ± 0.04 ^b
	120	1.30 ± 0.03 ^c	4.32 ± 0.04 ^d	3.02 ± 0.01 ^d	3.32 ± 0.04 ^c
Quercetin	15	11.37 ± 0.02 ^a	0.11 ± 0.01 ^a	11.26 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.001 ^c
	30	4.92 ± 0.01 ^c	0.04 ± 0.001 ^b	4.88 ± 0.01 ^c	0.01 ± 0.01 ^a
	60	4.49 ± 0.13 ^c	0.02 ± 0.001 ^c	4.47 ± 0.12 ^c	0.004 ± 0.001 ^b
	120	8.31 ± 0.75 ^b	0.01 ± 0.001 ^c	8.30 ± 0.74 ^b	0.001 ± 0.0001 ^c
Kaempferol	15	2.02 ± 0.01 ^c	2.41 ± 0.06 ^a	0.39 ± 0.05 ^a	1.19 ± 0.03 ^a
	30	9.49 ± 0.01 ^a	1.78 ± 0.11 ^b	7.71 ± 0.10 ^b	0.19 ± 0.01 ^b
	60	5.64 ± 0.01 ^b	1.30 ± 0.09 ^c	4.34 ± 0.08 ^b	0.23 ± 0.02 ^c
	120	4.66 ± 0.01 ^b	0.39 ± 0.04 ^d	4.27 ± 0.03 ^c	0.08 ± 0.01 ^d

Note. The data are the means of two independent experiments, by triplicate. Different letters express significant differences by Tukey–Kramer's Test ($p < 0.05$) for each compound at the several incubation times (15–120 min). Apparent permeability coefficients ($P_{app A to B}$, $P_{app B to A}$ and $P_{app Net}$) are calculated in cm/s.

In the PLE (Table 3b), three monosaccharides and two oligosaccharides were quantified, and most of them could be quantified at the majority of the in vitro gastrointestinal digestion stages, suggesting a better stability and abundance of these compounds in comparison with the PJE (Table 3b). On the other hand, none of the observed oligosaccharides in the PLE extract before digestion was detected in the intestinal stage (Table 3b).

Oligosaccharides are a wide range of polysaccharide components known for their prebiotic properties via growth stimulation of selected gut microbiota bacterial species which confers several health benefits to the host (Singh, Banerjee, & Arora, 2015). In contrast, maintaining an adequate xylose:arabinose proportion is a key factor in the way they can act as selective gut bacteria growth stimulators for the general improvement of the gastrointestinal health (Singh et al., 2015). Taking into consideration, these properties and their marketable value, both *P. edulis* juice and leaves extract can be conceived as functional products with richness in oligosaccharides.

3.4 | Effect of in vitro gastrointestinal digestion in the antioxidant capacity

The ABTS and DPPH antioxidant capacity of PJE (Table 4a) showed a significant ($p < 0.05$) increase in mouth stage and it was reduced in the gastric and intestinal stages. For the PLE, the antioxidant capacity was higher in ABTS than DPPH. The antioxidant capacity measured by ABTS was reduced in the gastric and intestinal stages, with the lowest capacity at 15 min of incubation of the intestinal stage; however, no significant differences between the antioxidant capacity of the extract before digestion and the last two incubation periods of the intestinal digestion stage (Table 4a). These results are higher than those reported for the mouth, gastric and intestinal stages of an in vitro digestion of *P. edulis* leaves (82.5, 62.1 and 114.9 Trolox equivalent antioxidant capacity or TEAC, respectively) (Gunathilake et al., 2018). Compared to the non-digested extracts, PLE showed a significant higher antioxidant capacity during mouth, stomach and intestinal stages; except for the last incubation period

TABLE 3 Bioaccessibility of monosaccharides and oligosaccharides from (a) *Passiflora edulis* juice and (b) *Passiflora edulis* leaves extract, submitted to in vitro gastrointestinal digestion

Sample	Monosaccharides ($\mu\text{g/g}$)			Oligosaccharides ($\mu\text{g/g}$)		
	Xylose	Mannose	Arabinose	Raffinose	Stachyose	Verbasose
(a)						
PJE	105.81 \pm 7.04 ^c (100)	5,115.73 \pm 297.39 ^a (100)	nd	32.67 \pm 2.83 ^b (100)	78.26 \pm 1.49 ^b (100)	7.95 \pm 0.03 (100)
Mouth	33.48 \pm 1.72 ^d (31.92)	4,399.68 \pm 17.22 ^b (86.00)	nd	112.37 \pm 18.84 ^a (343.95)	54.79 \pm 6.55 ^b (70.01)	nd
Stomach	25.82 \pm 4.67 ^d (24.40)	3,202.50 \pm 48.28 ^c (62.60)	nd	18.96 \pm 0.98 ^c (58.03)	nd	nd
Small intestine (NDF)						
15 min	Nd	3,525.92 \pm 51.34 ^c (68.92)	nd	2.64 \pm 0.01 ^d (8.08)	173.82 \pm 0.01 ^a (222.11)	nd
30 min	Nd	438.60 \pm 0.73 ^d (8.57)	nd	nd	167.28 \pm 25.93 ^a (213.75)	nd
60 min	Nd	nd	nd	nd	149.03 \pm 2.13 ^a (190.43)	nd
120 min	Nd	nd	nd	nd	79.27 \pm 1.54 ^b (101.29)	nd
Small intestine (DF)						
15 min	4,067.78 \pm 4.55 ^a (3,844.42)	276.63 \pm 0.02 ^d (5.40)	194.93 \pm 0.29 ^d	nd	nd	nd
30 min	Nd	nd	220.16 \pm 5.78 ^c	nd	nd	nd
60 min	Nd	406.24 \pm 9.44 ^d (7.94)	364.30 \pm 5.10 ^a	nd	nd	nd
120 min	312.80 \pm 2.98 ^b (295.62)	550.62 \pm 2.85 ^d (10.76)	312.44 \pm 5.63 ^b	nd	nd	nd
(b)						
PLE	383.51 \pm 43.36 ^a (100)	514.32 \pm 98.50 ^{ab} (100)	970.56 \pm 4.66 ^a (100)	231.80 \pm 19.66 ^a (100)	nd	9.31 \pm 0.87 ^b (100)
Mouth	249.97 \pm 14.43 ^b (65.18)	81.29 \pm 0.96 ^c (15.80)	128.01 \pm 14.61 ^{cd} (13.19)	57.00 \pm 6.16 ^b (24.59)	51.82 \pm 0.49 ^a	27.35 \pm 0.78 ^a (293.77)
Stomach	57.28 \pm 4.39 ^d (14.93)	nd	nd	13.66 \pm 1.22 ^c (5.89)	20.58 \pm 1.22 ^{cd}	0.69 \pm 0.08 ^d (7.41)
Small intestine (<i>nondigestible fraction</i>)						
15 min	127.72 \pm 3.28 ^c (33.30)	652.30 \pm 3.86 ^a (126.83)	nd	nd	22.56 \pm 0.79 ^{bc}	2.40 \pm 0.21 ^c (25.78)
30 min	Nd	456.99 \pm 14.60 ^b (88.85)	nd	nd	19.29 \pm 0.05 ^d	3.84 \pm 0.01 ^c (32.86)
60 min	Nd	nd	275.50 \pm 3.72 ^{cd} (28.38)	40.63 \pm 0.05 ^{bc} (17.53)	23.61 \pm 0.96 ^b	nd
120 min	441.78 \pm 5.49 ^a (115.19)	nd	303.82 \pm 0.86 ^c (31.30)	nd	22.54 \pm 0.47 ^{bc}	3.06 \pm 0.13 ^c (32.87)
Small intestine (<i>digestible fraction</i>)						
15 min	29.53 \pm 2.38 ^d (7.70)	nd	nd	nd	nd	nd
30 min	23.70 \pm 5.88 ^d (6.18)	39.56 \pm 0.80 ^c (7.69)	54.32 \pm 3.76 ^{cd} (5.60)	nd	nd	nd
60 min	Nd	36.07 \pm 0.47 ^c (7.01)	94.34 \pm 0.05 ^{cd} (9.72)	nd	nd	nd
120 min	52.48 \pm 3.28 ^d (13.68)	30.41 \pm 2.89 ^c (5.91)	685.50 \pm 31.43 ^b (70.63)	nd	nd	nd

Note. Data are the means \pm SD of two independent experiments, by triplicate. The results are expressed as micrograms equivalents of each compound/g sample (dry basis matter). The numbers in parenthesis express bioaccessibility (%). WE: Whole extract; nd: No detected. Different letters by columns express significant differences by Tukey–Kramer's Test ($p < 0.05$).

TABLE 4 (a) Antioxidant capacity during in vitro gastrointestinal digestion of *P. edulis* juice and leaves extracts. (b) Correlation coefficients among selected bioactive compounds and the antioxidant capacity (ABTS/DPPH)

a)								
Sample/Stage	<i>Passiflora edulis</i> juice				<i>Passiflora edulis</i> leaves extract			
	ABTS		DPPH		ABTS		DPPH	
	ARA	TEAC	ARA	TEAC	ARA	TEAC	ARA	TEAC
AE	88.31 ± 5.55 ^{abcd}	810.75 ± 51.85 ^{abcd}	95.69 ± 0.16 ^{ab}	827.39 ± 1.34 ^{ab}	83.09 ± 5.55 ^a	761.87 ± 51.85 ^a	57.65 ± 2.21 ^e	520.12 ± 17.90 ^e
Mouth	96.64 ± 1.14 ^{ab}	888.55 ± 10.62 ^{ab}	97.01 ± 1.35 ^a	837.99 ± 10.89 ^a	80.32 ± 4.66 ^b	736.02 ± 43.54 ^a	76.05 ± 5.71 ^{cd}	668.67 ± 46.15 ^{cd}
Stomach	80.32 ± 2.17 ^{cd}	736.03 ± 20.29 ^{cd}	83.40 ± 4.92 ^{de}	728.11 ± 39.74 ^{de}	58.01 ± 0.72 ^{bcd}	527.54 ± 6.77 ^d	69.01 ± 0.37 ^d	611.85 ± 3.00 ^d
Small intestine (<i>nondigestible fraction</i>)								
15 min	39.89 ± 2.69 ^h	358.16 ± 25.13 ^h	89.41 ± 2.56 ^{bc}	776.59 ± 20.65 ^{bc}	68.65 ± 12.50 ^b	626.97 ± 116.79 ^{bcd}	32.47 ± 2.16 ^f	316.71 ± 17.47 ^f
30 min	55.50 ± 8.37 ^g	504.07 ± 78.26 ^g	49.46 ± 7.09 ^h	453.93 ± 57.27 ^h	64.20 ± 4.98 ^{bc}	585.33 ± 46.55 ^{cd}	60.39 ± 3.41 ^e	542.22 ± 27.55 ^e
60 min	67.26 ± 6.98 ^{ef}	613.92 ± 65.23 ^{ef}	85.26 ± 0.85 ^{cd}	743.11 ± 6.85 ^{cd}	78.54 ± 3.61 ^b	719.36 ± 33.71 ^{ab}	83.75 ± 7.34 ^{ab}	730.96 ± 59.30 ^{ab}
120 min	61.70 ± 4.86 ^{fg}	562.03 ± 45.43 ^{fg}	77.84 ± 1.93 ^e	683.16 ± 15.57 ^e	74.35 ± 3.70 ^b	680.25 ± 34.59 ^{abc}	79.23 ± 1.25 ^{bc}	694.46 ± 10.11 ^{bc}
Small intestine (<i>digestible fraction</i>)								
15 min	99.03 ± 2.08 ^a	910.89 ± 19.44 ^a	85.04 ± 1.41 ^{cd}	741.35 ± 11.40 ^{cd}	31.44 ± 3.75 ^d	279.22 ± 35.02 ^f	86.80 ± 0.70 ^a	755.52 ± 5.68 ^a
30 min	76.49 ± 2.87 ^{de}	700.24 ± 26.85 ^{de}	69.85 ± 2.33 ^f	618.61 ± 18.80 ^f	44.29 ± 2.79 ^{cd}	399.33 ± 26.10 ^e	86.67 ± 2.98 ^a	778.52 ± 24.06 ^a
60 min	78.11 ± 6.62 ^{cd}	715.36 ± 61.90 ^{cd}	61.27 ± 2.15 ^g	549.33 ± 17.40 ^g	73.90 ± 2.44 ^b	676.01 ± 22.78 ^{abc}	90.53 ± 2.96 ^a	785.69 ± 23.88 ^a
120 min	87.65 ± 4.63 ^{bc}	804.49 ± 43.29 ^{bc}	60.74 ± 3.76 ^g	545.06 ± 30.35 ^g	72.12 ± 1.73 ^b	659.37 ± 16.18 ^{abc}	58.56 ± 1.37 ^e	527.47 ± 11.09 ^e
b)								
	Compound	ABTS	DPPH					
	Ascorbic acid	0.309	-0.223					
Phenolic acids	Chlorogenic acid	0.556*	-0.001					
Flavonoids	(+)-catechin	-0.088	-0.486					
	Quercetin	0.812*	-0.468*					
	Kaempferol	0.459*	-0.346					
Monosaccharides	Xylose	0.001*	0.131					
	Mannose	0.418	0.091					
Oligosaccharides	Raffinose	0.207	0.320					
	Stachyose	0.005*	0.095					

Note. The results are the means ± SD of at two different experiments, by triplicate. AE: Aqueous extract; ARA: Antiradical activity; TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity/g sample. Different letters by columns express significant differences among the different in vitro gastrointestinal stages ($p < 0.05$) where the asterisks (*) indicate the significant correlations ($p < 0.05$) using Spearman's Test.

(120 min) of the intestinal digestion stage (Table 4a). This trend can be explained by the pH, as it can alter the polyphenols structure, affecting their antioxidant properties. It has been reported that the environmental-driven conditions from the gastric to intestinal stages might produce a deprotonation of the hydroxyl radicals located in the aromatic rings of phenolics, as well as their ionization, which increase the ability of these compounds to access to ABTS/DPPH radicals (Tagliazucchi, Verzelloni, Bertolini, & Conte, 2010). This might explain the significant antioxidant activity rising at the 120-min intestinal incubation for both juice and leaves extracts.

However, the low pH also allows a releasing of certain polyphenols. Interestingly, the PLE presented a higher antioxidant activity at the stomach and intestinal stage due to the higher polyphenol content and variety in comparison with the PJE. Furthermore, the digestible fraction of both extracts showed higher TEAC values, which agrees with synergisms between polyphenols and mono/oligosaccharides content, contributing to the enhancement the antioxidant capacity (He et al., 2017).

Assays based on the estimation of the antioxidant capacity of fruits, vegetables, leaves, stems, herbs, spices, and their products have been extensively applied for screening the antioxidant potential of several food matrices as well as their behavior into simulated in vitro systems (Schaich, Tian, & Xie, 2015). Since both DPPH and ABTS methods offer the ability of being simple assays routinely conducted in several research laboratories, their quantification provides insights about the performance of potential antioxidant compounds. Nevertheless, the lack of standardization of the procedures and the influence of a number of factors can easily influence the ability and speed of the compounds to scavenge radicals (Xie & Schaich, 2014). For this, new antioxidant capacity methods have also been proposed

to avoid background conditions that could significantly alter the assay. For instance, evaluating active reaction mechanisms using reaction rates comparisons or targeting more accurate molecules such as the scavenge of peroxy radicals through fluorescence intensity measurement of diphenyl-1-pyrenylphosphine (DPPP) oxide could provide a more biologically relevant oxidative response evaluation (Morita, Naito, Yoshikawa, & Niki, 2017; Xie & Schaich, 2014).

In order to link the observed antioxidant capacity with the targeted free phenolic compounds of the extracts subjected to in vitro digestion, a Spearman's correlation analysis was performed as shown in Table 4b. Chlorogenic acid and kaempferol were significantly ($p < 0.05$) correlated with the ABTS assay, whereas quercetin significantly correlated with both tests. Negative correlation have been also found in *Moringa oleifera* leaves, suggesting a different antioxidant capacity for these compounds respecting a specific method of radical inhibition, either transferring electrons or hydrogen atoms to the radical, contributing with their neutralization (Caicedo-Lopez et al., 2018; Re et al., 1999).

3.5 | Water Flux measurements during intestinal incubation from in vitro gastrointestinal digestion of *P. edulis* juice and leaves extracts

Since intestinal wettability and model viability are involved with the water flux, corresponding measurement was performed for the salivary solution (blank), a glucose control and both *P. edulis* extracts (Figure 1). The observed rising values between 30 and 60 min of intestinal incubation can be linked with an intestinal absorption capacity rising, showing a uniform tendency between 60 and 120 min. Luzardo-Ocampo et al. (2017), for an in vitro gastrointestinal digestion

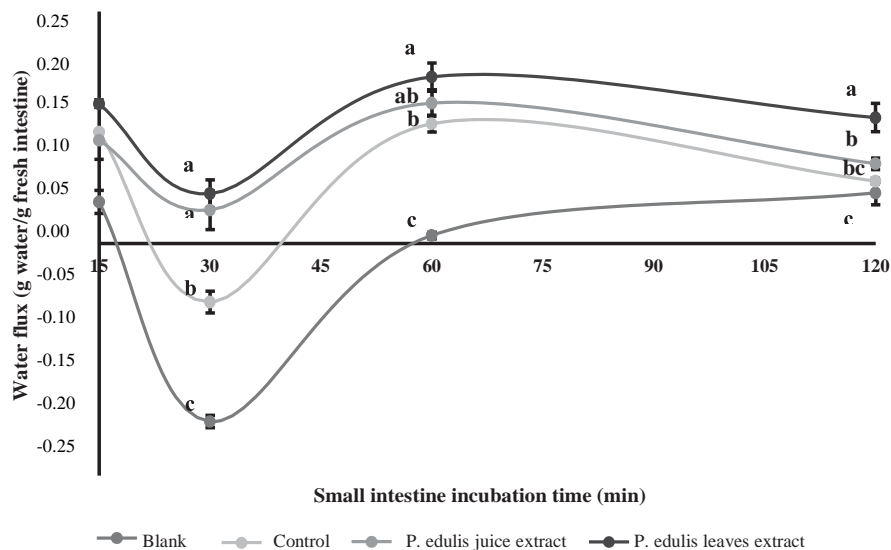


FIGURE 1 Water flux of samples during small intestine incubation

Note. The data are the means \pm SD of at two independent experiments, by triplicate. The results are expressed as gram of water per gram of fresh intestine. Different letters express significant differences ($p < 0.05$) at each time by Tukey–Kramer's test. The blank is equivalent to salivary fluid during the in vitro gastrointestinal digestion of both *Passiflora edulis* juice and leaves extracts. The control is equivalent to 4 g of D-glucose submitted to in vitro gastrointestinal digestion.

of corn-bean snacks, showed a stabilization of the water flux (60–120 min of incubation) possibly due to a saturation the systems, reflecting the way that bioactive compounds tend toward an equilibrium. Despite the heterogeneity of the intestinal tract, a similar behavior can be inferred in the water flux. For instance, Khemiss, Saidane, and Moshtaghie (2005) reported that the diverse distribution of water transporters and proteic channels along the intestinal epithelium might explain the observed changes, contributing to the equilibrium of fluid movement along the gastrointestinal tract and influencing the loss of water and electrolytes from basolateral to apical side, translating it to mucosal secretion. In this regard, at 30 min there was a pronounced water loss at all samples, with the glucose control at a medium level between the samples and blank.

4 | CONCLUSION

In summary, we show evidence that the *in vitro* gastrointestinal digestion of both juice and leaves extracts significantly influenced the bioaccessibility of bioactive compounds such as phenolics and mono/oligosaccharides, increasing their release along the gastrointestinal digestion. This behavior is linked an improved *in vitro* antioxidant capacity along the gastrointestinal tract, and the variation of the apparent permeability coefficients, reflecting the ability of compounds to cross the intestinal wall. Oligosaccharides from both extracts were not bioaccessible at the intestinal stage, suggesting their potential to reach the colon for being fermented by gut microbiota and exhibit further health benefits. The results confirm that *P. edulis* juice and leaves extracts are source of bioaccessible compounds with antioxidant properties derived from its composition and performance during digestion. Further *in vitro* and *in vivo* studies should be conducted in order to support these properties, as well as a deepen identification and characterization of another bioactives with potential health implications.

ACKNOWLEDGEMENTS

Johanny Aguillón-Osma was supported by scholarship from the COLCIENCIAS-Colombia. Authors Ivan Luzardo-Ocampo and M. Liceth Cuellar-Núñez were supported by a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-Mexico) [grant numbers 384201 and 278375, respectively]. The authors appreciate the funding provided by both Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) and CONACYT-Fondos Mixtos (FOMIX-QRO-279751).

CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared that they have no competing interests.

ORCID

Iván Luzardo-Ocampo  <https://orcid.org/0000-0002-8033-3520>

Rocio Campos-Vega  <https://orcid.org/0000-0003-4054-1250>

REFERENCES

- Agudelo, C. D., Luzardo-Ocampo, I., Campos-Vega, R., Loarca-Piña, G., & Maldonado-Celis, M. E. (2018). Bioaccessibility during *in vitro* digestion and antiproliferative effect of bioactive compounds from Andean Berry (*Vaccinium meridionale* Swartz) Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(28), 7358–7366. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01604>
- Aguilera, Y., Martín-Cabrejas, M. A., & González de Mejía, E. (2016). Phenolic compounds in fruits and beverages consumed as part of the mediterranean diet: Their role in prevention of chronic diseases. *Phytochemistry Reviews*, *15*(3), 405–423. <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9443-z>
- Aguillón-Osma, J., Maldonado, M. E., Loango-Chamorro, N., Arango-Varela, S. S., & Landázuri, P. (2013). Antioxidant and antiproliferative activity of ethanolic and aqueous extracts from leaves and fruits juice *Passiflora edulis*. *Perspectivas En Nutrición Humana*, *15*(1), 13–25.
- Caicedo-Lopez, L. H., Luzardo-Ocampo, I., Cuellar-Núñez, M. L., Campos-Vega, R., Mendoza, S., & Loarca-Piña, G. (2018). Effect of the *in vitro* gastrointestinal digestion on free-phenolic compounds and mono/oligosaccharides from *Moringa oleifera* leaves: Bioaccessibility, intestinal permeability and antioxidant capacity. *Food Research International*, (In Press). 10.1016/j.foodres.2018.11.017
- Campos-Vega, R., Vázquez-Sánchez, K., López-Barrera, D., Loarca-Piña, G., Mendoza-Díaz, S., & Oomah, B. D. (2015). Simulated gastrointestinal digestion and *in vitro* colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): Bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Research International*, *77*(2), 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.024>
- da Silva, J. K., Cazarin, C. B. B., Colomeu, T. C., Batista, Â. G., Meletti, L. M. M., Paschoal, J. A. R., ... de Lima Zollner, R. (2013). Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: *In vitro* and *in vivo* study. *Food Research International*, *53*(2), 882–890. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.043>
- Díaz-Batalla, L., Widholm, J. M., Fahey, G. C., Castaño-Tostado, E., & Paredes-López, O. (2006). Chemical compositions with health implications in wild and cultivated Mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(6), 2045–2052. <https://doi.org/10.1021/jf051706l>
- Domínguez-Avila, J. A., Wall-Medrano, A., Velderrain-Rodríguez, G. R., Chen, C.-Y. O., Salazar-López, N. J., Robles-Sánchez, M., & González-Aguilar, G. A. (2017). Gastrointestinal interactions, absorption, splanchnic metabolism and pharmacokinetics of orally ingested phenolic compounds. *Food & Function*, *8*(1), 15–38. <https://doi.org/10.1039/C6FO01475E>
- Fukumoto, L. R., & Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, *48*(8), 3597–3604. <https://doi.org/10.1021/jf000220w>
- Gunathilake, K. D. P. P., Ranaweera, K. K. D. S., & Rupasinghe, H. P. V. (2018). Change of phenolics, carotenoids, and antioxidant capacity following simulated gastrointestinal digestion and dialysis of selected edible green leaves. *Food Chemistry*, *245*, 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.096>
- He, M., Zeng, J., Zhai, L., Liu, Y., Wu, H., Zhang, R., ... Xia, E. (2017). Effect of *in vitro* simulated gastrointestinal digestion on polyphenol and polysaccharide content and their biological activities among 22 fruit juices. *Food Research International*, *102*, 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.001>
- Hubatsch, I., Ragnarsson, E. G. E., & Artursson, P. (2007). Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols*, *2*(9), 2111–2119. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.303>
- Khemiss, F., Ahmadi, S., Massoudi, R., Ghoul-Mazgar, S., Safta, S., Moshtaghie, A. A., & Saïdane, D. (2009). Effect of *in vitro* exposure

- to *Vibrio vulnificus* on hydroelectrolytic transport and structural changes of sea bream (*Sparus aurata* L.) intestine. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(3), 541–549. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9265-7>
- Khemiss, F., Saidane, D., & Moshtagie, A. A. (2005). Effect of aqueous extract of *Prasium majuss* L. leaves on water and electrolytes transport in rat intestine. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8(10), 1424–1429. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2005.1424.1429>
- Lafay, S., Morand, C., Manach, C., Besson, C., & Scalbert, A. (2006). Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. *British Journal of Nutrition*, 96(1), 39–46. <https://doi.org/10.1079/BJN20051714>
- Lassoued, M. A., Khemiss, F., & Sfar, S. (2011). Comparative study of two *in vitro* methods for assessing drug absorption: Sartorius SM 16750 apparatus versus everted gut sac. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 14(1), 117–127.
- Luzardo-Ocampo, I., Campos-Vega, R., Gaytán-Martínez, M., Preciado-Ortiz, R., Mendoza, S., & Loarca-Piña, G. (2017). Bioaccessibility and antioxidant activity of free phenolic compounds and oligosaccharides from corn (*Zea mays* L.) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) chips during *in vitro* gastrointestinal digestion and simulated colonic fermentation. *Food Research International*, 100(Pt 1), 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.018>
- Ma, B., Wang, J., Sun, J., Li, M., Xu, H., Sun, G., & Sun, X. (2014). Permeability of rhynchophylline across human intestinal cell *in vitro*. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(5), 1957–1966. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24966905>
- Morita, M., Naito, Y., Yoshikawa, T., & Niki, E. (2017). Antioxidant capacity of blueberry extracts: Peroxyl radical scavenging and inhibition of plasma lipid oxidation induced by multiple oxidants. *Journal of Berry Research*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.3233/JBR-170152>
- Muzquiz, M., Burbano, C., Pedrosa, M. M., Folkman, W., & Gulewicz, K. (1999). Lupins as a potential source of raffinose family oligosaccharides: Preparative method for their isolation and purification. *Industrial Crops and Products*, 9(3), 183–188. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(98\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(98)00030-2)
- Nenadis, N., Wang, L. F., Tsimidou, M., & Zhang, H. Y. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS • + assay. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4669–4674.
- Owczarek-Fendor, A., De Meulenaer, B., Scholl, G., Adams, A., Van Lancker, F., Eppe, G., ... De Kimpe, N. (2012). Furan formation in starch-based model systems containing carbohydrates in combination with proteins, ascorbic acid and lipids. *Food Chemistry*, 133(3), 816–821. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.098>
- Pan, P., Skaer, C. W., Stirdivant, S. M., Young, M. R., Stoner, G. D., Lechner, J. F., ... Wang, L.-S. (2015). Beneficial regulation of metabolic profiles by black raspberries in human colorectal cancer patients. *Cancer Prevention Research*, 8(8), 743–750. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-15-0065>
- Pertuzatti, P. B., Sganzerla, M., Jacques, A. C., Barcia, M. T., & Zambiazzi, R. C. (2015). Carotenoids, tocopherols and ascorbic acid content in yellow passion fruit (*Passiflora edulis*) grown under different cultivation systems. *LWT-Food Science and Technology*, 64(1), 259–263.
- Ramírez-Jiménez, A. K., Reynoso-Camacho, R., Mendoza-Díaz, S., & Loarca-Piña, G. (2014). Functional and technological potential of dehydrated *Phaseolus vulgaris* L. flours. *Food Chemistry*, 161, 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.008>
- Ramírez, V., Arango, S. S., Maldonado, M. E., Uribe, D., Aguillon, J., & Quintero, J. P. (2019). Biological activity of *Passiflora edulis* f. *Flavicarpa* ethanolic leaves extract on human colonic adenocarcinoma cells. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9(2), 64–71. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2019.90209>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2013). Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 136(1), 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.115>
- Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015). Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”. *Journal of Functional Foods*, 18(1), 782–796. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.024>
- Singh, R. D., Banerjee, J., & Arora, A. (2015). Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5(1), 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.11.003>
- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120(2), 599–606. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.030>
- Tenore, G. C., Campiglia, P., Ritieni, A., & Novellino, E. (2013). *In vitro* bioaccessibility, bioavailability and plasma protein interaction of polyphenols from Annurca apple (*M. pumila* Miller cv Annurca). *Food Chemistry*, 141(4), 3519–3524. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.051>
- Volpe, D. A., Faustino, P. J., Ciavarella, A. B., Asafu-Adjaye, E. B., Ellison, C. D., Yu, L. X., & Hussain, A. S. (2007). Classification of drug permeability with a Caco-2 cell monolayer assay. *Clinical Research and Regulatory Affairs*, 24(1), 39–47. <https://doi.org/10.1080/10601330701273669>
- Xie, J., & Schaich, K. M. (2014). Re-evaluation of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(19), 4251–4260. <https://doi.org/10.1021/jf500180u>
- Zeraik, M. L., Serteyn, D., Deby-Dupont, G., Wauters, J. N., Tits, M., Yariwake, J. H., ... Franck, T. (2011). Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit (*Passiflora edulis* and *Passiflora alata*) extracts on stimulated neutrophils and myeloperoxidase activity assays. *Food Chemistry*, 128(2), 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.001>

How to cite this article: Aguillón-Osma J, Luzardo-Ocampo I, Cuellar-Núñez ML, Maldonado-Celis ME, Loango-Chamorro N, Campos-Vega R. Impact of *in vitro* gastrointestinal digestion on the bioaccessibility and antioxidant capacity of bioactive compounds from Passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves and juice extracts. *J Food Biochem*. 2019;e12879. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12879>

CAPITULO VI

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS DE *Passiflora edulis* SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA α - GLUCOSIDASA

INTRODUCCIÓN

La diabetes es actualmente una de las principales causas de muerte a nivel global y se considera que su morbilidad posiblemente alcance el 10,4% en la población mundial para el año 2040 (1). La diabetes mellitus (DM) tipo II, es la condición más común, afectando cerca del 90% de las personas diagnosticadas con diabetes; convirtiéndose en un importante problema de salud pública en los países en vía de desarrollo, en los cuales los hábitos alimenticios están cambiando del consumo de alimentos tradicionales a alimentos procesados ricos en calorías; sumado al creciente sedentarismo y al aumento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad (2).

La diabetes mellitus pertenece a un grupo de trastornos metabólicos, caracterizados por los altos niveles de glucosa en sangre, debido a defectos en la secreción o acción de la insulina, causada por una alteración en la función endocrina del páncreas o por alteración en los tejidos efectores que pierden la sensibilidad a la insulina. Las células del páncreas son las responsables de la producción de insulina en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, en las personas que presentan DM tipo II, se presenta una insuficiencia de las células β del páncreas para secretar una cantidad suficiente de insulina, lo que conduce a una elevación de la glucosa en sangre después de ingerir un alimento (3).

La principal estrategia para el control de la diabetes implica un cambio en el estilo de vida, que incluye como primera medida, la reducción del consumo de azúcares, aunque es realmente difícil controlar la presencia de azúcares en los productos alimenticios comunes en el mercado, por ello se recomienda el control de porciones y la búsqueda de alimentos saludables; así mismo, se recomienda un aumento paulatino de la actividad física (4), sea cual sea la estrategia, se tiene claro la importancia de mantener regulados los niveles de glucosa postprandial, debido a que su aumento excesivo aumenta el riesgo de enfermedad cardiovascular, debido a su asociación con la aterosclerosis y la dislipidemia; puesto que, por una parte, cada vez que se producen estos picos glicémicos, se aumenta el estrés oxidativo y un daño sobre la función endotelial con los consecuentes procesos inflamatorios, situaciones que sumadas, conducen al desarrollo de aterosclerosis (5). Por otro lado, la alta disponibilidad de azúcares, permiten el incremento de la síntesis de colesterol y triglicéridos a nivel hepático, generando

dislipidemia (6) y hígado graso no alcohólico o esteatosis hepática (7). Sin embargo, la estrategia más aplicada y de mayor manejo para controlar la diabetes, es la administración de medicamentos que tengan la capacidad de reducir la glucemia. Dichos fármacos están diseñados para regular los diferentes mecanismos fisiopatológicos asociados al desarrollo de la DM, entre los que se incluyen: disminución en la producción y secreción de insulina por parte de las células β del páncreas, disfunciones en la neurotransmisión y resistencia a la insulina (IR) en el cerebro, síntesis de glucosa aumentada en el hígado, degradación aumentada de lípidos, aumento de la reabsorción de glucosa en el riñón, reducción de la captación de glucosa en tejidos periféricos como tejido adiposo y esquelético, y efecto disminuido de la incretina en intestino delgado (8).

Un tratamiento farmacológico adecuado es crucial para prevenir o retrasar la aparición o progresión de las complicaciones diabéticas. Los factores a ser considerados incluyen: eficacia del tratamiento, costos, posibles efectos secundarios, aumento de peso, comorbilidades, riesgo de hipoglucemia y preferencias del paciente, entre otros; lo que si se tiene claro es que con el inicio del tratamiento farmacológico debe iniciarse simultáneamente y con bastante rigor, el cambio del estilo de vida (9). Entre de los principales tipos de medicamentos antidiabéticos orales se encuentran los inhibidores de la enzima α -glucosidasa. La enzima α -glucosidasa (α -D- glucósido glucohidrolasa; EC 3.2.1.20), se encuentra en la membrana celular y distribuida principalmente en el epitelio del intestino delgado, esta enzima se encuentra estrechamente relacionada con el metabolismo de los carbohidratos, regulando los niveles de glucosa en el plasma del cuerpo, y proporcionando fuentes de energía para mantener un funcionamiento saludable (10). Su función es catalizar la hidrólisis de maltosa y otros disacáridos para liberar moléculas de glucosa libres; actualmente esto se ha considerado como el factor principal relacionado con la hiperglucemia posprandial, una característica clave de la diabetes mellitus (11). En la actualidad, la enzima α -glucosidasa se presenta como una proteína diana potencial para el tratamiento clínico de diabetes tipo 2, debido a que la inhibición de esta enzima juega un papel esencial papel en el control de la enfermedad al retrasar la digestión de la absorción de carbohidratos y monosacáridos de la dieta después de una comida, lo que contribuye a mantener la glucosa en sangre posprandial en niveles normales (12).

Es importante señalar que las personas diabéticas a menudo presentan dislipidemia, caracterizada por niveles elevados de triglicéridos y LDL-C (colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad), así como bajos niveles de HDL-C (colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad), en donde, ya es claro que, estos cambios en los niveles lipídicos no solo se deban a la diabetes, sino que involucran alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Por lo tanto, un buen control de la glucosa mejora la dislipidemia, debido a que se reduce la disponibilidad de fuentes energéticas que puedan ser

aprovechadas para la síntesis y acumulación de lípidos (13). Debido a la estrecha relación de estos procesos metabólicos, las enzimas involucradas son consideradas como puntos clave en la investigación, para el control de diferentes enfermedades metabólicas; en este orden de ideas, en cuanto a la estrategia de inhibición de la α -glucosidasa, se busca que dichos inhibidores no causen eventos de hipoglucemia u otros efectos secundarios gastrointestinales, e incluso que no se produzca un aumento de peso (14). Entre los inhibidores farmacológicos de la enzima α -glucosidasa más utilizados, podemos mencionar: acarbosa, miglitol y voglibosa, los cuales son de alto costo y generalmente presentan algunos efectos adversos como toxicidad hepática, problemas gastrointestinales, hinchazón, náuseas, diarreas, entre otros, además de crear una dependencia por parte de los pacientes que consumen dichos medicamentos (15).

Alternativamente, las plantas se han utilizado en la medicina tradicional durante más de 4000 años; actualmente se ha ampliado el conocimiento sobre las plantas medicinales y sus mecanismos de acción, comprobando la gran importancia de estas en el cuidado de la salud, debido a su efectividad y reducidos efectos secundarios, en comparación a los medicamentos de síntesis química (16). Las plantas medicinales aportan al organismo diferentes principios bioactivos tales como polifenoles, flavonoides, alcaloides, glucósidos, entre otros, los cuales normalmente se absorben fácilmente; y en la mayoría de los casos su efecto se debe a la acción sinérgica de diferentes sustancias que se equilibran y potencian entre sí, favoreciendo a diferentes órganos o sistemas del cuerpo o al mejoramiento de algún proceso en específico del organismo, resultando en tratamientos lentos, pero duraderos para el control de enfermedades metabólicas (17).

En este orden de ideas, varios componentes bioactivos entre los que se destacan los polifenoles, polisacáridos y terpenoides han presentado una actividad inhibitoria significativa, incluso en ocasiones superiores a lo observado con Acarbosa (18). Tal es el caso de los extractos de varias plantas como jengibre (19), café (20), cúrcuma (21), mago (22) entre otros. En particular, las plantas del género *Passiflora*, han mostrado poseer componentes bioactivos con la capacidad de inhibir la actividad de la enzima α -glucosidasa, como lo señala Paulraj *et al*, en el 2014 (23), quienes reportan que tanto en el extracto de semillas como en el extracto de raíces de *Passiflora foetida* presenta una actividad inhibitoria de la enzima superior al 65%. También en los extractos polares de los frutos de *Passiflora ligularis* se observa una inhibición del 75% de la actividad de la enzima α -glucosidasa (24) y los extractos de hojas de *Passiflora nítida*, que logra una inhibición del 50% de la actividad enzimática a una concentración nueve veces menor a la concentración de la Acarbosa (25). En base a esto, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de los extractos de hojas y jugo de *Passiflora edulis* sobre la actividad enzimática de la α -glucosidasa, en un ensayo in vitro.

METODOLOGÍA

Obtención del material vegetal

Las hojas y los frutos de *P. edulis*, se recolectaron en el corregimiento Tierra Blanca (Roldanillo, Valle del Cauca, Colombia), ubicada en las coordenadas geográficas globales 4° 24'0" N, 75.8489° a 939 msnm (Figura 1). Este material vegetal, se recolectó entre las 6:00 am y 8:00 am, verificándose que tanto las hojas como los frutos estuvieran completamente sanos; es decir, que por observación visual directa no se evidenciara lesiones sobre los tejidos causada por plagas, enfermedades o el ambiente. El fruto debía presentar madurez para el consumo humano, la cual fue determinada por su coloración amarilla y su cascará dura.

Las muestras vegetales una vez adquiridas, fueron transportadas en bolsas de cierre hermético al Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Quindío para su procesamiento, donde se procedió a realizar el lavado del material y la obtención de los extractos.

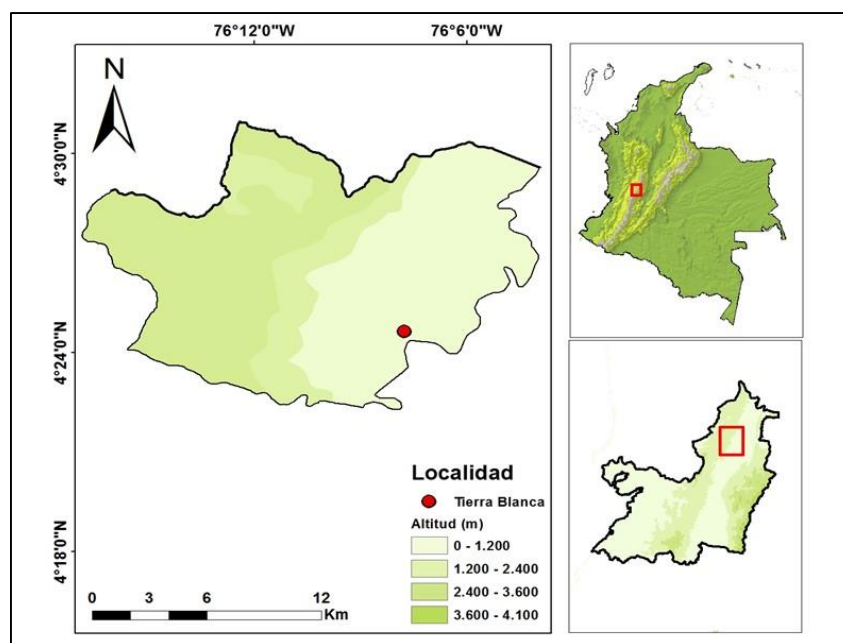


Figura 1. Mapa con coordenadas geográficas globales y georreferencia del corregimiento Tierra Blanca (Roldanillo, Valle del Cauca, Colombia).

Preparación del extracto etanólico de hojas de *Passiflora edulis*

Las hojas de *P. edulis*, fueron inicialmente lavadas con agua de grifo y luego con agua destilada para eliminar suciedades. El material vegetal se desecó en un horno de aire circulante a una temperatura constante de 40°C. Una vez seco, fue pulverizado utilizando un molino eléctrico y se lixivió durante

8 días usando 500 ml de etanol al 96% (el lixiviado fue recirculado constantemente). Luego, se procedió a separar la clorofila del extracto etanólico mediante una extracción líquido-líquido con etanol-agua (1:1) (26) y se filtró con papel filtro con tamaño de poro de 11 μm . El etanol fue evaporado a presión reducida (60 mbar) y a temperatura inferior de 30 °C en un rotaevaporador (Heidolph®). La suspensión resultante aún líquida, se sometió a liofilización (Telstar LyoQuest). El extracto etanólico (EEH) de hojas de *P. edulis*, se almacenó protegido de la luz a -20°C hasta su uso.

Preparación del jugo del fruto de *Passiflora edulis*

El fruto maduro de *Passiflora edulis* fue inicialmente lavado con agua de grifo y posteriormente con agua destilada. El jugo fue extraído por métodos mecánicos, colado para eliminar semillas y filtrado (poro de 1mm) para garantizar su homogeneidad. Posteriormente se evaporó para concentrarlo y la suspensión resultante aún líquida, se sometió a liofilización (Telstar LyoQuest). El extracto de jugo (EJ) del fruto de *P. edulis*, se almacenó protegido de la luz a -20°C hasta su uso.

Previamente a la realización de cada ensayo, los extractos se disolvieron en agua destilada, a una concentración de 1 mg/mL, para realizar las diferentes pruebas de caracterización bioquímica

Análisis fitoquímico de los extractos de *P. edulis*

Determinación del contenido fenólico total

El contenido fenólico total de los diferentes extractos fue determinado usando el método del reactivo de Folin-Ciocalteu (27). Brevemente, en un tubo de ensayo se adicionó 50 μL de cada extracto a 1 mg/mL, luego se adicionó 2,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (dilución 1/10 en agua destilada) y 2 mL de Na_2CO_3 al 7,5 % (p/v), se mezcló bien y se incubó a 40 °C durante 15 minutos. La absorbancia de las muestras fue medida por espectrofotometría a 765 nm usando solución de Na_2CO_3 (2 mL de Na_2CO_3 al 2 % en 2,55 mL de agua destilada) como blanco. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg EAG), de acuerdo a una curva de calibración usando el ácido gálico como compuesto fenólico estándar del ensayo.

Determinación de contenido sacárido total

Se usó el método fenol – ácido sulfúrico para medir el contenido polisacárido total (28). Los extractos fueron diluidos en los respectivos solventes y luego serán filtrados en papel filtro de poro 0,22 μm , previo al tratamiento. Brevemente, 100 μL del extracto, 100 μL de fenol (5 %) y 500 μL de H_2SO_4 (95 %) fueron mezclados y luego se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. La absorbancia fue medida a 490 nm. Diferentes concentraciones de glucosa (0, 10, 30, 50, 70 y 90

$\mu\text{g/ml}$) fueron usadas como estándar. Los datos fueron expresados como mg equivalentes de glucosa por gramo de extracto (mg EG).

Determinación de Contenido Flavonoide Total

Para este ensayo se utilizó una alícuota (150 μL) de cada extracto en tubos eppendorf y se agregó 45 μL de nitrato sódico (NaNO_3) al 5 %. En el minuto quinto y sexto respectivamente, se agregó 90 μL de cloruro de aluminio (AlCl_3) al 10 % y 300 μL de hidróxido de sodio (NaOH) 1 M. El volumen final de la mezcla se aforó con agua destilada hasta completar 1,5 mL. Finalmente se dejó reposar la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 510 nm. Se usó la catequina para trazar la curva de calibración. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de catequina por gramo de extracto seco (mg EC) (29).

Determinación de Contenido Total de Taninos

Se tomó una alícuota de 250 μL de extracto (1 mg/mL) y se adicionó 500 μL de solución de albumina de suero bovino en tampón acético 0,2 M con pH 5.0 (se ajustó el pH con NaCl al 0,17 M), se mezcló cuidadosamente y se dejó reposar por 15 minutos. Luego se centrifugó a 5000 g por 15 minutos. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y el precipitado fue diluido con 1 mL de solución acuosa que contenía dodecilsulfato sódico (SDS) al 1% y trietanolamina al 4%. Finalmente, se agregó 250 μL de cloruro férrico (FeCl_3) al 0.01 M en ácido clorhídrico (HCL) al 0,01 M y se dejó reposar por 30 minutos. Se realizó la lectura a una longitud de onda de 510 nm. Como blanco se utilizó 1 mL de solución acuosa (SDS al 1% y trietanolamina al 4%) en 250 μL de la solución de FeCl_3 al 0,01 M en HCL al 0,01 M. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido tánico por gramo de extracto seco (mg EAT) (29). Se utilizó ácido tánico como estándar a concentraciones de 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 y 0,8 mg/mL para elaborar la curva de regresión.

Contenido total de alcaloides

Se determinó empleando el método de verde bromocresol (30). Se tomó una alícuota de 1 mL del extracto (1 mg/mL) y se agregó 5 mL de tampón fosfato (pH 4,7) y 5 mL de solución de verde bromocresol, seguidamente, se agregó 2 mL de cloroformo y se mezcló, se repitió este último paso 2 veces más, por último, el extracto se recogió en un matraz volumétrico de 10 mL y se realizó la lectura a una longitud de onda de 470nm. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de quinina por gramo de extracto seco (mg EQ).

Evaluación actividad antioxidante

Se evaluó la actividad antioxidante por el método de captura del radical DPPH. Este ensayo se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Egharevba *et al* 2019 (31), con algunas modificaciones. En una microplaca de 96 pocillos, se adicionaron 200 μ L del extracto a diferentes concentraciones: 0,125; 0,250; 0,500; y 1,0 mg / mL con 100 μ L de una solución de DPPH (0,2 mM en metanol). La mezcla se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 40 min. La absorbancia se midió a 517 nm, usando metanol como blanco. Se utilizó hidroxitolueno butilado (BHT) como control positivo a las mismas concentraciones del extracto en metanol y se utilizó metanol con DPPH como control negativo. El porcentaje de inhibición de DPPH causado por el extracto, se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición DPPH} = [(Ac - Am) / Ac] \times 100$$

donde Ac es la absorbancia del control negativo y A la absorbancia de la muestra (extracto o BHT).

Evaluación de la actividad de la enzima α -glucosidasa

La inhibición de la actividad de la enzima α -glucosidasa se determinó usando el método descrito por Awin *et al.*, 2016 (32), con algunas modificaciones. La enzima α -glucosidasa se diluyó a 0,5 U/mL usando tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 6.8); el sustrato usado para la enzima fue p -nitrofenil- p -D-glucopiranosidasa (PNPG) 1 mM preparado en la misma solución tampón que se usó para disolver la enzima.

La reacción de α -glucosidasa se llevó a cabo con 10 μ L del extracto diluido (en el mismo buffer) en serie (concentraciones de 0,125; 0,25; 0,5 y 1,0 mg / mL). Luego, se agregó 130 μ L de tampón fosfato de sodio, 10 μ L de solución de α -glucosidasa; esta mezcla fue incubada a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente, se adicionaron 50 μ L de solución PNPG y se incubó a 37°C durante 20 minutos. El control negativo contenía todo lo mencionado anteriormente, reemplazando el extracto por buffer fosfato, y como control positivo se utilizó catequina a las mismas concentraciones del extracto. Además, para cada concentración se evaluó un blanco que contenía la mezcla de las soluciones mencionadas anteriormente, a excepción de la enzima. La absorbancia fue medida a 405 nm en espectrofotómetro y el porcentaje de inhibición de los extractos se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición de la enzima} = [(An - As) / An] \times 100$$

donde An es el valor de absorbancia del control negativo y As es la absorbancia de la muestra o del control positivo.

Análisis estadísticos

Los datos fueron expresados como la media \pm la desviación estándar de los resultados de tres determinaciones por triplicado para cada ensayo. A través de regresión lineal se determinó la IC₅₀. Las diferencias estadísticas entre los conjuntos de datos se analizaron mediante el software estadístico GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

El contenido fitoquímico de los extractos se muestran en la Tabla 1. En donde el contenido polisacárido total del extracto de jugo (EJ) fue de 785,3 mg EG, más del triple de lo encontrado en el extracto EEH, con 221,9 mg GE. Por otra parte, tanto el contenido polifenólico total como el contenido flavonoide, fueron mayores en el extracto EEH con 239,3 mg EAG y 184,4 mg EC, respectivamente. En contraste, el contenido de taninos y de alcaloides fueron mayores en el extracto EJ con 92,3 mg EAT y 25,3 mg EQ, respectivamente (Tabla 1.).

Los resultados de actividad antioxidante de los extractos de hojas y jugo de *P. edulis* se presentan en la Figura 2., en la cual se observa una actividad significativa de captura de radicales DPPH, en la cual se observa incluso actividad superior a la observada por el control positivo BHT. En el caso del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* se observa un comportamiento dosis dependiente, pues en la medida que se aumenta la concentración del extracto, aumenta la capacidad de inhibición de los radicales DPPH; iniciando con una inhibición del 25,4 % a una concentración de 0,125 mg/mL, hasta una inhibición de 93,9 % a una concentración de 1,0 mg/mL, evidenciando en esta concentración un mayor efecto que el causado por el control positivo a la misma concentración (86,7 %). Así mismo se determinó para este extracto un IC₅₀ de 0,262 mg/mL, evidenciando que el extracto EEH presenta una actividad antioxidante significativa (Figura 2.). También es importante destacar que el efecto antioxidante del EEH a concentraciones de 0,5 mg/mL y 1,0 mg/mL, no presenta diferencias estadísticamente significativas comparado con el efecto del control positivo ($p = 0,894$).

Al evaluar la actividad antioxidante del extracto de jugo de *P. edulis*, se encontró que al igual que el extracto EHH presenta un comportamiento dosis dependiente, iniciando con una inhibición del 11,7 % hasta 46,9 %, a concentraciones de 0,125 mg/mL y 1,0 mg/mL, respectivamente. Como se observa la actividad antioxidante no es tan significativa como la observada en el extracto EHH, con un IC₅₀ de 1,091 mg/mL, siendo esta 4 veces mayor que la observada en el EEH (Figura 2.).

Tabla 1. Contenido polifenólico, polisacárido y flavonoide de los extractos de *P. edulis*.

	Extracto del jugo de <i>P. edulis</i>	Extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i>
Contenido Polifenólico Total (mg EAG)	75,2 ± 18,0	239,3 ± 41,0
Contenido Polisacárido Total (mg EG)	785,3 ± 80,8	221,9 ± 16,5
Contenido Flavonoide Total (mg EC)	65,8 ± 9,9	184,4 ± 7,9
Contenido de Taninos Total (mg EAT)	92,3 ± 4,3	45,1 ± 3,6
Contenido de Alcaloides Total (mg EQ)	25,3 ± 2,0	8,4 ± 1,1

- (mg EAG) = mg equivalente de ácido gálico por gramo de extracto seco
- (mg EG) = mg equivalente de glucosa por gramo de extracto seco
- (mg EC) = mg equivalente de catequina por gramo de extracto seco
- (mg EAT) = mg equivalente de ácido tánico por gramo de extracto seco
- (mg EQ) = mg equivalente de quinina por gramo de extracto seco

Con relación a la actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa se observa un efecto moderado tanto del extracto de hojas como el extracto de jugo. Para el extracto de hojas de *P. edulis* se observa un efecto dosis dependiente, con un efecto inhibitorio que oscilo entre el 12,5 % y el 30,9 % a concentraciones de 0,125 mg/mL y 1,0 mg/mL, respectivamente (Figura 3.). Al determinar la concentración media inhibitoria de este extracto se obtuvo un valor de $IC_{50} = 1,899$ mg/mL, esto implica que a pesar de que el extracto posee componentes bioactivos con la capacidad de inhibir la acción de la enzima α -glucosidasa, la concentración de estos componentes dentro del extracto no debe ser muy elevada, por esta razón la actividad inhibitoria, no es significativa. Sin embargo, al comparar con el control positivo, el cual fue la catequina, un flavonoide de amplia acción biológica, entre ellas la capacidad de inhibir eficientemente la enzima en cuestión; se evidencia que el extracto EEH en las dos mayores concentraciones evaluadas alcanza una inhibición cercana al 50% del efecto del control (Figura 3.). Teniendo en cuenta lo anterior, y comparando el efecto observado del control (una molécula aislada y purificada) frente al efecto de un extracto crudo (el extracto evaluado), la acción inhibitoria comienza a tomar relevancia.

En cuanto la capacidad de inhibición de la enzima α -glucosidasa por parte del extracto de jugo de *P. edulis* se observó que el efecto es directamente proporcional a la concentración del extracto, oscilando entre 15,1% y 35,7% para la menor y mayor concentración evaluada, respectivamente (Figura 3.). Como se observa el extracto de jugo presenta un mayor efecto comparado con el extracto EHH, y

esta diferencia es estadísticamente significativa ($p= 0,002$). El extracto EJ presentó un IC_{50} de 1,623mg/mL; nuevamente se evidencia un mayor efecto inhibitorio por parte de este extracto comparado con el EEH, esto puede deberse a que los componentes bioactivos con la capacidad para inhibir esta enzima se encuentran en este extracto a una mayor concentración.

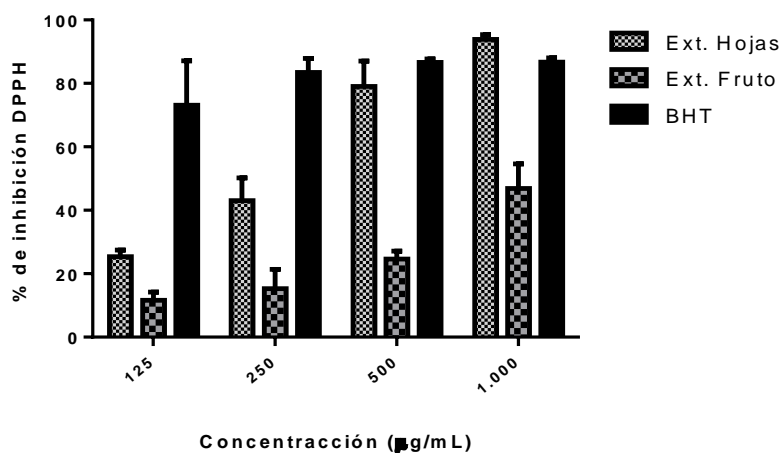


Figura 2. Porcentaje de inhibición del radical DPPH por los extractos de *P. edulis*

DISCUSIÓN

El uso de las plantas o extractos de ellas como alternativa terapéutica está ampliamente difundido y aceptado en nuestra sociedad. Sin embargo, es claro que hace falta mucha investigación que demuestre con fundamentos experimentales que el uso de ella es seguro y efectivo; este proceso implica una robusta cantidad de estudios, los cuales buscan soportar la seguridad y eficacia de las preparaciones tradicionales y de los productos fitoterapéuticos, incluso para optimizar el proceso de extracción, almacenamiento y administración de dichos tratamientos. Dentro los estudios, la caracterización fitoquímica es fundamental para poder tener una aproximación de los compuestos activos del material vegetal responsables del efecto biológico, además esa información es la base para estudios complementarios de toxicología y farmacología.

En el caso particular de *Passiflora edulis* o maracuyá, como se conoce comúnmente, es una planta tropical bien reconocida por sus beneficios nutricionales y por sus propiedades medicinales. Esta planta es originaria de Suramérica y es en esta región donde se han realizado la mayoría de los estudios tanto desde el punto de vista de su cultivo como desde su análisis de componentes fitoquímicos (33). La maracuyá se destaca por su contenido polifenólico, el cual varía dependiendo

del tejido de la planta que se utilice para su obtención, siendo las hojas con un 53,7 % y el jugo con una menor proporción con tan solo un 6,1 % (33). Estos reportes son concordantes con lo observado en nuestro estudio donde en el extracto de hojas reportamos un contenido polifenólico tres veces mayor a lo observado en el extracto de jugo. Del mismo modo, el contenido flavonoide en el extracto de hojas fue mayor que el extracto de jugo, en la misma proporción de los polifenoles. Estos resultados son correspondientes, toda vez que, *Passiflora edulis* es la especie de pasiflora más analizada en cuanto al perfil de sus componentes fenólicos, es así como en ella se han identificado en total, 52 componentes fenólicos, distribuidos en: 35 componentes flavonoides, 11 ácidos fenólicos, 4 estilbenos y dos cumarinas (34). Algunos flavonoides se han reportado con actividad antidiabética o actividad hipoglicemiante y su mecanismo de acción propuesto radica en sus propiedades antioxidantes, en donde se atenúa el daño tisular que generan diversos procesos inflamatorios relacionados con la resistencia a la insulina (35). Adicionalmente, se ha encontrado que flavonoides como la isovitexina, vitexina, orientina, kaempferol, entre otros, poseen la capacidad de inhibir la acción de las enzimas glucosil-hidrolasas del tracto gastrointestinal (36); estos compuestos han sido reportados en extractos de plantas de la familia *Passifloraceae*.

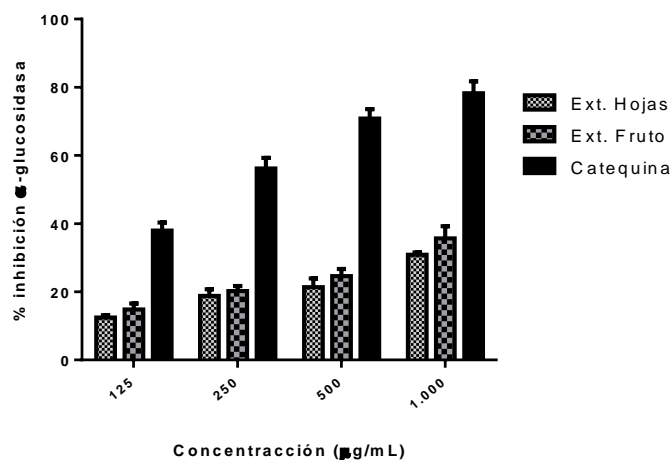


Figura 3. Porcentaje de inhibición α -glucosidasa debida a los extractos de *P. edulis*

Como se había mencionado en el capítulo de los componentes fitoquímicos de la *P. edulis*, en este mismo proyecto, la concentración de los componentes bioactivos en plantas varía en función de diferentes factores medioambientales como: las condiciones del suelo, lugar de colecta, el periodo climático, el número de cosecha, los fotoperiodos y la temperatura. En este caso en particular, para el

desarrollo de este proyecto trabajamos con dos cultivos diferentes, ubicados en diferentes lugares y observamos variaciones tanto en los perfiles fitoquímicos como en las actividades biológicas; tal es el caso, que en los extractos obtenidos para evaluar la inhibición enzimática de la α -glucosidasa el contenido de polifenoles, polisacáridos y flavonoides, fueron más del doble, comparado con los primeros extractos con los cuales iniciamos el proyecto, del mismo modo también se observa variación con los reportes realizados por nuestro grupo de investigación, de muestra colectadas de otro cultivo (26).

La capacidad antioxidante generalmente se ha asociado al contenido de compuestos polifenoles presentes en el extracto (37). En este trabajo se evidenció que la actividad antioxidante del extracto EEH presenta una mayor actividad antioxidante posiblemente debido a su mayor contenido polifenólico, del mismo modo, los flavonoides aportan significativamente a la capacidad antioxidante de los extractos, participando en varios procesos celulares como en la inhibición de los radicales libres de oxígeno, la inmovilización de leucocitos, inhibición de la óxido nítrico y la oxidación de la xantina oxidasa (38). La capacidad antioxidante otorgada por los componentes bioactivos de *P. edulis* puede cumplir varias funciones protectoras en el organismo, como: protección contra daños del ADN, inhibición de la peroxidación lipídica, y efectos protectores frente a diferentes enfermedades tales como: cáncer, aterosclerosis, diabetes mellitus, SIDA, enfermedades respiratorias, enfermedades cardiovasculares, entre otras (26).

Los extractos obtenidos de las plantas pertenecientes al género *Passiflora*, presentan una actividad antioxidante significativa, como lo reportan Colomeu *et al.*, 2014 (39), quienes encontraron en el extracto etanólico de hojas de *P. alata* una inhibición del radical DPPH del 38,4 % a una concentración de 40 mg/mL; si comparamos estos resultados con los nuestros, nuestros extractos presentaron una capacidad antioxidante 40 veces superior. En la evaluación de la capacidad antioxidante del extracto de cascara de *P. edulis* (35), reportan una inhibición del radical DPPH del 48 % a una concentración de 1,0 mg/mL, siendo este resultado la mitad de lo observado en nuestro extracto EEH y muy similar al observado en el extracto EJ. Así mismo, otros estudios en hojas de *P. edulis* reportan valores de IC_{50} de 1,100 mg/mL (40) o IC_{50} de 0,702 mg/mL (41), valores que son superiores a lo reportado para nuestro extracto de hojas con un IC_{50} de 0,202 mg/mL, lo que indica que el extracto EEH alcanza un 50 % de inhibición del radical a una concentración 5 veces más baja. Sin embargo, otras especies de *Passifloras* presentan actividades antioxidante más potentes, como el caso del extracto de las hojas de *Passiflora nítida* (25) con un IC_{50} de 0,05 mg/mL, el extracto del fruto de *Passiflora leschenaultii* (42) con un IC_{50} de 0,007 mg/mL, y el extracto de fruto de *Passiflora ligulares* con un IC_{50} de 0,023 mg/mL (24).

Con relación a la capacidad de inhibición de la enzima α -glucosidasa por los extractos de plantas de este género, se han realizado diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*. En el caso de los estudios *in vitro* como el nuestro, Anjitha *et al.*, en el 2020 (43), evaluaron el efecto de los extractos de hoja de *P. edulis* sobre la actividad de la enzima, encontrado que dicho extracto tiene la capacidad de inhibir el 69,9 % de la actividad enzimática a una concentración de 1,0 mg/mL, además reportan un IC₅₀ de 0,508 mg/mL; resultados que muestran una mayor actividad inhibitoria de la enzima si los comparamos con los nuestros. Del mismo modo, se realizaron ensayos *in vitro* para evaluar el efecto de compuestos tipo flavonoides aislados y purificados de semillas de *P. edulis* sobre la enzima α -glucosidasa (44), encontrado que los siete compuestos aislados, generan una inhibición enzimática superior al 97 % a concentraciones micromolares, superando por mucho a lo mostrado por el medicamento acarbosa. Estas variaciones en los porcentajes de inhibición podrían estar relacionados con los cambios en la expresión de metabolitos secundarios con actividad inhibitoria de la enzima, tanto en términos cualitativos como cuantitativos.

En cuanto a los ensayos *in vivo* se ha evaluado, extractos de fruto de *P. edulis* sobre la reducción de parámetros bioquímicos en un modelo animal (45) (ratas Wistar) a los que se les suministró extracto (1,0 mg/kg día), observando una reducción de un 60 % de la glucosa en sangre, así mismo, se observó reducción de colesterol y triglicéridos. Incluso también, se ha evaluado este efecto antidiabético en humanos, utilizando un extracto de hojas de *P. edulis* (46), el cual fue suministrado a 42 individuos con diabetes mellitus no controlada a pesar del consumo de un tratamiento, reportaron que en estos sujetos luego de la intervención, mostraron una reducción del 37,1 % de la glucosa en sangre. En conjunto, los resultados de estos estudios señalan que *Passiflora edulis* poseen componentes bioactivos con la capacidad para inhibir la acción de enzimas involucradas en el metabolismo y absorción de la glucosa, tales como la α -amilasa y la α -glucosidasa, de esa forma, estos extractos y sus respectivos componentes fitoquímicos, pueden convertirse en una alternativa terapéutica para el tratamiento o prevención de la diabetes mellitus, y al mismo tiempo reducir la probabilidad de desarrollar otras enfermedades asociadas al metabolismo de carbohidratos y de lípidos, como la obesidad y la esteatosis hepática.

Un estudio reciente, sobre la actividad inhibitoria de los extractos de hojas de *Passiflora bogotensis* (47), utilizando solventes polares para obtener los extractos y evaluando diferentes cultivos, reportan que, de 167 extractos evaluados, 156 mostraron actividad inhibitoria sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa, mostrando una variación de inhibición en un rango entre un 2 % a 48%; explicando que estas variaciones de actividad biológica no presentaron una tendencia clara respecto al lugar de procedencia del cultivo de donde se obtuvieron las muestras o al tipo de almacenamiento, sin

embargo, señalan que las variaciones en la capacidad inhibitoria estaban relacionadas con los cambios en el perfil metabólico propio de cada muestra.

CONCLUSIONES

En la realización de esta investigación, se puede concluir que los extractos de *Passiflora edulis* poseen un alto contenido de compuestos fitoquímicos con actividad biológica, como lo son los polifenoles y flavonoides.

El extracto etanólico de hojas de *P. edulis* exhibe una actividad antioxidante significativa, lo cual tiene importancia biomédica, debido a la protección que brinda a las células del daño que pueden ejercer de las especies reactivas de oxígeno.

Ambos extractos poseen componentes bioactivos con la capacidad de inhibir la actividad de la enzima α -glucosidasa, lo que abre el camino para realizar estudios más detallados que permitan proponer a estos extractos o a sus componentes aislados como posibles estrategias terapéuticas en el control y prevención de la diabetes mellitus.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, Linnenkamp U, Guariguata L, Cho NH, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;128:40–50. doi.org/10.1016/j.diabres.2017.03.024
2. WHO. Global Report on Diabetes. Isbn. 2016;978:6–86. Available from: http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/index.htmlhttp://www.who.int/about/licensing/copyright_form/index.html<https://apps.who.int/iris/handle/10665/204871><http://www.who.int/about/licensing/>
3. Gómez-Peralta F, Abreu C, Cos X, Gómez-Huelgas R. When does diabetes start? Early detection and intervention in type 2 diabetes mellitus. *Rev Clin Esp.* 2020;220 (5): 305–14.
4. Ch'ng LZ, Barakatun-Nisak MY, Wan Zukiman WZH, Abas F, Wahab NA. Nutritional strategies in managing postmeal glucose for type 2 diabetes: A narrative review. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev.* 2019; 13 (4): 2339–45. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.05.026>
5. Yuan T, Yang T, Chen H, Fu D, Hu Y, Wang J, et al. New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. *Redox Biol.* 2019; 20: 247–60.

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.09.025>

6. Nelson AJ, Nicholls SJ. Treating Dyslipidemia in Type 2 Diabetes. *Diabetes Lipids Cardiovascular risk Clinical trials*. 2018; 36: 233–9. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2017.12.005>
7. Dewidar B, Kahl S, Pafili K, Roden M. Metabolic liver disease in diabetes – From mechanisms to clinical trials. *Metabolism*. 2020. 154299. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154299>
8. Chaudhury A, Duvoor C, Sena V, Dendi R, Kraleti S, Chada A, et al. Clinical Review of Antidiabetic Drugs : Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management. *Frontiers in Endocrinology*. 2017;8. doi: 10.3389/fendo.2017.00006.
9. Bailey CJ. The current drug treatment landscape for diabetes and perspectives for the future. *Clin Pharmacol Ther*. 2015; 98 (2): 170–84. doi:10.1002/cpt.144
10. Tang H, Ma F, Zhao D, Xue Z. Exploring the effect of salvianolic acid C on α -glucosidase: Inhibition kinetics, interaction mechanism and molecular modelling methods. *Process Biochem*. 2019; 78: 178–88. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.01.011>
11. Chai W, Ou-Yang C, Ma Z, Song S, Huang Q, Wei Q, et al. Anti- α -glucosidase and antityrosinase activity of condensed tannins from the bark of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels with antiproliferative and apoptotic properties in B16 mouse melanoma cells. *Process Biochem*. 2019; 86: 205–14. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.08.005>
12. Lin MZ, Chai WM, Zheng YL, Huang Q, Ou-Yang C. Inhibitory kinetics and mechanism of rifampicin on α -glucosidase: Insights from spectroscopic and molecular docking analyses. *Int J Biol Macromol*. 2019; 122: 1244–52. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.077>
13. Parhofer KG. Interaction between glucose and lipid metabolism: More than diabetic dyslipidemia. *Diabetes Metab J*. 2015; 39 (5): 353–62. <http://dx.doi.org/10.4093/dmj.2015.39.5.353>
14. Cheng MH, Hsieh CL, Wang CY, Tsai CC, Kuo CC. Complementary therapy of traditional Chinese medicine for blood sugar control in a patient with type 1 diabetes. *Complement Ther Med*. 2017; 30: 10–3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctim.2016.09.007>
15. Wu X, Hu M, Hu X, Ding H, Gong D, Zhang G. Inhibitory mechanism of epicatechin gallate on α -amylase and α -glucosidase and its combinational effect with acarbose or epigallocatechin gallate. *J Mol Liq*. 2019; 290: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111202>
16. Wang H, Shi S, Wang S. Can highly cited herbs in ancient Traditional Chinese medicine formulas and modern publications predict therapeutic targets for diabetes mellitus? *J Ethnopharmacol*. 2018; 213: 101–10. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.10.032>
17. Sunil C, Kumar V, Van Staden J. In vitro alpha-glucosidase inhibitory, total phenolic composition,

- antiradical and antioxidant potential of *Heteromorpha arborescens* (Spreng.) Cham. & Schlttdl. leaf and bark extracts. *South African J Bot.* 2019; 124: 380–6. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.05.017>
18. Di Stefano E, Oliviero T, Udenigwe CC. Functional significance and structure–activity relationship of food-derived α -glucosidase inhibitors. *Curr Opin Food Sci.* 2018; 20: 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.02.008>
 19. Jafarnejad S, Keshavarz SA, Mahbubi S, Saremi S, Arab A, Abbasi S, et al. Effect of ginger (*Zingiber officinale*) on blood glucose and lipid concentrations in diabetic and hyperlipidemic subjects: A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Funct Foods.* 2017; 29: 127–34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2016.12.006>
 20. Alongi M, Anese M. Effect of coffee roasting on in vitro α -glucosidase activity: Inhibition and mechanism of action. *Food Res Int.* 2018; 111: 480–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.061>
 21. Guerrero-Romero F, Simental-Mendía LE, Martínez-Aguilar G, Sánchez-Meraz MA, Gamboa-Gómez CI. Hypoglycemic and antioxidant effects of five commercial turmeric (*Curcuma longa*) supplements. *J Food Biochem.* 2020;1–9. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13389>
 22. Sekar V, Chakraborty S, Mani S, Sali VK, Vasanthi HR. Mangiferin from *Mangifera indica* fruits reduces post-prandial glucose level by inhibiting α -glucosidase and α -amylase activity. *South African J Bot.* 2019; 120: 129–34. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.02.001>
 23. Paulraj JA, Subharamanian H, Suriyamoorthy P. Phytochemical screening, gc-ms analysis and enzyme inhibitory activity of *passiflora foetida* L. *Joseph. Indo Am J Pharm Res.* 2014; 4 (08).
 24. Saravanan S, Parimelazhagan T. In vitro antioxidant, antimicrobial and anti-diabetic properties of polyphenols of *Passiflora ligularis* Juss. fruit pulp. *Food Sci Hum Wellness.* 2014; 3 (2): 56–64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2014.05.001>
 25. Montefusco-Pereira CV, De Carvalho MJ, De Araújo Boleti AP, Teixeira LS, Matos HR, Lima ES. Antioxidant, anti-inflammatory, and hypoglycemic effects of the leaf extract from *passiflora nitida* kunth. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013; 170 (6): 1367–78. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-013-0271>
 26. Aguilón J, Maldonado ME, Loango Chamorro N, Arango SAV. Antioxidant and antiproliferative activity of ethanolic and aqueous extracts from leaves and fruits juice. *Perspect En Nutr Humana.* 2013; 15: 13–25.
 27. Muñoz-Bernal ÓA, Torres-Aguirre GA, Núñez-Gastélum JA, de la Rosa LA, Rodrigo-García J, Ayala-Zavala JF, et al. Nuevo Acercamiento a La Interacción Del Reactivo De Folin-Ciocalteu Con Azúcares Durante La Cuantificación De Polifenoles Totales. *Rev Espec en Ciencias Químico-Biológicas.* 2017; 20 (2): 23–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.recqb.2017.04.003>

28. López-legarda X, Taramuel-gallardo A, Arboleda- C. Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales. *Rev Cuba Química*. 2017; 29 (2): 180–98.
29. Armentano MF, Bisaccia F, Miglionico R, Russo D, Nolfi N, Carmosino M, et al. Antioxidant and Proapoptotic Activities of *Sclerocarya birrea* [(A. Rich.) Hochst.] Methanolic Root Extract on the Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG2. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 1–11. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/561589>
30. Fazel S, Hamidreza M, Rouhollah G, Verdian-Rizi M. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *J Appl Hortic*. 2010; 12 (1): 69–70.
31. Egharevba GO, Dosumu OO, Oguntoye SO, Njinga NS, Dahunsi SO, Hamid AA, et al. Antidiabetic, antioxidant and antimicrobial activities of extracts of *Tephrosia bracteolata* leaves. *Heliyon*. 2019; 5 (8) :e02275. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02275>
32. Awin T, Mediani A, Maulidiani, Shaari K, Faudzi SMM, Sukari MAH, et al. Phytochemical profiles and biological activities of *Curcuma* species subjected to different drying methods and solvent systems: NMR-based metabolomics approach. *Ind Crops Prod*. 2016; 94: 342–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.020>
33. Gadioli IL, da Cunha M de SB, de Carvalho MVO, Costa AM, Pineli L de L de O. A systematic review on phenolic compounds in *Passiflora* plants: Exploring biodiversity for food, nutrition, and popular medicine. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018 Mar 24; 58 (5): 785–807. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2016.1224805>
34. Sakalem ME, Negri G, Tabach R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. *Rev Bras Farmacogn*. 2012; 22 (6): 1219–32. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000108>
35. Goss MJ, Nunes MLO, Machado ID, Merlin L, Macedo NB, Silva AMO, et al. Peel flour of *Passiflora edulis* Var. *Flavicarpa* supplementation prevents the insulin resistance and hepatic steatosis induced by low-fructose-diet in young rats. *Biomed Pharmacother*. 2018; 102: 848–54. <http://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.137>
36. Ni M, Hu X, Gong D, Zhang G. Inhibitory mechanism of vitexin on α -glucosidase and its synergy with acarbose. *Food Hydrocoll*. 2020; 105. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105824>
37. Debelo H, Li M, Ferruzzi MG. Processing influences on food polyphenol profiles and biological activity. *Curr Opin Food Sci*. 2020; 32: 90–102. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.03.001>
38. Nagula RL, Wairkar S. Recent advances in topical delivery of flavonoids: A review. *J Control Release*. 2019; 296: 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.01.029>

39. Colomeu TC, Figueiredo D, Cazarin CBB, Schumacher NSG, Maróstica MR, Meletti LMM, et al. Antioxidant and anti-diabetic potential of *Passiflora alata* Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NOD-mice). *Int Immunopharmacol.* 2014; 18 (1): 106–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2013.11.005>
40. da Silva JK, Cazarin CBB, Colomeu TC, Batista ÂG, Meletti LMM, Paschoal JAR, et al. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: In vitro and in vivo study. *Food Res Int.* 2013; 53 (2): 882–90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.043>
41. Cristina Lopes do Carmo M, Mateus Martins I, Elisa Ramos Magalhães A, Roberto Maróstica Júnior M, Alves Macedo J. Passion fruit (*Passiflora edulis*) leaf aqueous extract ameliorates intestinal epithelial barrier dysfunction and reverts inflammatory parameters in Caco-2 cells monolayer. *Food Res Int.* 2020; 133. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109162>
42. Shanmugam S, Sandes RDD, Rajan M, Neta MTSL, dos Santos Lima B, de Jesus MJM, et al. Volatile profiling and UHPLC-QqQ-MS/MS polyphenol analysis of *Passiflora leschenaultii* DC. fruits and its anti-radical and anti-diabetic properties. *Food Res Int.* 2020; 133. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109202>
43. Anjitha R, Subbaraya U, Narasimhan G. Integrated invitro-insilico screening strategy of ethanolic extract of leaves of *passiflora edulis* sims var. *Flavicarpa* against alpha glucosidase. *Res J Pharm Technol.* 2020; 13 (3): 1309–13. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2020.00241.3>
44. Pan ZH, Ning DS, , et al. Preparative Isolation of Piceatannol Derivatives from Passion Fruit (*Passiflora edulis*) Seeds by High-Speed Countercurrent Chromatography Combined with High-Performance Liquid Chromatography and Screening for α -Glucosidase Inhibitory Activities. *J Agric Food Chem.* 2020; 68 (6): 1555–62. <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04871>
45. Kandandapani S, Balaraman AK, Ahamed HN. Extracts of passion fruit peel and seed of *Passiflora edulis* (Passifloraceae) attenuate oxidative stress in diabetic rats. *Chin J Nat Med.* 2015; 13 (9): 680–6. [https://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364\(15\)30066-2](https://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364(15)30066-2)
46. Chandrasekhar D, Jose SM, Jomy A, Joseph A, Pradeep A, Geoji AS. Antiglycation property of *passiflora edulis* f. *Flavicarpa* deg. foliage in type 2 diabetic patients. *Clin Epidemiol Glob Heal.* 2019; 7 (3): 409–12. <https://doi.org/10.1016/j.cegh.2018.07.002>
47. Monzón Daza JG. Estudio metabólico de hojas de *Passiflora ligularis* juss y su relación con la actividad inhibitoria sobre α -amilasa y α -glucosidasa. Universidad Nacional de Colombia; 2019.

CAPITULO VII

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS DE *Passiflora edulis* SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE LÍPIDOS EN CÉLULAS HepG2

INTRODUCCIÓN

Actualmente, la población en general cada vez es más propensa al desarrollo de enfermedades metabólicas, como la obesidad debido al incremento del consumo descontrolado de alimentos con un alto contenido graso. Estas grasas son metabolizadas en el hígado, el cual regula su distribución a otros órganos y tejidos; y ese alto consumo de grasas tiene como consecuencia, aumenta el tejido adiposo, la acumulación de lípidos en circulación, hepatotoxicidad por el aumento de residuos cetónicos derivados de su catabolismo, con la consecuente, respuesta inflamatoria (1). Varios estudios han demostrado que el consumo de lípidos conlleva al desarrollo de síndrome metabólico (2–5), el cual es un factor de riesgo de múltiples enfermedades como la hipertensión, la dislipidemia, resistencia a la insulina y la obesidad, las cuales comprenden factores de riesgo de otras enfermedades de mayor impacto como enfermedades coronarias, diabetes, hígado graso o esteatosis y factores de riesgo de varios tipos de cáncer (6–8), de ahí la importancia, del mejoramiento del estilo de vida, empezando por la reducción del consumo de una dieta alta en calorías, que se verá reflejado en la prevención de enfermedades mencionadas anteriormente, sin embargo, para la mayoría de la población, debido a su condición económica o laboral, la falta de tiempo y en general, una vida acelerada, son pocas las posibilidades de mantener una alimentación saludable o poder realizar una rutina de ejercicio, lo que conlleva a un aumento de peso debido a la acumulación de lípidos en diferentes tejidos.

La esteatosis hepática (EH) se caracteriza por la acumulación de lípidos en el interior de los hepatocitos, siendo una de las enfermedades hepáticas más comunes en occidente. La esteatosis hepática puede ser una condición benigna, no inflamatoria o puede estar asociada con esteatohepatitis, condición que puede resultar en un daño severo del hígado (9). Esta enfermedad presenta una prevalencia creciente, y no se cuenta con un tratamiento oficialmente aprobado para controlarla, solo se pueden usar tratamientos indirectos en busca de reducir la acumulación de lípidos; por este motivo, son muchas las investigaciones científicas que se han adelantado sobre este particular, lo que ha permitido un mayor conocimiento de su patofisiología (10).

Se considera que la esteatosis hepática es una de las principales causas del desarrollo del síndrome de resistencia a la insulina, debido al cambio fisiológico que sufren los hepatocitos, así como a las señales inflamatorias que se producen; por otra parte, independiente del síndrome de resistencia a la insulina, la esteatosis hepática aumenta el riesgo de enfermedad cardiovascular, esto se sustenta en una mayor tasa de muertes en individuos con esteatosis hepática por enfermedad cardiovascular que por eventos asociados a cirrosis hepática, la cual es la condición final de esta enfermedad. La prevalencia global de EH ha sido calculada en un 25%, manifestándose en todos los grupos étnicos, independiente de su edad y género (10).

Además de los cambios de hábitos alimenticios de la población, la búsqueda de nuevos tratamientos que puedan controlar los efectos metabólicos relacionados con el exceso de consumo de grasa en nuestra dieta, es fundamental; teniendo como base la alta prevalencia de enfermedades como la obesidad, la esteatosis hepática y otros síndromes metabólicos. Es así, que una importante estrategia terapéutica es el uso de plantas medicinales, entre las cuales se puede citar a *Passiflora edulis*, la cual ha sido usada para diferentes propósitos medicinales (entre ellos, como sedante (11), ansiolítica (12), antihipertensiva (13), entre otras), así como en la reducción de los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre (14–17), sin embargo, es muy poco lo que se conoce, si estos efectos sobre el metabolismo de los lípidos ocurren a nivel del sistema digestivo o sobre la síntesis y degradación a nivel hepático. El hecho de que *P. edulis* posea un amplio contenido de compuestos bioactivos de importancia biomédica, tales como: ácido ascórbico, flavonoides, alcaloides, quercetina, kaempferol, pectina y un alto contenido de azúcares y polifenoles con demostradas actividades antioxidantes; la convierte en una excelente fuente de recursos para la investigación sobre los efectos beneficiosos, que esta amplia gama de metabolitos secundarios pueda brindar a la salud humana. En este contexto, la presente investigación tiene como propósito evaluar el efecto que presentan los extractos de hojas y jugo de *P. edulis* sobre la concentración de los lípidos en el modelo celular hepG2 estimuladas con ácido oleico.

METODOLOGÍA

Para evaluar el efecto que se produce sobre la concentración de lípidos en células HepG2 tratadas con los extractos de hojas y jugo de *P. edulis*, se realizaron dos tipos de ensayos, uno cualitativo (tinción Oil Red) y otro cuantitativo (cuantificación de colesterol y triglicéridos).

a. Evaluación cualitativa - Tinción Oil Red

Cultivo celular: Los ensayos se realizaron utilizando como modelo celular, las células HepG2. Se sembraron 10.000 células/pozo en placas de 96 pozos, las células fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medio) con L-Glutamina y suero fetal bovino (SFB) al 10%, antibiótico al 1 % (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina) y aminoácidos esenciales al 1%; incubadas a 37 °C y 5 % de CO₂. Cuando las células alcanzaban una confluencia del 80 % se cambiaba a medio DMEM suplementado con SFB al 3 % durante 8 horas y luego se cambiaba por nuevo medio de cultivo con los tratamientos.

Tratamientos: Para determinar la acumulación de lípidos al interior de las células, se evaluaron los extractos de hojas y de jugo de *P. edulis* a concentraciones de 50, 100 y 200 µg/mL, y ácido oleico (AO) a 100 µM (ácido graso sustrato para inducir la acumulación de lípidos), preparados en DMEM suplementado con SFB al 3 %. Las células fueron expuestas durante 24 horas a los tratamientos consistentes de la mezcla de las diferentes concentraciones de los extractos con ácido oleico (AO) (18), como control positivo se cultivaron células solo con ácido oleico y como control negativo, células solo con medio DMEM suplementado con SFB al 3 %.

Fijación celular: Pasado el tiempo de incubación con los tratamientos, las células fueron fijadas con paraformaldehído. Se retiraba el medio de cultivo o tratamientos, y se lavaba dos veces con buffer fosfato salino (PBS) 2X; se adicionaron 100 µL de paraformaldehído al 10 %, se incubó durante 1 hora a 4 °C.

Tinción de lípidos: Inicialmente se preparó la solución de tinción Oil Red en isopropanol a 2 mg/mL. Luego de retirar con mucho cuidado la solución de fijación y se lavaron las células dos veces con agua destilada, se adicionó 100 µL de isopropanol al 60 % y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, se removió el alcohol y se adicionó 100 µL de la solución de tinción Oil Red.

La placa de cultivo se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y en agitación circular a 120 rpm. Finalmente, se retira el colorante y se lavan las células 5 veces con agua destilada. Se mantienen las células teñidas cubiertas con agua y se observaron en microscopio óptico marca Optika, referencia IM-3. Las fotografías de las células se tomaron usando el objetivo 40X y con la cámara acoplada al microscopio, marca Optika, referencia C-B3.

Las imágenes (fotografías) fueron evaluadas usando el software Image J, con este programa, se calculó el área de la imagen que estaba teñida por el colorante, para finalmente calcular las veces que se diferencia los tratamientos con relación al control negativo, usando la siguiente formula:

$$\text{Veces de cambio} = \frac{\text{área del tratamiento}}{\text{área del control negativo}}$$

b. Evaluación cuantitativa – Cuantificación de colesterol y triglicéridos

Cultivo celular: Se sembraron 200.000 células/pozo en placas de 6 pozos, las células fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medio) con L-Glutamina y suero fetal bovino (SFB) al 10 %, antibiótico al 1 % (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de sulfato de estreptomycin) y aminoácidos esenciales al 1 %; incubadas a 37 °C y 5 % de CO₂. Cuando las células alcanzaban una confluencia del 80 % se cambiaba a medio DMEM suplementado con SFB al 3 % durante 8 horas y luego se cambiaba por nuevo medio de cultivo con los tratamientos indicados anteriormente.

Extracción de los lípidos: Una vez terminados los periodos de incubación, se colectó el medio de cultivo y se lisaron las células, con 1 mL de buffer de lisis RIPA. Este lisado se dividió en tres porciones: 400 µL para determinar colesterol, 400 µL para triglicéridos y 200 µL para cuantificar proteínas, para normalizar los valores en base a la concentración de proteínas.

A los 400 µL de lisado se le adicionó 500 µL de cloroformo y 1 mL de metanol, la mezcla se dejó en agitación durante 1 hora, posteriormente se adicionó 500 µL de agua destilada y 500 µL de cloroformo (se generan dos fases: fase clorofórmica en el fondo y fase acuosa en la parte superior), se centrifugó a 300 rpm durante 2 minutos y se removió la fase clorofórmica a un nuevo tubo (en esta fase se encontraban los lípidos extraídos), el cloroformo se dejó evaporar por completo, incubando a temperatura ambiente durante 24 horas; el residuo resultante se utilizó para la cuantificación lipídica (19).

Una vez obtenidos los residuos lipídicos se disolvieron en 5 µL de isopropanol y a esta mezcla se le adicionó 1 mL del reactivo del Kit colorimétrico Human Liquicolor® para la

cuantificación de triglicéridos, se incubó durante 5 minutos a 37 °C y se midió absorbancia a 510 nm, se usó como estándar de triglicéridos, el reactivo aportado en el kit.

El mismo procedimiento se realizó para cuantificar colesterol, cambiando el reactivo del Kit para la determinación de colesterol y su respectivo estándar.

Finalmente, se calculó la concentración de lípidos, normalizando con la curva de concentración de proteínas para cada tratamiento. Las proteínas se cuantificaron por el método BCA (ácido bicinónico) utilizando albúmina sérica para la curva de calibración. El mismo procedimiento de extracción se realizó al medio de cultivo colectado, para determinar los lípidos extracelulares.

Cálculos para la cuantificación de los lípidos: Con base en los valores de absorbancia obtenidos se realizaron los siguientes cálculos para determinar las concentraciones de colesterol y triglicéridos:

Se calculó la concentración en mg/dL de colesterol o triglicéridos, empleando la ecuación, suministrada por el proveedor del Kit:

$$Colesterol = 200 \times \frac{\Delta A \text{ muestra}}{\Delta A \text{ estandar}} \left[\frac{mg}{mL} \right]$$

El valor obtenido se dividió por 40, debido a que en la ecuación del kit se asume que la muestra inicial tenía un volumen de 10 µL, sin embargo, en el experimento se partió de 400 µL, por esto la división.

La cantidad obtenida se multiplica por 10 para convertir los mg/dL a µg/mL

$$\frac{1 \text{ mg}}{dl} \times \frac{1 \text{ dl}}{100 \text{ ml}} \times \frac{1000 \mu g}{1 \text{ mg}} = 10 \text{ ug/mL}$$

Los resultados fueron reportados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes, y las comparaciones estadísticas fueron realizadas por una prueba Kruskal-Wallis con el programa estadístico SPSS v20.0. Los resultados con valores $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Evaluación cualitativa de los lípidos

En el presente estudio, se evaluó los efectos de los extractos de hojas y jugo de *P. edulis* sobre la concentración de lípidos en células HepG2 estimuladas con ácido oleico, de forma cualitativa y cuantitativa. En la literatura son varias las investigaciones que señalan que la exposición del modelo celular HepG2 a ácidos grasos monoinsaturados como el ácido oleico, conlleva a una acumulación de lípidos en vacuolas al interior celular, situación que se asemeja a la esteatosis hepática. De hecho, en nuestro estudio, se evidenció esta situación a través del ensayo de tinción de lípidos, en el cual las células expuestas al ácido oleico aumentaron la presencia de lípidos en su interior cerca de 4 veces comparado con lo observado para las células control (Figura 1A y 1B).

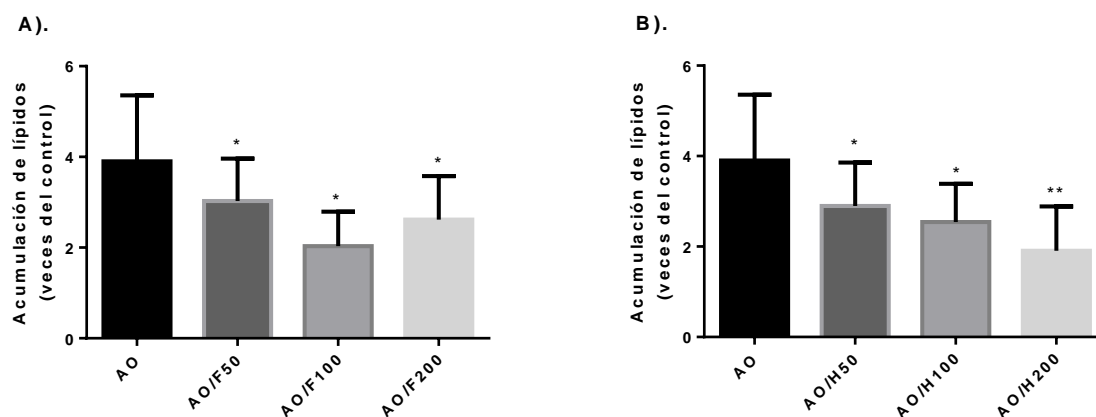


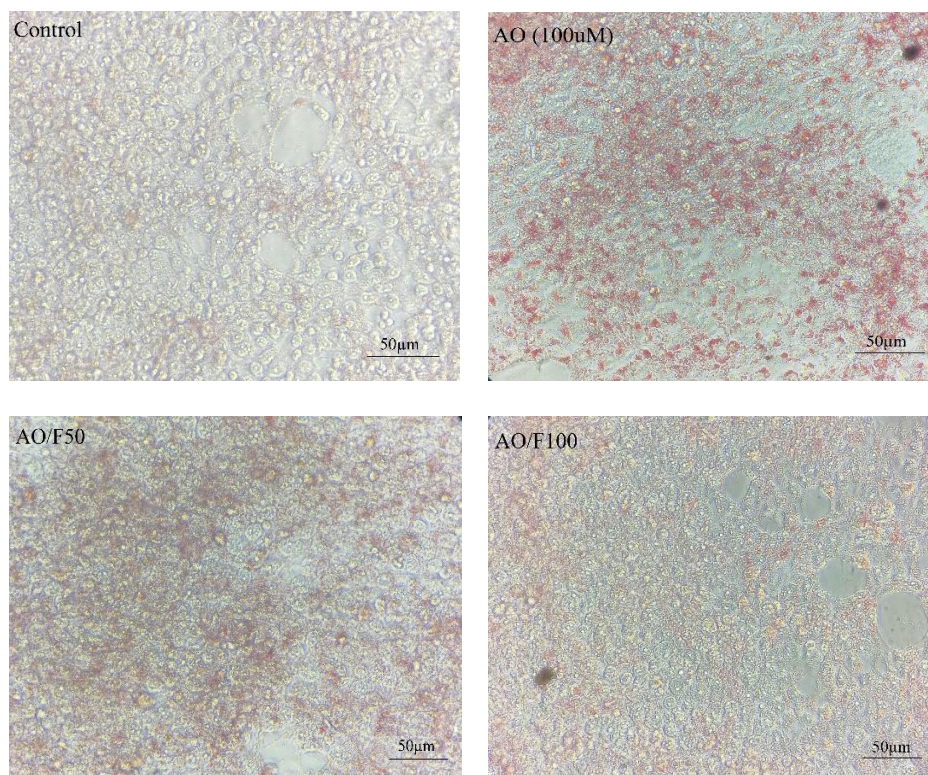
Figura 1. Inhibición de la acumulación lipídica por los extractos de *P. edulis*. Los datos reportados corresponden a las medias \pm la desviación estándar de tres muestras para cada grupo. * $p < 0,05$ con relación al ácido oleico. ** $p < 0,001$ con relación al ácido oleico. **A).** Resultados obtenidos con extracto de jugo. **B).** Resultados obtenidos con el extracto etanólico de hojas. AO, ácido oleico (100 μ M); AO/F50, ácido oleico y extracto de jugo a 50 μ g/mL; AO/F100 ácido oleico y extracto de jugo a 100 μ g/mL; AO/F200 ácido oleico y extracto de jugo a 200 μ g/mL.

Como se observa en la Figura 1, tanto el extracto de jugo de *P. edulis* como el extracto etanólico de hojas, reducen significativamente la acumulación de lípidos en las células HepG2. El extracto etanólico de hojas, presentó el mayor efecto inhibitorio frente a la acumulación de lípidos en este ensayo, su mayor efecto se produjo en el tratamiento a una concentración de extracto de 200 μ g/mL, el cual disminuyó en 2 veces al valor del control con respecto a las células expuestas solo al ácido oleico (Figura 1B), lo que se traduce en un porcentaje de inhibición del 51,2 %; sin embargo, el

tratamiento a la menor concentración de extracto (50 µg/mL), también mostró una reducción significativa de la acumulación de lípidos, con un porcentaje de inhibición del 25.8 %.

En cuanto al efecto causado por el extracto del jugo de *P. edulis*, se encontró que el mayor efecto fue observado en el tratamiento a una concentración de 100 µg/mL, generando una reducción 1,9 veces el valor del control con relación al tratamiento de estimulación de acumulación de lípidos con ácido oleico, esta reducción expresada en porcentaje corresponde a una inhibición del 47,9 % (Figura 1A); mientras que el menor efecto, fue observado para el tratamiento a 50 µg/mL, con un porcentaje de inhibición de 22,5 %, no obstante, es importante notar que todos los tratamientos evaluados presentaron inhibiciones de acumulación de lípidos estadísticamente significativas, con respecto al tratamiento con solo ácido oleico.

Estas diferencias, también se observan en las fotografías obtenidas luego de la tinción con Oil Red, como se muestra en la Figura 2, observando que la tinción al interior de las células tratadas se reduce a medida que se aumenta la concentración para ambos extractos, es decir, se observa un efecto inhibitorio de la acumulación de lípidos de forma dosis-dependiente.



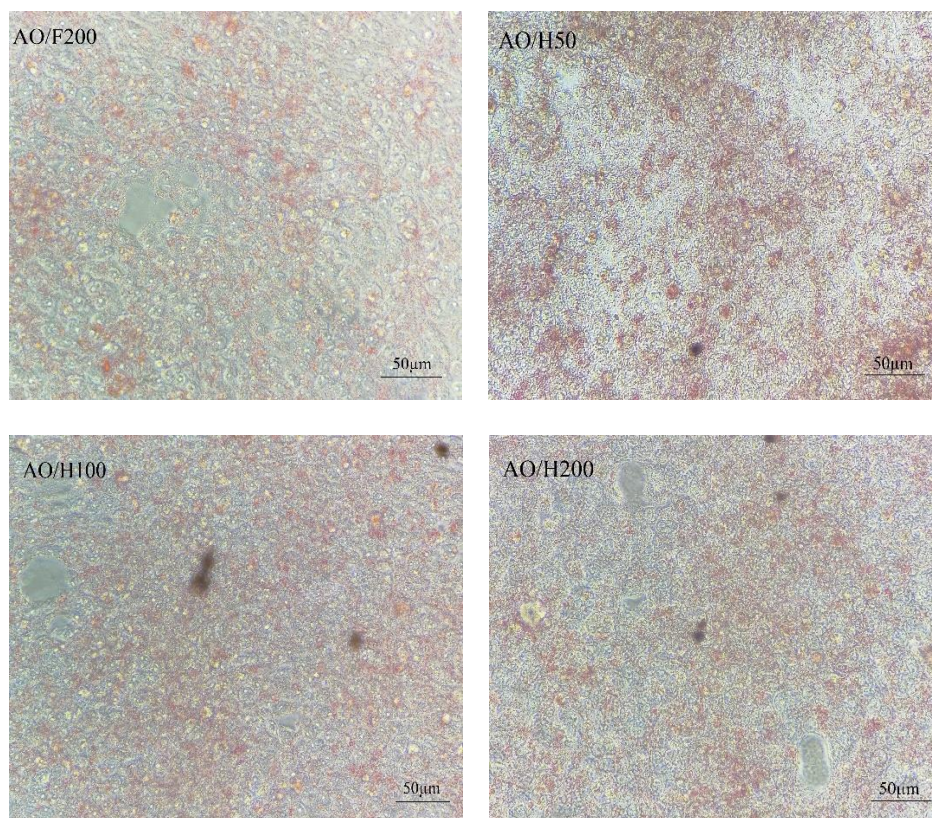


Figura 2. Fotografías de las células HepG2 (40X) tratadas con extractos de *P. edulis* y teñidas con Oil Red. AO, ácido oleico (100 µM); AO/F50 ácido oleico y extracto de jugo a 50 µg/mL; AO/F100 ácido oleico y extracto de jugo a 100 µg/mL; AO/F200 ácido oleico y extracto de jugo a 200 µg/mL; AO/H50 ácido oleico y extracto de hojas a 50 µg/mL; AO/H100 ácido oleico y extracto de Hojas a 100 µg/mL; AO/H200 ácido oleico y extracto de hojas a 200 µg/mL.

Evaluación cuantitativa de los lípidos

En cuanto a las concentraciones de lípidos evaluados cuantitativamente, por el ensayo enzimático de Human Liquicolor®, se observó consistencia con lo observado en el ensayo de Oil Red. En los tratamientos con el extracto de jugo de *P. edulis* se encontró que hay un efecto dosis dependiente, en cuanto a la reducción de los triglicéridos intracelulares (Figura 3A.). En el ensayo a 24 horas de incubación con el extracto de jugo, se observa un aumento estadísticamente significativo de la concentración de triglicéridos en las células tratadas con ácido oleico con respecto a concentración de las células control; mientras que para los tratamientos, se observó una reducción estadísticamente significativa de la concentración de triglicéridos en las células tratadas con el extracto de jugo en relación a la concentración de triglicéridos de las células estimuladas solo con ácido oleico ($p =$

0,003). A las 24 horas de tratamiento, no se evidenciaron diferencias entre las concentraciones de triglicéridos de las células control y los tratamientos, así mismo, entre las concentraciones de las células control y las células con solo extracto de jugo, no obstante, se observó que en las células expuestas solo a jugo presentaron una reducción con relación a la concentración de triglicéridos de las células control (Figura 3A.).

En el ensayo a 48 horas de incubación, se hace más evidente el aumento de la concentración de triglicéridos en las células tratadas con ácido oleico con respecto a concentración de las células control ($p = 0,001$); mientras que para los tratamientos, aunque se observa una reducción de la concentración de triglicéridos en las células tratadas con el extracto con respecto a la concentración de triglicéridos de las células estimuladas solo con ácido oleico, esta reducción no fue significativa ($p > 0,05$). Del mismo modo, se evidenciaron diferencias significativas en la concentración de triglicéridos en las células control y los tratamientos, indicando que, el efecto protector o inhibitorio de la acumulación de la síntesis de triglicéridos a este periodo de tiempo no es tan fuerte (Figura 3A.). Finalmente, es importante notar que el porcentaje de inhibición de los triglicéridos al interior de las células por parte del extracto de jugo de *P. edulis* a las 24 horas de periodo de incubación, en promedio fue del 76,9 % y a las 48 horas fue de 34,0 %, lo que implica que el efecto del extracto, aunque perdura en el tiempo no lo hace en la misma proporción.

Por otra parte, al evaluar las concentraciones de los triglicéridos extracelulares o liberados al medio de cultivo, de las células HepG2 tratadas con el extracto de jugo de *P. edulis* no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos (Figura 3B.). En el ensayo a 24 horas; se observa que las concentraciones de los triglicéridos liberados por las células estimuladas con ácido oleico y los demás tratamientos son menores con respecto a las concentraciones de triglicéridos de las células control, aunque esta reducción no es estadísticamente significativa; del mismo modo, se observa una disminución de estas concentraciones, en las células expuestas solo al extracto de jugo, pasando de un promedio de 8,8 a 3,78 μg de triglicérido/mg de proteína, para las células control y tratadas con extracto de fruto a 200 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, lo que implicó una reducción del 58 %.

En el ensayo a 48 horas de incubación, se presentó un comportamiento contrario a lo observado en los triglicéridos intracelulares, pues en este caso, hubo una reducción de los niveles de triglicéridos, comparados con los niveles observados a 24 horas, en todos los tratamientos (Figura 3B.). Además, las concentraciones de triglicéridos de las células control son similares a las observadas en los demás tratamientos.

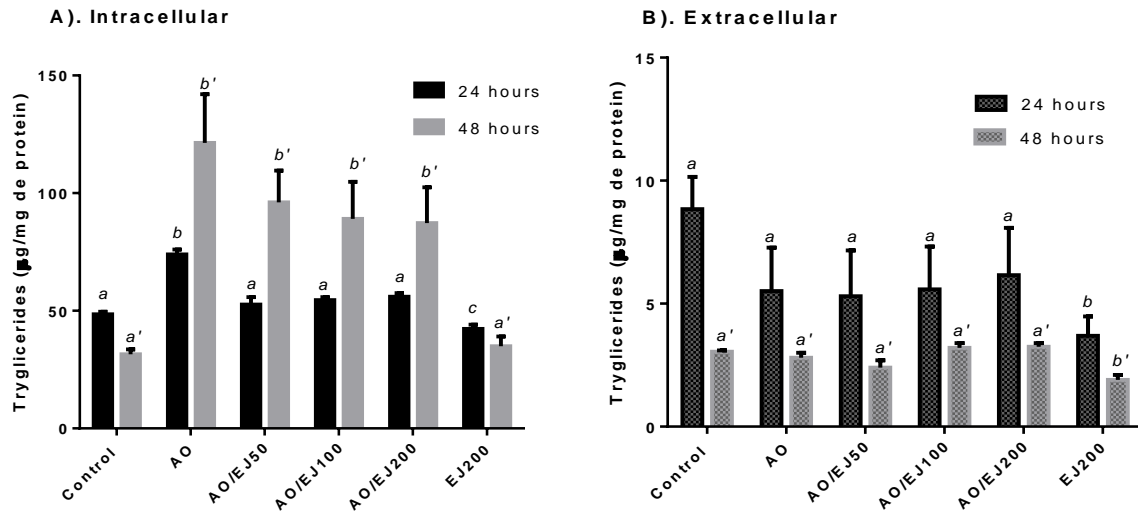


Figura 3. Concentración de triglicéridos en células HepG2 tratadas con extracto de jugo de *P. edulis*. Los datos presentados corresponden a las medias \pm la desviación estándar de tres muestras para cada grupo. * $p < 0,05$ con relación al ácido oleico. **A).** Concentración de triglicéridos intracelulares, **B).** Concentración de triglicéridos extracelulares. Control; células sin tratamiento; AO, ácido oleico (100 μM); AO/F50, ácido oleico y extracto de jugo a 50 $\mu\text{g/mL}$; AO/F100 ácido oleico y extracto de jugo a 100 $\mu\text{g/mL}$; AO/F200 ácido oleico y extracto de jugo a 200 $\mu\text{g/mL}$; F200 extracto de jugo a 200 $\mu\text{g/mL}$.

En la Figura 4. se observan las concentraciones de colesterol intracelular (Figura 4A.) y colesterol extracelular (Figura 4B.) de las células HepG2 tratadas con el extracto de jugo de *P. edulis*. En el tratamiento a un periodo de 24 horas, las concentraciones de colesterol de las células estimuladas con ácido oleico aumentaron considerablemente, y a medida que aumentaba la concentración del extracto, los niveles de colesterol disminuían (Figura 4A.); de hecho, la reducción causada por el extracto con respecto al tratamiento de ácido oleico fue de un 65 %, sin embargo, esta reducción no fue estadísticamente significativa debido a la alta variabilidad en los valores de los resultados, a pesar que presentaran la misma tendencia. Pero, se destaca el hecho, que el tratamiento con extracto a 100 $\mu\text{g/mL}$ presentó una concentración promedio de colesterol de 37,02 $\mu\text{g/mg}$ de proteína, mientras que la concentración en las células control fue en promedio de 34,7 $\mu\text{g/mg}$ de proteína, lo que indica el efecto inhibitorio de la síntesis de colesterol si se compara con las concentraciones de las células estimuladas con ácido oleico, que presentaron un promedio de 46,35 $\mu\text{g/mg}$ de proteína. Para el periodo de incubación a 48 horas, el comportamiento de las concentraciones fue similar al periodo de 24 horas, es decir, el extracto presentó una reducción en la formación de colesterol por parte de las células tratadas, no obstante, el efecto ya no fue tan marcado puesto que en promedio la reducción fue de un 26,5 %.

En las concentraciones de colesterol extracelular se observa que se aumentaron significativamente ($p = 0,001$) los niveles de colesterol del periodo de incubación de 24 horas al periodo de 48 horas (Figura 4B.). A las 24 horas se encontró que las células control liberan una mayor cantidad de colesterol al medio comparadas con los demás tratamientos, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa. Por otra parte, a 48 horas, los niveles de colesterol en las células control son mayores a los observados en las células estimuladas con ácido oleico, y así mismo, se nota que a medida que aumenta la concentración del extracto, aumentan los niveles de colesterol comparados con los valores del tratamiento con ácido oleico, siendo el tratamiento a 200 $\mu\text{g/mL}$, el que más se acerca a los niveles de colesterol liberados al medio de las células control (Figura 4B.). Sin embargo, estas diferencias entre los niveles de colesterol liberados por parte de los tratamientos con extracto y con ácido oleico, no presentan diferencias estadísticamente significativas, probablemente debido a la alta variabilidad de los valores.

Se podría señalar entonces que el extracto de jugo de *P. edulis* reduce la producción tanto de colesterol como triglicéridos en las células HepG2 estimuladas con ácido oleico.

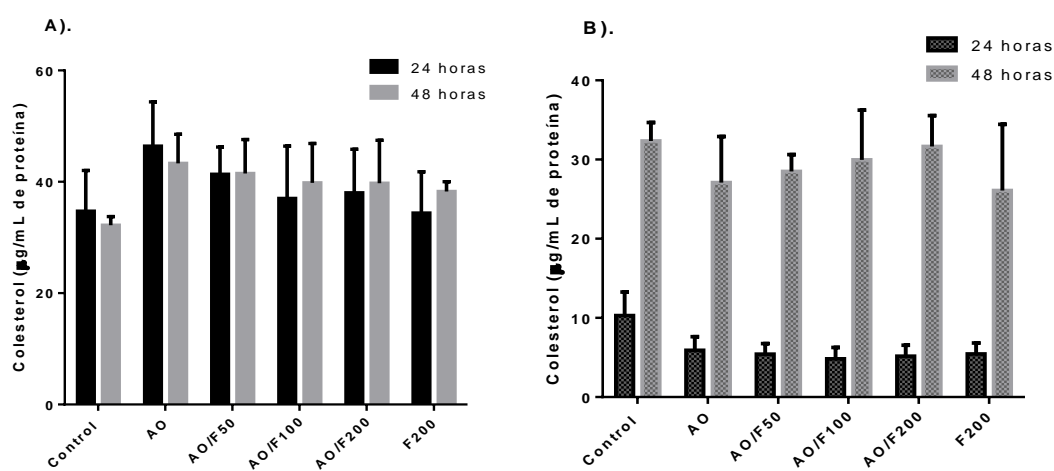


Figura 4. Concentración de colesterol en células HepG2 tratadas con extracto de jugo de *P. edulis*. Los datos presentados corresponden a las medias \pm la desviación estándar de tres muestras para cada grupo. **A).** Concentración de colesterol intracelular, **B).** Concentración de colesterol extracelular. Control; células sin tratamiento; AO, ácido oleico (100 μM); AO/F50, ácido oleico y extracto de jugo a 50 $\mu\text{g/mL}$; AO/F100 ácido oleico y extracto de jugo a 100 $\mu\text{g/mL}$; AO/F200 ácido oleico y extracto de jugo a 200 $\mu\text{g/mL}$; F200 extracto de jugo a 200 $\mu\text{g/mL}$.

La Figura 5A muestra la concentración de los triglicéridos intracelulares, de las células expuestas al extracto de hojas de *P. edulis*, donde se puede observar que a 24 horas de tratamiento, no se evidencia un efecto de reducción del extracto sobre la concentración de lípidos, por el contrario se observa un aumento de la concentración de los triglicéridos en las células tratadas con el extracto, incluso superior a la concentración de triglicéridos de las células estimuladas con ácido oleico; sin embargo, ninguna de estas diferencias presentan valores estadísticamente significativos. En el ensayo a 48 horas de incubación con el extracto de hojas, se observó una diferencia significativa entre las concentraciones de triglicéridos de las células control (13,6 μg de triglicéridos/mg de proteína) y las concentraciones de las células estimuladas con ácido oleico (46,1 μg de triglicéridos/mg de proteína), contrario a lo observado a las 24 horas, los niveles de triglicéridos disminuyeron al aumentar la concentración del extracto de hojas (Figura 5A.), sin ser una reducción significativa, el extracto de hojas a una concentración de tratamiento de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ alcanzó una disminución de un 40 % comparado con las células estimuladas con ácido oleico. Así mismo, se observa que no hay diferencias notorias entre las concentraciones de triglicéridos entre los dos periodos de tiempo evaluados.

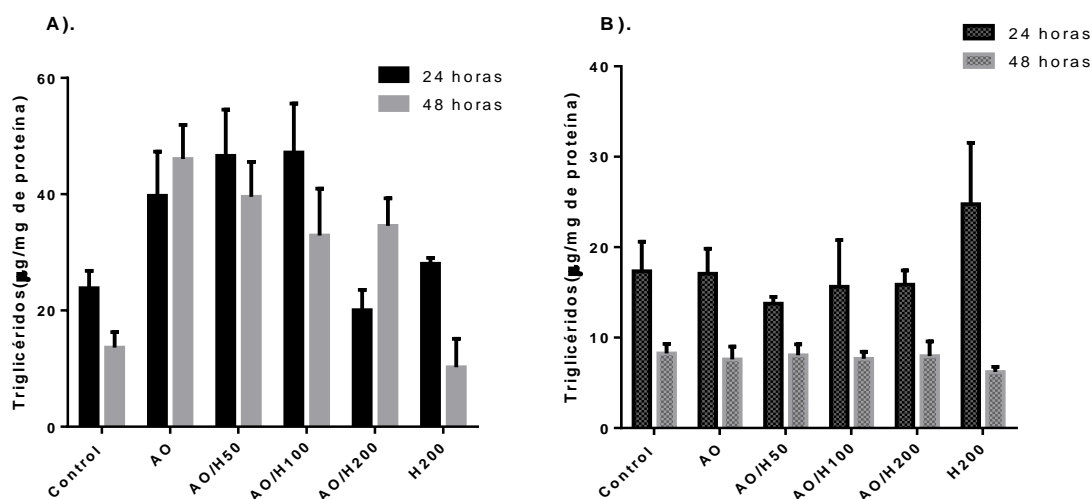


Figura 5. Concentración de triglicéridos en células HepG2 tratadas con extracto de hojas de *P. edulis*. Los datos representan las medias \pm la desviación estándar de tres muestras para cada grupo. **A).** Concentración de triglicéridos intracelulares, **B).** Concentración de triglicéridos extracelulares. Control; células sin tratamiento; AO, ácido oleico (100 μM); AO/F50, ácido oleico y extracto de hojas a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; AO/F100 ácido oleico y extracto de hojas a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; AO/F200 ácido oleico y extracto de hojas a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. H200 extracto de hojas a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Para las concentraciones de los triglicéridos extracelulares de las células tratadas con el extracto de hojas de *P. edulis* no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos para los periodos evaluados (Figura 5B.). En el ensayo a 24 horas; se observa que las concentraciones de los triglicéridos liberados por las células control, las células estimuladas con ácido oleico y los demás tratamientos son similares. En el ensayo a 48 horas de incubación, se presentó un comportamiento similar, es decir, no se observaron diferencias en las concentraciones de las células control y los demás tratamientos. Al comparar los niveles de triglicéridos en los periodos de tiempo evaluados, se destaca un aumento significativo en la concentración de triglicéridos extracelulares, del periodo de 24 horas al periodo de 48 horas, de los tratamientos de las células con ácido oleico ($p = 0,032$) y de las células con solo extracto de hojas ($p = 0,001$) (Figura 5B).

En el caso del colesterol, no se evidencia un efecto del extracto de hojas de *P. edulis* sobre la concentración de colesterol intracelular (Figura 6A.) o el colesterol extracelular (Figura 6B.). Las células HepG2 evaluadas a un periodo de tiempo de 24 horas, mostraron que las concentraciones de colesterol intracelular de las células estimuladas con ácido oleico y de los tratamientos con el extracto de hojas, son menores a la concentración de colesterol de las células control ($p > 0,05$). La misma situación se presentó cuando fueron evaluadas a un periodo de 48 horas, aunque con una mayor variabilidad y sin presentar una tendencia asociada a la concentración del extracto (Figura 6A.).

En el colesterol extracelular se observa un comportamiento variable independiente del tratamiento. En el caso del periodo de 24 horas se encontró que las células control liberan una mayor cantidad de colesterol al medio comparadas con los demás tratamientos, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa. Así mismo, en el periodo de tratamiento de 48 horas, los niveles de colesterol en las células control son mayores a los observados en los demás tratamientos (Figura 6B.). Se observa también, que los niveles de colesterol extracelular de las células se reducen a las 48 horas comparados con los valores observados a las 24 horas, excepto para el tratamiento de ácido oleico mezclado con extracto de hojas a $50 \mu\text{g/mL}$; de hecho, la reducción es estadísticamente significativa para las células control, AO, AO/H100 y H200.

En base a los resultados observados para el extracto de hojas de *P. edulis*, se podría indicar que no tiene un efecto significativo para regular el metabolismo del colesterol o los triglicéridos en las células HepG2 estimuladas por ácido oleico.

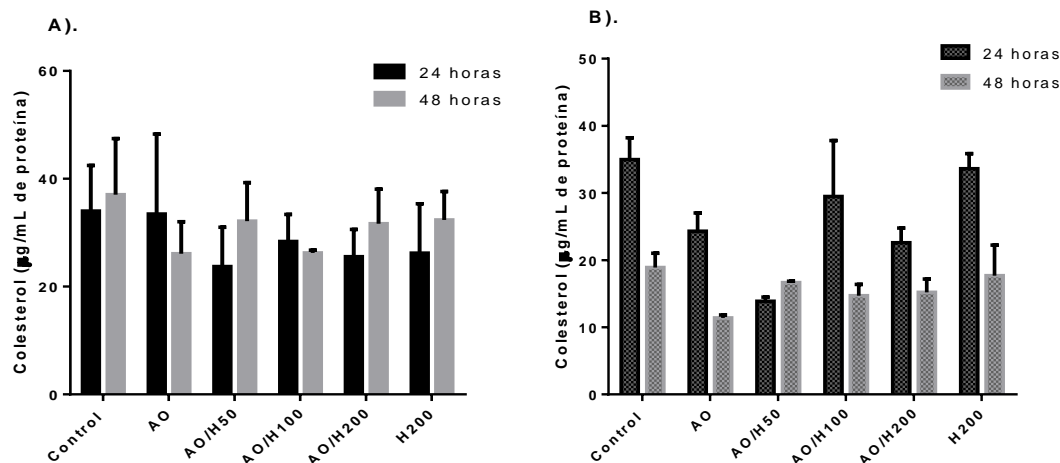


Figura 6. Concentración de colesterol en células HepG2 tratadas con extracto de hojas de *P. edulis*. Los datos representan las medias \pm la desviación estándar de tres muestras para cada grupo. **A).** Concentración de colesterol intracelular, **B).** Concentración de colesterol extracelular. Control; células sin tratamiento; AO, ácido oleico (100 μ M); AO/F50, ácido oleico y extracto de hojas a 50 μ g/mL; AO/F100 ácido oleico y extracto de hojas a 100 μ g/mL; AO/F200 ácido oleico y extracto de hojas a 200 μ g/mL. H200 extracto de hojas a 200 μ g/mL.

DISCUSIÓN

Para reducir los niveles plasmáticos de los lípidos, se han producido una amplia variedad de medicamentos, los cuales deben administrarse indefinidamente y además generan efectos secundarios como alteraciones gastrointestinales, dolores musculares, miopatías (20,21), debido a esto, las investigaciones apuntan a buscar mejores terapias y con reducidos efectos secundarios, en respuesta a ello, una estrategia muy utilizada ha sido el uso de la medicina tradicional, debido a varias razones, entre las que se destacan: menores efectos secundarios, efectos sinérgicos por la presencia de diversos metabolitos con actividad biológica contra enfermedades de importancia en salud pública como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares o neurodegenerativas (22).

Las plantas del género *Passiflora*, son conocidas por contener una amplia gama de componentes bioactivos de importancia terapéutica contra una extendida variedad de enfermedades (23), por ejemplo, los extractos de las hojas de *P. edulis* mejoran la integridad intestinal (24), las hojas de *P. alata* poseen efectos antiinflamatorios (25), las semillas de *P. edulis* muestran una fuerte actividad antidiabética (26), las hojas y jugo de *P. edulis* tienen actividad anticancerígena (27–29); como

vemos, esta planta además de presentar una muy variada aplicación a nivel culinario, también posee un vasto potencial para su aplicación en la biomedicina.

En este contexto, en *P. edulis* comúnmente llamada maracuyá o parchita, se ha evidenciado que posee efectos sobre la regulación de los lípidos en humanos (14,16,17) y mejora la resistencia a la insulina (30); en esta investigación se observó que el extracto de jugo de *P. edulis* tiene la capacidad de reducir significativamente la producción de colesterol y triglicéridos en un modelo celular estimulado a la acumulación de lípidos con el ácido oleico, de esta forma se evidencia un efecto protector sobre las células hepáticas. Estos resultados son congruentes con lo reportado para otra especie del género *Passiflora*, en donde evaluaron los niveles de colesterol y triglicéridos en ratones a los cuales se les suministró una dosis de extracto de hojas de *P. suberosa* (31) reportando una reducción en los valores de 17 % y 12 % para colesterol y triglicéridos, respectivamente, comparados con el grupo control; en nuestro estudio, con el extracto de jugo de *P. edulis* el efecto en la reducción fue en promedio de 65,1 % y 76,9 %, para el colesterol y los triglicéridos, aunque es importante señalar que la diferencia puede deberse a que los procesos de digestión y absorción en el modelo animal, reducen la cantidad de extracto que llegará al hígado.

Algunos de los efectos que presentan los extractos de *P. edulis* en la reducción del colesterol y triglicéridos en modelos animales y en el hombre son atribuidos a su contenido de fibra dietaria y a su alta capacidad antioxidante de la mayoría de sus componentes bioactivos (31). Dentro de los compuestos que nuestro grupo de investigación ha reportado para los extractos evaluados podemos mencionar: ácido ascórbico, ácido ρ -cumárico, quercetina, kaempferol, xilosa, manosa, estaquiosa, rafinosa, verbascosa; de los cuales algunos han sido reportados que tienen la capacidad de afectar la síntesis de lípidos como lo observado con el ácido ascórbico en un ensayo con ratones (32) donde reportan que este compuesto reduce significativamente la acumulación de grasa en los hepatocitos, además reduce el peso corporal, la acumulación de grasa subcutánea y la adipogénesis. También el kaempferol en un ensayo con adipocitos humanos, redujo significativamente la acumulación de triglicéridos al interior de estas células (33). Otro de los componentes bioactivos de los extractos de *P. edulis* es la quercetina, fitoquímico con efecto anti-obesidad demostrado (34), como se señala en el estudio con ratas con una alimentación alta en contenido graso, en el cual observaron que la quercetina reduce la acumulación lipídica, disminuye el peso corporal y la grasa total de los animales, aumenta la excreción de los lípidos en las heces, todo esto debido a que modula genes importantes en el metabolismo lipídico como lo son el gen de la HMGR (hidroxi metil glutaril CoA reductasa), el ACC (acetil CoA carboxilasa), la FAS (ácido graso sintetasa), el promotor SREBP-1 (proteína de unión a elementos reguladores de esteroides, tipo 1) y el PPAR γ (receptor activador de proliferación de

perixosomas). En cuanto a los componentes de tipo sacárido, también existen reportes que indican que algunos de ellos tienen la capacidad de regular el metabolismo tanto del colesterol como de los triglicéridos, tal es el caso de la xilosa (presente en los extractos de *P. edulis*), la cual fue evaluada en ratones con una dieta alta en grasa (35), encontrando que este monosacárido reduce significativamente las concentraciones de colesterol y colesterol LDL, así mismo, tiene la capacidad de reducir la expresión del gen FAS, el cual es clave en la biosíntesis del colesterol

Se ha demostrado que el incremento de la acumulación lipídica en las células HepG2 promovida por la presencia del ácido oleico, desencadena la generación de altos niveles de radicales libres de oxígeno comparados con los valores de los controles (36), debido a la alta tasa de peroxidación lipídica que generalmente se asocia con daños a nivel celular que pueden llegar a implicar alteraciones en los controles de la división celular, llevando consigo a la célula a condiciones cancerígenas, como la cirrosis. Hemos demostrado que tanto los extractos de hojas como los de jugo de *P. edulis* poseen una actividad antioxidante significativa, evaluada por diferentes métodos (28); lo que implica que además de los efectos de la reducción sobre la acumulación de lípidos, los extractos de *P. edulis* pueden proteger a los hepatocitos sanos de convertirse en células cancerígenas, como lo hemos demostrado en anteriores estudios, en los cuales reportamos que los extractos de hojas como de jugo de *P. edulis* tienen efectos anticancerígenos, ya sea porque reducen la viabilidad celular (29,37), o porque conducen a la célula a procesos apoptóticos (27).

Un hecho a tener en cuenta de este estudio, fue que el extracto de jugo presentó efecto sobre la reducción o inhibición tanto de colesterol como de triglicéridos, situación que desde el punto de vista práctico tiene varias ventajas; primero porque ya demostramos que los componentes bioactivos presentes en este extracto tienen una buena bioaccesibilidad, es más, durante el proceso digestivo, algunos de los componentes como el kaempferol, al ácido gálico o el ácido clorogénico aumentan su concentración durante el paso por el intestino y su posterior absorción (38); y segundo porque la obtención del extracto es bastante simple, solo implica un proceso de colación del contenido del fruto. Estas ventajas son importantes al momento de pensar en el extracto de maracuyá o *P. edulis* para el aprovechamiento de las personas en general, que buscan una terapia alterna o coadyuvante al tratamiento para la reducción de problemas de salud como lo son la obesidad, la esteatosis hepática y la aterosclerosis.

CONCLUSIÓN

En este estudio se demostró que el extracto de jugo de *P. edulis* posee componentes bioactivos con la capacidad de reducir la acumulación de lípidos al interior de las células hepáticas, HepG2, reduciendo la concentración tanto de colesterol como de triglicéridos; así mismo, se evidenció como se reporta en otros estudios, que el modelo celular HepG2 al ser estimulado con ácido oleico, aumenta la acumulación de lípidos, principalmente triglicéridos, llevando a las células a condiciones fisiológicas similares a la esteatosis hepáticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilón-Osma J, Loango-chamorro N, Landazuri P. Modelos celulares hepáticos para el estudio del metabolismo de los lípidos . Revisión de literatura. Rev la Fac Med Univ Nac. 2019; 67(1): 109–16.
2. Ferramosca A. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. World J Gastroenterol. 2014; 20(7): 1746. DOI:1007-9327/full/v20/i7/1746.htm
3. Fujita Y. Impact of a high-fat diet on bone health during growth. Pediatr Dent J. 2017; 28(1): 1–6. DOI: 10.1016/j.pdj.2017.11.003
4. Perona JS. Membrane lipid alterations in the metabolic syndrome and the role of dietary oils. BBA - Biomembr. 2017; 1859(9): 1690–703. DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.04.015
5. Julibert A, Bibiloni M, Tur JA. Dietary fat intake and metabolic syndrome in adults : A systematic review. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2019; 29(9): 887–905. DOI: 10.1016/j.numecd.2019.05.055
6. Rutigliano I, Vinci R, De Filippo G, Mancini M, Stoppino L, D'Apollito M, et al. Metabolic syndrome , hepatic steatosis , and cardiovascular risk in children. Nutrition. 2017; 36: 1–7. DOI: 10.1016/j.nut.2016.10.017
7. Deboer MD, Filipp SL, Gurka MJ. Associations of a metabolic syndrome severity score with coronary heart disease and diabetes in fasting vs . non-fasting individuals. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2020; 30(1): 92–8. DOI: 10.1016/j.numecd.2019.08.010
8. Bitzur R, Brenner R, Maor E, Antebi M, Ziv-baran T, Segev S, et al. Metabolic syndrome , obesity , and the risk of cancer development. Eur J Intern Med. 2016; 34: 89–93. DOI: 10.1016/j.ejim.2016.08.019
9. Toppo E, Darvin SS, Esakkimuthu S, Stalin A, Balakrishna K, Sivasankaran K, et al. Chemico-Biological Interactions Antihyperlipidemic and hepatoprotective effects of Gardenin A in cellular and high fat diet fed rodent models. Chem Biol Interact. 2017; 269: 9–17. DOI: 10.1016/j.cbi.2017.03.013
10. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. Metabolism. 2019; 92: 82–97. DOI: 10.1016/j.metabol.2018.11.014
11. Deng J, Zhou Y, Bai M, Li H, Li L. Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f . *flavicarpa*. 2010; 128: 148–53.
12. Li H, Zhou P, Yang Q, Shen Y, Deng J, Li L, et al. Comparative studies on anxiolytic activities and

- flavonoid compositions of *Passiflora edulis* “edulis” and *Passiflora edulis* “flavicarpa.” *J Ethnopharmacol.* 2011; 133(3): 1085–90.
13. Restrepo RA, Loango N, Moncada M V, Landazuri P. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* and *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss. *Br J Pharm Res.* 2013; 3(4): 776–85.
 14. Miranda GS, Rennó LN, Machado BB, Silva JL, Pinto R, Oliveira R. Efeito do consumo da aveia e farinha da casca de maracujá sobre a glicemia e lipemia em um grupo de voluntários. *J basic Appl Pharm sciences.* 2014; 35(2): 245–50.
 15. Soares S, Barbalho SM, Vieira M, Rudge C, Campos KE De, Carolina A, et al. Effects of *Passiflora edulis* (Yellow Passion) on Serum Lipids and Oxidative Stress Status of Wistar Rats. *J Med Food.* 2012; 15(1): 78–82.
 16. Santos Madeiros J, Melo M, Ubirajara A, Barbosa M. Avaliação das atividades hipoglicemiantes e hipolipemiantes da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*). *RBAC.* 2009; 41(2): 99–101.
 17. do Socorro Fernandes Marques S, Libonati RMF, Sabaa-Srur AUO, Luo R, Shejwalkar P, Hara K, et al. Evaluation of the effects of passion fruit peel flour (*Passiflora edulis* fo. *flavicarpa*) on metabolic changes in HIV patients with lipodystrophy syndrome secondary to antiretroviral therapy. *Rev Bras Farmacogn.* 2016; 1–7. DOI: 10.1016/j.bjp.2016.03.002
 18. Wu CH, Chen SC, Ou TT, Chyau CC, Chang YC, Wang CJ. Mulberry leaf polyphenol extracts reduced hepatic lipid accumulation involving regulation of adenosine monophosphate activated protein kinase and lipogenic enzymes. *J Funct Foods.* 2013; 5(4): 1620–32.
 19. Bling EG, Dyer WJ. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959; 37.
 20. Berent T, Berent R, Steiner S, Sinzinger H. Statin-induced muscular side effects at rest and exercise - An anatomical mapping. *Atheroscler Suppl.* 2019; 40: 73–8. DOI: 10.1016/j.atherosclerosissup.2019.08.026
 21. Jacobson TA, Cheeley MK, Jones PH, Xiang P, Forge R La, Maki KC, et al. The STatin Adverse Treatment Experience Survey : Experience of patients reporting side effects of statin therapy. *J Clin Invest.* 2019; 415–24.
 22. Sen T, Samanta SK. Medicinal Plants , Human Health and Biodiversity : A Broad Review. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2014;
 23. Dhawan K, Dhawan S, Sharma A. *Passiflora*: A review update. *J Ethnopharmacol.* 2004; 94(1): 1–23.
 24. Lopes MC, Mateus I, Ramos A, Maróstica MR, Alves J. Passion fruit (*Passiflora edulis*) leaf aqueous extract ameliorates intestinal epithelial barrier dysfunction and reverts in inflammatory parameters in Caco- 2 cells monolayer. *Food Res Int.* 2020; 133: 109- 162. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109162
 25. Figueiredo D, Cristina T, Simon N, Schumacher G, Stivanin-silva LG, Baú C, et al. Aqueous leaf extract of *Passiflora alata* Curtis promotes antioxidant and anti-inflammatory effects and consequently preservation of NOD mice beta cells (non-obese diabetic). *Int Immunopharmacol.* 2016; 35: 127–36. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.03.031
 26. Kandandapani S, Balaraman AK, Ahamed HN. Extracts of passion fruit peel and seed of *Passiflora*

- edulis (Passifloraceae) attenuate oxidative stress in diabetic rats. *Chin J Nat Med.* 2015; 13(9): 680–6. DOI: 10.1016/S1875-5364(15)30066-2
27. Aguilón J, Arango SS, Uribe DF, Loango N. Cytotoxic and apoptotic activity of extracts from leaves and juice of *passiflora edulis*. *J Liver Res Disord Ther.* 2018; 4(2): 67–71.
 28. Aguilón J, Maldonado ME, Loango Chamorro N, Arango SAV. Antioxidant and antiproliferative activity of ethanolic and aqueous extracts from leaves and fruits juice. *Perspect En Nutr Humana.* 2013; 15: 13–25.
 29. Ramírez V, Arango SS, Uribe D, Maldonado ME, Aguilón J. Effect of the Ethanolic Extract of *Passiflora edulis* F. *Flavicarpa* Leaves on Viability , Cytotoxicity and Apoptosis of Colon Cancer Cell Lines. *J Chem Pharm Res.* 2017; 9(6): 135–9.
 30. Goss MJ, Nunes MLO, Machado ID, Merlin L, Macedo NB, Silva AMO, et al. Peel flour of *Passiflora edulis* Var. *Flavicarpa* supplementation prevents the insulin resistance and hepatic steatosis induced by low-fructose-diet in young rats. *Biomed Pharmacother.* 2018; 102: 848–54. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.03.137
 31. Sudasinghe HP, Peiris DC. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of aqueous leaf extract of *Passiflora suberosa* L. *PeerJ.* 2018; 6:e4389.
 32. Kim B, Choi KM, Yim HS, Park HT, Yim JH, Lee M-G. Adipogenic and Lipolytic Effects of Ascorbic Acid in Ovariectomized Rats. *Yonsei Med J.* 2018; 59(1): 85. DOI: 10.3349/ymj.2018.59.1.85
 33. Gómez S, Lasa A, Abendaño N, Quintela AF, Solís AM, Pilar M, et al. Phenolic compounds apigenin , hesperidin and kaempferol reduce in vitro lipid accumulation in human adipocytes. *J Transl Med.* 2017; 1–10.
 34. Ting Y, Chang W, Shiao D, Chou P, Wu M, Hsu C. Antiobesity Efficacy of Quercetin-Rich Supplement on Diet-Induced Obese Rats : Effects on Body Composition , Serum Lipid Profile, and Gene Expression. 2017.
 35. Lim E, Ye J, Shin J, Reum P, Jung S, Yoo S, et al. D -Xylose suppresses adipogenesis and regulates lipid metabolism genes in high-fat diet – induced obese mice. *Nutr Res.* 2015; 35(7): 626–36. DOI: 10.1016/j.nutres.2015.05.012
 36. Cui W, Chen SL, Hu KQ. Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. *Am J Transl Res.* 2010; 2(1): 95–104.
 37. Arango S, Ramírez V, Maldonado ME, Uribe D, Aguilón J. Cytotoxic and Apoptotic Activities of the Aqueous Fruit Extract of *Passiflora edulis* Sims var *flavicarpa* in an In vitro Model of Human Colon Cancer . 2017.
 38. Aguilón-Osma J, Luzardo-Ocampo I, Cuellar-Núñez ML, Maldonado-Celis ME, Loango-Chamorro N, Campos-Vega R. Impact of in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility and antioxidant capacity of bioactive compounds from Passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves and juice extracts. *J Food Biochem.* 2019 6; e12879. DOI: abs/10.1111/jfbc.12879

CAPITULO VIII

CONCLUSIONES GENERALES

Como conclusión general de la investigación podemos señalar que ambos extractos evaluados poseen compuestos bioactivos de importancia biomédica, como la quecetina, el kaempferol, el ácido ascórbico entre otros. Del mismo modo, presentan una bioaccesibilidad considerable para los componentes de tipo fenólico y el ácido ascórbico; siendo el extracto etanólico de hojas de *P. edulis* el que poseen un mayor contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, así mismo, es este extracto el que presenta una mayor actividad antioxidante.

Por otra parte, es el extracto de jugo de maracuyá, el que presenta un mayor efecto proapoptótico frente a este modelo celular y una mayor inhibición de la actividad de la enzima α -glucosidasa, reduciendo la absorción de glucosa y con ello la necesidad de insulina, que indirectamente evita que el hígado disponga de un exceso de carbohidratos que puedan contribuir a la síntesis de lípidos o que se reduzca la resistencia a la insulina, proceso metabólico que también estimula a los hepatocitos a la biosíntesis de lípidos. Del mismo modo, es este extracto, el que evidenció una mayor inhibición de la acumulación de lípidos en el modelo celular HepG2, específicamente triglicéridos, reduciendo el riesgo de afectación de los hepatocitos por toxicidad debido a los residuos cetónicos y obviamente, esta reducción en la acumulación de lípidos en las células hepáticas está directamente relacionada con la reducción de triglicéridos plasmáticos.

Estos resultados proyectan al extracto de jugo de *Passiflora edulis* como un alimento funcional, promisorio, para que, a través de estudios más amplios, se pueda consolidar su beneficio en la regulación positiva del metabolismo lipídico y la glicemia.

RECOMENDACIONES

Al finalizar un proceso de investigación son más los nuevos cuestionamientos que se generan que las respuestas que se producen, es por ello que se recomienda lo siguiente:

- Realizar un fraccionamiento del extracto de jugo de *Passiflora edulis* y evaluar de nuevo los efectos de estos compuestos aislados sobre las células HepG2 estimuladas con ácido oleico, para determinar si el efecto hipolipemiante observado en esta investigación se debe a un compuesto en particular o a la acción sinérgica de los compuestos presentes en el extracto crudo.
- Evaluar el efecto hipolipemiante del extracto de jugo de *Passiflora edulis* en un modelo celular de adipocitos, para determinar si los componentes bioactivos de este, también tienen la capacidad de regular la acumulación de triglicéridos en el tejido adiposo como principal reservorio de estos lípidos.
- Evaluar este extracto a una mayor concentración en un modelo celular animal con una dieta cetogénica evaluando no solamente lo que sucede a nivel de las concentraciones de colesterol y triglicéridos en plasma, sino también las concentraciones de glucosa en sangre, así como una evaluación histológica del tejido hepático de los animales.
- Evaluar el efecto de los extractos en el modelo, sobre la expresión de los factores de transcripción PPAR α (Receptor activador de la proliferación del peroxisoma) y SREBP-1 (Proteína de unión a elementos reguladores de esteroides tipo 1), buscando elucidar el efecto molecular.
- Utilizar hepatocitos primarios para evaluar la modulación del metabolismo lipídico por los extractos de *Passiflora edulis*, sin ser estimulados por ácidos grasos.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado tutoría de estudiante de Maestría (IV semestre).



LA DIRECTORA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD DEL QUINDIO

HACE CONSTAR:

Que el Magister JOHANNY AGUILLON OSMA identificado con cédula de ciudadanía No.94.287.028, es Tutor del trabajo de grado denominado: *"Efecto del extracto etanólico de hojas de maracuyá sobre los factores transcripcionales (SREBP-1 y PPARα) y su respuesta en los lípidos de las células HepG2"*, del estudiante Jhon Sebastián León Villareal de la Maestría en Ciencias Biomédicas.

La presente constancia se firma a los 28 días del mes de marzo de 2020.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Olga Alicia Nieto Cárdenas'.

Olga Alicia Nieto Cárdenas
MD, MPH, PhD
Coordinadora
Doctorado en Ciencias Biomédicas

Anexo 2. Certificado tutoría de estudiante de Maestría (IV semestre).



**LA DIRECTORA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
DE LA UNIVERSIDAD DEL QUÍNDIO**

HACE CONSTAR:

Que el Magister JOHANNY AGUILLON OSMA identificado con oédula de ciudadanía No.94.287.028, es Tutor del trabajo de grado denominado: "*Efecto del extracto etanólico de Passifloraedulis sobre enzimas del metabolismo de lípidos en células de adenocarcinoma colorrectal humano*", del estudiante Johan Alexander Villada de la Maestría en Ciencias Biomédicas.

La presente constancia se firma a los 28 días del mes de marzo de 2020.

Olga Alicia Nieto Cárdenas
MD, MPH, PhD
Coordinadora
Doctorado en Ciencias Biomédicas

Anexo 3. Certificado Tutor Pregrado: Licenciatura en biología y educación ambiental



UNIVERSIDAD
DEL GUAINÍO

2020-IO1066

11602

Armenia, 20 de abril de 2020

LA DIRECTORA DEL PROGRAMA DE LICENCIATURA EN CIENCIAS NATURALES Y EDUCACIÓN AMBIENTAL

HACE CONSTAR QUE:

Que el Doctor **Johanny Aguilón Osma**, identificado con cédula de ciudadanía N° 94.287.028, se desempeñó en el Programa de Licenciatura en Ciencias Naturales y Educación Ambiental, como Director de los siguientes Trabajos de Grado:

Título: Caracterización fitoquímica del extracto etanólico de hojas de *Passiflora edulis* y su efecto sobre la viabilidad en un modelo celular de cáncer hepático.

Estudiantes: Leidy Dahiana González Hernandez

Año: 2019

Título: Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de hojas y zumo de *Passiflora edulis* frente a tres microorganismos patógenos.

Estudiante: Luisa Fernanda Patiño

Año: 2019

Lo anterior a solicitud del interesado y para los fines pertinentes.

Atentamente,

Angela Maria Garzon Cardona

Director(a) Programa Licenciatura en Ciencias Naturales y Educacion Ambiental

Por una Universidad
PERTINENTE CREATIVA INTEGRADORA
Carrera 13 Calle 12 Sur 20 Tel. +57 (8) 3330000 Armenia - Quindío - Colombia

www.uniquindio.edu.co

Anexo 4. Otras publicaciones

4.1

Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2017, 9(6):135-139



Research Article

ISSN : 0975-7384
CODEN(USA) : JCPRC5

Effect of the Ethanolic Extract of *Passiflora edulis* F. *Flavicarpa* Leaves on Viability, Cytotoxicity and Apoptosis of Colon Cancer Cell Lines

V Ramírez¹, SS Arango^{1*}, D Uribe¹, ME Maldonado² and J Aguillón³

4.2

Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2017, 9(9):258-264



Review Article

ISSN : 0975-7384
CODEN(USA) : JCPRC5

Cytotoxic and Apoptotic Activities of the Aqueous Fruit Extract of *Passiflora edulis* Sims var *flavicarpa* in an *In vitro* Model of Human Colon Cancer

Sandra Arango^{1*}, Valentina Ramírez¹, Maria Elena Maldonado², Diego Uribe¹ and Johanny Aguillón³

4.3

Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 9(02), pp 064-071, February, 2019
Available online at <http://www.japsonline.com>
DOI: 10.7324/JAPS.2019.90209
ISSN 2231-3354



Biological activity of *Passiflora edulis* f. *Flavicarpa* ethanolic leaves extract on human colonic adenocarcinoma cells

Valentina Ramirez¹, Sandra Sulay Arango^{1*}, Maria Elena Maldonado², Diego Uribe¹, Johanny Aguillon³, Jenny Paola Quintero³, Nelsy Loango³

¹Biomedical Research and Innovation Group, Instituto Tecnológico Metropolitano, Medellín, Colombia.

²Research Group Impact of Food Components in Health, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

³Research Group in Biochemistry of Cardiovascular and Metabolic Diseases, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

Anexo 5. Participación en eventos internacionales

5.1

III Congreso Latinoamericano y I Congreso mundial de Passifloras	Inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina por las Fracciones del extracto de Passiflora edulis	2017
--	---	------





LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

Confiere el presente:

CERTIFICADO

A: *Diego Fernando Uribe Yunda*

Por haber participado con la Ponencia:

*"Actividad citotóxica y apoptótica de los extractos
de hojas y de jugo de Passiflora Edulis"*

De los autores: Johanny Aguillón Osma, Sandra Sulay Arango Varela,
Diego Fernando Uribe Yunda, Carolina Cuerva Pareja,
Sandra Hurtado Isaza, en el:

**IV Congreso Internacional de Ciencia,
Tecnología e Innovación para la Sociedad
CITIS 2017**

Realizado del 29 de noviembre al 1 de diciembre de 2017,
en la ciudad de Guayaquil.


Ph.D. Javier Herrán G. Sdb.
Rector


Eco. Andrés Bayolo Garay, MFI.
Vicerrector Sede


Dra. Ana María Reino Molina
Secretaria General



LIV Congreso nacional de ciencias biológicas
y V Congreso Internacional de las Ciencias
Biológicas

Caracterización fitoquímica del
extracto etanólico de hojas de
Passiflora edulis

2019



**ASOCIACIÓN COLOMBIANA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Hace constar que el trabajo titulado

**ACCB-0258 CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE HOJAS DE *Passiflora edulis***

Por los investigadores:

Leidy Dahiana González Hernández, Nelsy Loango Chamorro, Johanny aguilón
Osma

Fue presentado en el marco del LIV CONGRESO NACIONAL &
V INTERNACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, realizado en el Centro de
Convenciones de Montería, del 20 -24 de mayo 2019.


Jesús Ballesteros Correa, PhD.
Presidente del Congreso





Anexo 6. Participación en eventos nacionales

5.1

LIII Congreso nacional de ciencias biológicas	Bioaccesibilidad in vitro, permeabilidad intestinal y actividad antioxidante de los componentes sacáridos de los extractos de jugo y hojas de <i>Passiflora edulis</i>	2018
---	--	------

ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

PERSONERÍA JURÍDICA 05547 – Diciembre 16 de 1974 N.º. 806.014.076-1



**LA ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
JUNTA DIRECTIVA CAPITULO BOGOTÁ**

CERTIFICA A:

**Johanny Aguillón Osma, Iván Luzardo Ocampo, Nelsy Loango
Chamorro, Patricia Landázuri**

Quienes participaron con la ponencia titulada

**"BIOACCESIBILIDAD IN VITRO DE MONO Y OLIGOSACÁRIDOS DE
EXTRACTOS DE JUGO Y HOJAS DE *Passiflora edulis*"**

En el marco del **LIII CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS** realizado durante los días comprendidos entre el 09 y 12 de octubre del año en curso, en la Universidad El Bosque (Bogotá).

Mayor información será con gusto suministrada en el teléfono 6489000 ext. 1597 – 1598.

La presente certificación se expide a los doce (12) días del mes de octubre (12) del año dos mil dieciocho (2018).

Cordialmente,

CLARA SANTAFÉ MILLÁN

Presidenta

Junta Directiva Capitulo Bogotá

Anexo 7. Reconocimientos

7.1. Mejor presentación oral



7.2. Mejor poster

