



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

“ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE HOJAS Y FLORES DE *Passiflora ligularis*”

Trabajo de titulación para obtener el grado académico de:

BIOQUIMICA FARMACEUTICA

AUTORA: PINDUISACA ESPARZA NATALY MARIBEL

TUTORA: Lic. KAREN LISSETH ACOSTA LEÓN, M.Sc.

Riobamba-Ecuador

2016

©2016, Nataly Maribel Pinduisaca Esparza

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Trabajo de titulación certifica que el trabajo de investigación: “ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE HOJAS Y FLORES DE *Passiflora ligularis*” de responsabilidad de la señorita egresada Nataly Maribel Pinduisaca Esparza, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Lic. Karen Acosta León

**DIRECTOR DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

BQF Fausto Contero Bedoya

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DOCUMENTALISTA

SISBIB ESPOCH

Yo, Nataly Maribel Pinduisaca Esparza, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados, expuestos en este Trabajo de titulación y el patrimonio intelectual del trabajo de titulación pertenece exclusivamente a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

NATALY MARIBEL PINDUISACA ESPRAZA

AGRADECIMIENTO

Nunca terminaré de agradecer a Dios quien ha demostrado amor incondicional bendiciendo mi vida y cuidando siempre de mí, regalándome la dicha de disfrutar de este momento con las personas que más amo.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a la Facultad de Ciencias y a mi Escuela de Bioquímica y Farmacia por darme la oportunidad de haber pertenecido a ella, utilizar sus instalaciones académicas y contribuir con mi formación axiológica y profesional.

A mi familia quienes fueron mi mayor fuerza e inspiración para lograr este sueño hoy convertido en realidad

Al Grupo de Investigación de Productos Naturales y Farmacia (GIPRONAF) por haber confiado en mí dándome la oportunidad de demostrar mis conocimientos, supieron guiar con inteligencia y experiencia la presente investigación a mi tutora Lic. Karen Acosta y colaboradores B.Q.F Fausto Contero, Dra. Susana Abdo por el gran apoyo y aporte brindado en la elaboración del presente trabajo de investigación mi gratitud y respeto.

A mis amigos quienes han formada parte de mi vida estudiantil brindándome cariño y por supuesto a quienes colaboraron para la culminación de esta etapa académica y por todas las vivencias compartidas mi eterno afecto, respeto y lealtad.

Naty

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo de titulación a Dios quien ha sido el motor principal en mi vida, la fuerza en esas noches de desvelo y la sabiduría en los momentos de angustia. Él es quien me ha otorgado inteligencia para llegar a cumplir mi meta su bendición ha estado siempre en cada momento de mi vida.

A mis papitos Luis y María quienes han creído y confiado en mí siendo un respaldo fundamental durante toda esta etapa de mi vida, apoyándome en cada tropiezo y dándome fuerza para no rendirme. A mis hermanas Silvia, Fabiola y Gabriela de quienes he recibido apoyo incondicional han sabido guiar mi vida mediante su consejo y ejemplo el cual ha servido para llegar hoy al lugar donde me encuentro.

A mi cuñado Héctor por ser un ejemplo de lucha, superación pero sobre inteligencia quien me ha permitido ver las cosas desde un punto de vista crítico y diferente, a mi sobrina Sarita por esas palabras llenas de dulzura y amor en los momentos más indicados de mi vida.

A mis abuelitos José y Adela por estar siempre pendiente de mí dándome fuerzas y consejos apropiados.

Naty

INDICE DE ABREVIATURAS

A	Absorbancia
°C	Grados Celsius
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
FDA	La Administración de Drogas y Alimentos
G	Gramo
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
ISRS	Inhibidores selectivos de la receptación de serotonina
Mg	Miligramo
Min	Minutos
mL_t	Mililitro
Mm	Milímetro
Mm	Milimoles
M	Molar
N	Normal
OMS	Organización Mundial de la Salud
p.a	Para análisis
<i>P. ligularis</i>	<i>Passiflora ligularis</i>
Ppm	Partes por millón
TLC	Cromatografía en capa fina
UI	Microlitros
UV	Ultravioleta

DERECHOS DE AUTOR.....	ii
CERTIFICACIÓN.....	III
DECLARACION DE RESPONSABILIDAD.....	IV
DEDICATORIA.....	V
AGRADECIMIENTO.....	VI
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	VII
TABLA DE CONTENIDO.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ÍNDICE DE CUADROS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XII
RESUMEN.....	XIII
SUMARY.....	XIV
INTRODUCCION.....	1
CAPITULO I.....	1
1. MARCO TEORICO.....	1
1.1. MEDICINA TRADICIONAL.....	1
1.2. MEDICINA TRADICIONAL HERBOLARIA.....	1
<i>1.2.1. Características de la medicina tradicional herbolaria.....</i>	<i>1</i>
1.3. FITOFARMACOLOGÍA.....	1
1.4. FITOTERAPIA	2
<i>1.4.1. Beneficios de la fitoterapia:</i>	<i>2</i>
1.5. FITOMEDICINA.....	2
1.6. FITOFÁRMACO.....	2
1.7. PRINCIPIOS ACTIVOS	2
1.8. PLANTA MEDICINAL	3
1.9. EXTRACTO.....	3
1.10. METABOLITOS SECUNDARIOS.....	3

1.11. FAMILIA PASSIFLORACEAE	3
1.12. GRANADILLA (PASSIFLORA LIGULARIS)	4
1.12.1. División taxonómica.....	4
1.12.2. Origen y distribución	5
1.12.3. Características botánicas.....	5
1.12.4. Composición química.....	6
1.12.5. Propiedades terapéuticas.....	7
1.12.6. Principios activos.....	7
1.12.7. Compuestos fenólicos.....	7
1.12.8. Flavonoides.....	8
1.12.9. Flavonoides de interés farmacológico.	12
1.12.10. Efectos farmacológicos de los flavonoides	13
1.12.11. Ansiedad.....	14
1.12.12. Prevención del cáncer.....	18
1.12.13. Prevención de enfermedades cardiovasculares	19
1.12.14. Alcaloides.....	19
CAPITULO II	20
2. MARCO METODOLÓGICO.....	20
2.1. LUGAR DE RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	20
2.2. LUGAR DE INVESTIGACIÓN.....	20
2.3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.....	20
2.3.1. Material vegetal	20
2.3.2. Materiales	20
2.3.3. Equipos.....	22
2.3.4. Reactivos	22
2.4. ACONDICIONAMIENTO DE LA MATERIA VEGETAL <i>P. LIGULARIS</i>	24
2.4.1. Selección	24
2.4.2. Lavado.....	24
2.4.3. Secado.....	24
2.4.4. Molienda	25
2.5. TÉCNICAS Y MÉTODOS	25
2.5.1. Determinación del contenido de humedad.....	25
2.5.2. Determinación de cenizas totales.....	25

2.5.3. <i>Determinación de cenizas solubles en agua</i>	25
2.5.4. <i>Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico</i>	25
2.5.5. <i>Tamizaje Fitoquímico.</i>	25
2.5.6. <i>Preparación del extracto de P. ligularis y cromatografía en capa fina (TLC)</i>	28
2.5.7. <i>Cuantificación de fenoles totales mediante un método colorimétrico</i>	31
2.5.8. <i>Cuantificación de flavonoides totales mediante un método colorimétrico</i>	32
2.5.9. <i>Análisis HPLC</i>	34
2.5.10. <i>Actividad captadora de radicales libres</i>	36
CAPITULO III	38
3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS	38
3.1. CONTROL DE CALIDAD MATERIA VEGETAL.....	38
3.2. TAMIZAJE FITOQUIMICO	39
3.2.1. <i>Cromatografía en capa fina de la fracción flavónica no hidrolizada de hojas y flores</i>	42
3.3. CUANTIFICACIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES	44
3.3.1. <i>Cuantificación de fenoles totales</i>	44
3.3.2. <i>Cuantificación de flavonoides totales</i>	46
3.4. ANÁLISIS HPLC	48
3.5. ACTIVIDAD CAPTADORA DE RADICALES LIBRES	51
4. CONCLUSIONES	55
RECOMENDACIONES	56
BIBLIOGRAFÍA	57

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Datos de la composición química que presenta la especie <i>P. ligularis</i>	6
Tabla 2-1. Clasificación de los compuestos fenólicos.	8
Tabla 3-1. Descripción de los efectos farmacológicos de algunos flavonoides.....	13
Tabla 4-1. Síntomas de los trastornos de ansiedad.....	15
Tabla 5-1. Tasas de prevalencia según los tipos de trastorno y porcentaje de población.	16
Tabla 6-1. Dosis diaria recomendada en el tratamiento farmacológico de los trastornos de ansiedad.	17
Tabla 7-1. Efectos adversos de los fármacos convencionales utilizados en la ansiedad.....	17
Tabla 8-1. Efectos benéficos atribuidos a los compuestos fenólicos en la prevención de las enfermedades cardiovasculares.....	19
Tabla 1-2. Lista de materiales empleados en los diferentes ensayos.	20
Tabla 2-2. Lista de equipos empleados en las diferentes determinaciones.	22
Tabla 3-2. Lista de reactivos empleados en la investigación	22

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1-3. Control de calidad de las hojas de la planta seca <i>P. ligularis</i>	38
Cuadro 2-3. Concentraciones de los extractos de hojas de <i>P. ligularis</i>	39
Cuadro 2-3. Concentraciones de los extractos de flores de <i>P. ligularis</i>	39
Cuadro 4-3. Tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso de hojas de <i>P. ligularis</i>	40
Cuadro 5-3. Tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso de flores de <i>P. ligularis</i>	40
Cuadro 6-3. Ensayo de glicósidos cianogénicos en hojas y flores de <i>P. ligularis</i>	41
Cuadro 7-3. Resultados de la determinación de Rf de la cromatografía en capa fina de la	42
Cuadro 8-3. Resultados de la determinación de Rf de la cromatografía en capa fina de la fracción flavónica de hojas y flores de <i>P. ligularis</i>	44
Cuadro 9-3. Cuantificación de fenoles totales expresados en % de Fenoles y en mg/g	45
Cuadro 10-3. Cuantificación de flavonoides totales expresados en % de Flavonoides y en mg/g ...	46
Cuadro 11-3. Resultados de la cuantificación de flavonoides totales mediante HPLC	51
Cuadro 12-3. Curva de la actividad captadora de radicales libres y porcentaje de inhibición en el extracto metanólico al 99,8% mediante el método de DPPH	53
Cuadro 13-3. Curva de la actividad captadora de radicales libres y porcentaje de inhibición en el extracto metanólico al 99,8% de flores mediante el método de DPPH	53
Cuadro 14-3. Curva de la actividad captadora de radicales libres y porcentaje de inhibición en el ácido gálico mediante el método de DPPH	54

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. GRANADILLA (<i>Passifloraligularis</i>).....	4
Figura 2-1. Hojas, flores y futo de GRANADILLA (<i>Passiflora ligularis</i>).....	6
Figura 3-1. Diferentes estructuras de los compuestos fenólicos.	8
Figura 4-1. Estructura básica representativa de los flavonoides.	9
Figura 5-1. Estructura de un flavonoide glicosilado (O-glicósido de flavonoide: Apigenina 7-O-β-D glicopiranosida).....	9
Figura 6-1. Ejemplos de flavonoides agliconas	10
Figura 7-1. Ejemplos de flavonoides glicósidos	10
Figura 8-1. Síntesis de los flavonoides	11
Figura 9-1. Estructura química y sub-clasificación de los distintos tipos de flavonoides.....	12
Figura 2-2. Diagrama de flujo para obtención de extractos de <i>P. ligularis</i>	26
Figura 3-2. Tamizaje Fitoquímico extracto etéreo.....	27
Figura 4-2. Tamizaje Fitoquímico extracto alcohólico.....	27
Figura 5-2. Tamizaje Fitoquímico extracto acuoso.....	27
Figura 6-2. Diagrama de flujo de extractos de <i>P. ligularis</i> para TLC.....	30
Figura 7-2. Diagrama de flujo de cuantificación de fenoles y flavonoides, de los extractos de <i>P. ligularis</i>	33
Figura 8-2. Diagrama de cuantificación de extractos de <i>P. ligularis</i> mediante HPLC.....	35
Figura 9-2. Diagrama de flujo de la actividad captadora de radicales libres en la especie <i>P. ligularis</i>	37
Figura 1-3. Cromatografía en capa fina de la fracción flavónica no hidrolizada de hojas y flores de <i>P. ligularis</i>	42
Figura 2-3. Cromatografía en capa fina de la fracción flavónica de las hojas y flores de	43
Figura 3-3. Cuantificación de fenoles totales de las hojas y flores de <i>Passiflora ligularis</i>	45
Figura 4-3. Cuantificación de fenoles totales de las hojas y flores de <i>Passiflora ligularis</i>	47
Figura 5-3. Cromatogramas HPLC de apigenina, luteolina y quercetina en etanol 70%. (A) Estándar de quercetina (10ug/mL), (B) estándar de luteolina (5ug/mL), (C) estándar de apigenina (5ug/mL), (D) muestra estandares, (E) muestra etanólica al 70%hidrolizada diluida.....	49

INDICE DE ANEXOS

ANEXO A: Materia prima *Passiflora ligularis*

ANEXO B: Parámetros de calidad del material vegetal

ANEXO C: Obtención de extractos de flores y hojas del *P. ligularis*

ANEXO D: Tamizaje fitoquímico de los extractos

ANEXO E: Cromatografía en capa fina

ANEXO F: Cromatografías en capa fina con fases móviles probadas

ANEXO G: Obtención de la fracción flavónica de las hojas y flores del *P. ligularis*

ANEXO H: Preparación del reactivo de Folin Ciocalteu

ANEXO I: Cuantificación de compuestos fenólicos totales

ANEXO J: Cuantificación de compuestos flavónicos

ANEXO K: Preparación de la muestra para el HPLC

ANEXO L: Cuantificación en HPLC del extracto hidroalcohólico de *P. ligularis*

ANEXO M: Cuantificación de la actividad captadora de radicales libres

ANEXO Ñ: Curva de calibración del ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu

ANEXO O: Cuantificación de fenoles totales en los extractos Acetato de etilo 100% (I), Metanólico 98% (II) y Etanólico 70% (III) por el método de Folin-Ciocalteu.

ANEXO P: Curva de calibración de quercetina por el método de tricloruro de aluminio

ANEXO Q: Cuantificación de flavonoides totales en los extractos Acetato de etilo 100% (I), Metanólico 98% (II) y Etanólico 70% (III).

ANEXO R: Cuantificación de flavonoides totales mediante HPLC, expresados como Apigenina (I), Luteolina (II) y Quercetina (III).

ANEXO S: Cuantificación de la actividad captadora de radicales libres en el ácido gálico

ANEXO T: Cuantificación de la actividad captadora de radicales libres en el extracto metanólico 99,8% de hojas (I) y flores (II) de la especie *P. ligularis*.

RESUMEN

La realización del estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antioxidante *In Vitro* de hojas y flores de *Passiflora ligularis*; se realizó en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo dentro del Grupo de Investigación de Productos Naturales y Farmacia (GIPRONAF) en el marco del proyecto institucional “Estudio comparativo de la actividad psicoactiva de pasifloras de la provincia de Chimborazo”. Se realizó la recolección y secado de la materia vegetal, se efectuó el control de calidad de las hojas y flores, se desarrolló el tamizaje fitoquímico de los extractos, se hizo una cromatografía en capa fina (TLC) en hojas y flores. La cuantificación de fenoles y flavonoides se midió mediante espectrofotometría UV, además se realizó una cuantificación de flavonoides mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), se determinó la actividad captadora de radicales libres mediante el método de 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH). En la cuantificación de fenoles y flavonoides el extracto que presentó mayor concentración fue el etanólico al 70% con 716,67 mg de ácido gálico/g de hojas secas y 122,22 mg de ácido gálico/g de flores secas, mientras que para flavonoides se obtuvo 54,33 mg de quercetina/g de hojas secas y 12,53 mg de quercetina/g flore secas, en HPLC los resultados obtenidos fueron expresados en porcentaje de apigenina, quercetina y luteolina, obteniendo para apigenina 0,0246% en hojas y 0,0538% en flores, para quercetina 0,0730% en hojas y 0,0575% en flores y para luteolina 0,0026% en hojas y 0,0114% en flores. La capacidad inhibitoria IC50 del extracto metanólico al 99,8% fue de 310,0 ug/mL en hojas y 4692,6 ug/mL flores. Mediante este estudio se concluyó que existe mayor actividad captadora de radicales libres en hojas que flores, además se recomienda utilizar diferentes concentraciones de DPPH para la obtención de mejores resultados en la actividad captadora de radicales libres.

Palabras Clave: <GRANADILLA [*Passiflora ligularis*]>, <CONTROL DE CALIDAD>, <TAMIZAJE FITOQUÍMICO>, <CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA [TLC]>, <ESPECTOFOTOMETRIA> <CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA [HPLC]>, <ACTIVIDAD CAPTADORA DE RADICALES LIBRES>, <PORCENTAJE DE INHIBICION>, <FARMACIA>

SUMMARY

The photochemical study and evaluation of the antioxidant activity in vitro of leaves and flowers of *Passiflora ligularis*; in the Escuela Superior Politecnica de Chimborazo within the Research Group of Natural Products and Pharmacy (GIPRONAF) within the framework of the institutional project “A comparative study of the psychoactive activity of *passifloras* of the Chimborazo province”, were carried out with the collection and drying of the vegetable matter, the quality control of the leaves and flowers, a screening photochemical of extracts, a thin layer chromatography (TLC) in leaves and flowers were made. The quantification of flavonoids by high pressure liquid chromatography (HPLC) was conducted, it was determined the recruiter activity of free radicals through the method of 1,1-diphenyl-2-picril-hidrazilo (DPPH). In the quantification of phenols and flavonoids the extract showed higher concentration was the ethanolic to 70% with 716.67 mg of gallic acid/g of dry leaves and 122.22 mg of gallic/g of dry flowers, while for flavonoids was obtained 54.33 mg of quercetin/g of dry leaves and 12.53 mg of quercetin/g of dry flowers, in HPLC results were expressed as a percentage of apigenin, quercetin and luteolin, obtaining for apigenin 0.0246% in leaves and 0.0538% in flowers, for quercetin 0.0730 % in leaves and 0,0575% in flowers and for luteolin 0.0026% in leaves and 0.0114% in flowers. The inhibitory capacity IC50 of the methanolic extract to 99.8% was 310.0 ug/mL in leaves and 4692.6 ug/mL in flowers. This study concluded that there is greater recruiter activity of free radicals in leaves than flowers, and recommended to use different concentrations of DPPH for obtaining best results in the recruiter activity of free radicals.

Key Words: <PASSION FRUIT (*Passiflora ligularis*) >, <QUALITY CONTROL>, <SCREENING PHOTOCHEMICAL>, <THIN LAYER CHROMATOGRAPHY (TLC)>, <SPECTROPHOTOMETRY>, <HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)>, <RECRUITER ACTIVITY OF FREE RADICALS>, <PERCENTAGE OF INHIBITION>, <PHARMACY>

INTRODUCCION

En una población agitada con conflictos económicos, tecnológicos, sociales y culturales, se han desarrollado ciertos problemas a nivel de salud mental. Dentro de estos problemas, se halla la ansiedad, siendo el trastorno que presenta porcentajes de incidencia muy elevados que puede afectar a cualquier persona sin importar la edad, la raza, el sexo o la clase social. (Jmgorman, 2000, p. 13)

Datos de la Organización Mundial de la Salud en el 2001, demostraron que aproximadamente existen 450 millones de personas padecen algún tipo de trastorno mental en todo el mundo. (Anon., 2014, p. 34). Mientras que estudios epidemiológicos realizados en España demuestran que cerca del 10% y el 20%, de la población presenta algún tipo de ansiedad razón por la cual se le ha considerado como la verdadera epidemia silenciosa del siglo XXI. (Anon., 2013, p. 34)

En países como Estados Unidos y México el trastorno de ansiedad ha sido considerado como el trastorno mental más común, afectando al 25% de la población. (Festorazzi A, 2008, p. 20). Estudios realizados en Ecuador en un colegio de Cuenca en los/las adolescentes de octavo, noveno y décimo año, muestra claramente que existe una prevalencia de 13% de adolescentes con ansiedad leve, un 64% moderada, 23% grave indicando a su vez que existe una mayor prevalencia de ansiedad grave en mujeres con 15.4% que en varones con 8.4%, mientras que casi no existe diferencia en relación entre ansiedad moderada (32.8% de hombres y 30.8% en mujeres). Por otro lado, a nivel de educación superior los casos de ansiedad se presentan con más frecuencia como resultado de una mayor presión estudiantil. (Caicedo V, s.f., p. 45)

El término ansiedad fue utilizado por primera vez en el siglo XVIII por el escocés William Collen y desde entonces el protocolo terapéutico para todos los casos conlleva un tratamiento psicoterapéutico junto con un tratamiento farmacológico. (Mak, et al., 2012, p. 80)

Dentro de las terapias farmacológicas más utilizadas para curar los trastornos de ansiedad se encuentran los ansiolíticos y dentro de este grupo las benzodiazepinas (BZD), medicamentos de origen sintético que presentan varias reacciones adversas como somnolencia, amnesia, efecto rebote, confusión, y trastornos en la coordinación, incompatibilidad con otros medicamentos y en la mayoría de los casos dependencia al no usar las dosis adecuadas, por tal razón deben ser administrados bajo vigilancia médica. (Gilman, 2011, p. 56)

Muchos son los efectos negativos que provocan los ansiolíticos sin embargo son uno de los más usados para tratar los diferentes tipos de trastornos de ansiedad, olvidando otras alternativas como la utilización de plantas medicinales que pudieran tener actividad como ansiolíticos naturales y de esa manera emplearlos en el tratamiento como fitomedicamentos. (Rang, 2008, p. 90)

Otro tema igual de preocupante es el efecto negativo de los radicales libres responsables de causar daño al organismo a nivel celular, aumentando así el riesgo al desarrollo enfermedades cardiovasculares, otras enfermedades degenerativas y cáncer una de las primeras causas de muerte a nivel mundial; en 2012 la OMS demostró que existen 8,2 millones de muertes por algún tipo de cáncer, es por ello que mediante varios estudios se ha demostrado del gran beneficio que presentan los antioxidante, a las cuales se atribuye los efectos beneficiosos para la salud (Anon., 2012, p. 78), ya que ayudarían y protegerían desactivando a los radicales libres y protegiendo al organismo de moléculas altamente reactivas como son los radicales libres los cuales, minimizando el daño. (Cabrera, et al., 2014, p. 67)

La elaboración de medicamentos a base de plantas medicinales o fitofármacos cada vez es mayor debido a los grandes avances científicos que se desarrollan día tras día. En Ecuador, se observa que las empresas de fitofármacos y la utilización de fitoterapia son procedimientos que existen ya desde hace miles de años. (Lock, 2004, p. 90). El género *Passiflora* posee algunos estudios donde se ha comprobado la importancia de esta especie dentro de la farmacología, indicando que posee gran efectividad como ansiolítico y antioxidante. (Rodríguez, 2007, p. 56).

El estudio de la especie *Passiflora ligularis* y sus metabolitos secundarios aportará a la sociedad y al Plan Nacional del Buen Vivir, produciendo un cambio en la matriz productiva mediante la aplicación de bioconocimiento, dando a notar la importancia del uso de productos naturales como psicoactivos, mediante la elaboración fitoformulaciones que contengan actividad ansiolítica y antioxidante a la vez. (MSP, 2008, p. 10), impulsando el interés del manejo de recursos naturales como es la de la especie *P. ligularis*,

Además con esta investigación se logrará dar un aporte científico y cultural al país ya que se rescatarán los saberes ancestrales respecto a la especie de estudio.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la composición fitoquímica y evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de hojas y flores de “*Passiflora ligularis*.”

Objetivos Específicos

1. Establecer la calidad y composición cualitativa de la droga vegetal seca proveniente de hojas y flores de *P. ligularis* mediante control de calidad y tamizaje fitoquímico.
2. Identificar la presencia de compuestos de tipo flavónico presentes en extractos de hojas y flores de *P. ligularis* mediante cromatografía en capa fina.
3. Cuantificar la concentración de fenoles, flavonoides en extractos de hojas y flores de *P. ligularis* por espectrofotometría y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)
4. Evaluar la capacidad captadora de radicales libres *in vitro* de extractos de hojas y flores de la especie *P. ligularis* mediante DPPH.

CAPITULO I

1. MARCO TEORICO

1.1. Medicina tradicional

La medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales. (OMS, s.f., p. 1)

1.2. Medicina tradicional herbolaria

Es aquella rama de la medicina tradicional que utiliza plantas o partes de ellas, ya sean en su forma natural o preparada de diversa manera con la intención de curar o aliviar o prevenir diferentes síntomas o enfermedades. (Contrera, 2004)

1.2.1. Características de la medicina tradicional herbolaria

La medicina tradicional herbolaria es inherente a cada población y cultura, lo que le da características propias, que son:

1. Distribución mundial
2. Prácticas basadas en creencias
3. Uso actual vigente
4. Tradición cultural oral y escrita.
5. Transferencia de generación en generación
6. Difícil transferencia entre culturas diferentes.
7. Remedios confiables y seguros.
8. Bajo costo (Contrera, 2004).

1.3. Fitofarmacología

Es la ciencia que pertenece a la farmacología, la cual tiene como objetivo el estudio de los diversos extractos de plantas medicinales o fitofármacos. Para ello se debe contar con profesionales investigadores que tengan una mente imaginativa para que no se dejen llevar por el modelo experimental convencional, es más el investigador debe tener una visión histológica clara para de esa manera poder diferenciar los contenidos que se presenten en los extractos sobre todos en aquellos

donde se encuentren los compuestos bioactivos ya que estos serán los únicos capaces de interactuar con múltiples sitios en el organismo. (Roersch, 2004, p. 34)

1.4. Fitoterapia

El uso de las plantas ha sido utilizado con fines medicinales y curativos en la salud humana y es una actividad que se la realiza hace mucho tiempo ya que era la única forma que tenía la humanidad para curarse dando por consiguiente la creación de remedios naturales con plantas medicinales. Todo esto ha permitido que los conocimientos sobre las especies vegetales que poseen propiedades medicinales se vayan profundizando, lo cual en tiempos actuales es conocido como fitoterapia termino que fue atribuido por Henri Leclerc médico francés a inicios del siglo XX, proviene de un vocablo de dos voces griegas: phytón (planta) y therapeía (tratamiento). (Orozco, 2013, p. 45)

Actualmente la fitoterapia es definida como la ciencia que realiza el estudio sobre la utilización de plantas con propiedades terapéuticas o sus derivados para tener un efecto farmacológico en un estado patológico. (Hernández, 2004, p. 67)

1.4.1. Beneficios de la fitoterapia:

- ❖ Ayuda a que las hormonas de origen vegetal o fitoestrógenos imitan la acción de las hormonas sexuales humanas (estrógeno y progesterona)
- ❖ Ofrecen nuevos fármacos con resultados buenos sin la presencia de efectos secundarios
- ❖ Algunas plantas presentan control de la concentración de colesterol en sangre y en el tratamiento de algunos cánceres. (r. Echemendía & Dr.Morón, 2006, p. 23)

1.5. Fitomedicina

Según la OMS, Organización Mundial de la Salud define a la Fitomedicina como aquella que utiliza principios activos de plantas y vegetales con fines medicinales, sustentados en el conocimiento científico actual base al actual en farmacodinamia, farmacología, farmacocinética, estudios pre-clínicos; estos son divulgados mediante comunidades científicas. (Morales & Morales, 2009, p. 55)

1.6. Fitofármaco

Se trata del extracto estandarizado que fue obtenido de alguna parte de la planta medicinal el mismo que podrá ser utilizado en terapéutica. (Roersch, 2004, p. 29)

1.7. Principios activos

Son todas aquellas sustancias que presentan o tiene acción farmacológica. (Roersch, 2004, p. 29)

1.8. Planta medicinal

“Es cualquier planta que en uno o varios órganos contiene sustancias que son utilizadas terapéuticamente o que son precursores para la hemisíntesis químico farmacéutica” (Morales & Morales, 2009, p. 12)

Se trata de todo vegetal que dentro de sus órganos puede contener sustancias con finalidades terapéuticas o que pudieran servir de precursores en la semi-síntesis químico-farmacéutica. (Roersch, 2004, p. 35)

1.9. Extracto

Se trata de toda sustancia que es obtenida mediante un proceso de extracción utilizando una de las partes de la materia prima, junto con la ayuda de un solvente como etanol o agua entre otros. Los extractos pueden comercializarse como tinturas o en forma de polvo. (Roersch, 2004, p. 45)

1.10. Metabolitos Secundarios

Dentro de las plantas existen muchos metabolitos secundarios los cuales se pueden clasificar según presenten o no nitrógeno en su composición así existen en la actualidad más de 20000 estructuras, clasificadas en dos grupos:

- ❖ Metabolitos secundarios nitrogenados: compuestos como los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianógenicos y glucosinolatos.
- ❖ Metabolitos secundarios no nitrogenados: compuestos como los terpenoides, policéticos y fenilpropanoides. (Jimenez, 2004, p. 25)

1.11. Familia Passifloraceae

Passiflora es el género más importante de la familia Passifloraceae, que cuenta con más de 530 especies. Crece principalmente en la zona tropical de América y sólo 22 especies crecen en el sur de Asia, Australia y Oceanía. En 1569, los conquistadores españoles descubrieron la Passiflora en Perú. Creyeron que las flores simbolizaban la pasión de Cristo y que eran una señal de aprobación de sus exploraciones. (Jimenez, 2004, p. 25).

El género *Passiflora* contiene varios compuestos que incluyen alcaloides, fenoles, flavonoides y compuestos cianogénicos glicosilo.

Un estudio reciente mostró que las hojas de *Passiflora* ofrecen una alternativa importante en el tratamiento de trastornos de ansiedad, una condición por la cual muchas personas están buscando opciones de un tratamiento no farmacológico. Se necesita más investigación, pero su uso tradicional y los estudios preliminares son abrumadoramente positivos indicando que la manera de actuar de

este género es al afectar al receptor GABA en el cerebro provocando que mejore el sueño sin los efectos secundarios negativos como el desarrollo de tolerancia. (KAMALDEEP, D. y otros. 2001).

Está demostrado que el género *Passiflora* es eficaz para el tratamiento de la desintoxicación ayudando en las fases de abstinencia en el tratamiento de adicción. Como una terapia natural no adictivo, pasiflora ofrece una alternativa segura a algunos de los productos farmacéuticos utilizados actualmente para estos propósitos.

Las benzoflavonas de la pasiflora también se han utilizados en estudios con animales de desintoxicación de alcohol. En tanto la administración aguda y crónica de la pasiflora, disminuye significativamente la expresión de los efectos de la abstinencia y el comportamiento de ansiedad. Es decir, la pasiflora tiene un gran potencial en el tratamiento de diversos problemas de salud incluyendo la ansiedad, el insomnio y la adicción. (PATEL, S. y otros. 2010)

A todo este se atribuye que varias especie del genero *Passiflora* han demostrado su actividad antioxidante y antimicrobiana, en una publicación Cabrera y colaboradores (2014) muestran que la especie *Passiflora ligularis* presenta en los extractos acuosos e hidroalcohólicos compuestos fenólicos los cuales serían los responsables de dicha actividad, además determinaron la presencia de flavonoides totales equivalentes a 10.47 mg Eq Vitexina/g materia seca, en extractos hidroalcohólicos. En este trabajo también se observó correlación entre los fenoles y la actividad antioxidante (FRAP).

Algunos experimentos también concluyen que tiene efectos potenciales para tratamiento de algunas enfermedades como la ansiedad, insomnio, trastorno de hiperactividad, déficit de atención, la hipertensión y el cáncer.

1.12. GRANADILLA (*Passiflora ligularis*)

1.12.1. División taxonómica

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Violales*

Familia: *Passifloraceae*

Género: *Passiflora*

Especie: *P. ligularis* (Pallo, 2012, p. 23)



Figura 1-1. GRANADILLA (*Passiflora ligularis*)

Realizado por: Nataly Pinduisaca

1.12.2. Origen y distribución

La Granadilla (*Passiflora ligularis*), pertenece a la familia Passifloraceae se trata de una planta trepadora la cual es originaria de las montañas de los Andes entre Bolivia, Perú y Ecuador.

Sus principales cultivos se encuentran desde el norte de Argentina hasta México además se puede ubicar en zonas tropicales de África y Australia.

Principalmente es una planta que prefiere las zonas de clima frío, ya que es intolerante al calor fuerte su temperatura ideal oscila entre los 14 y los 24°C y una humedad relativa de un 75%. Se cultiva en suelos muy fértiles y profundos los mismos que deben tener una buena aireación, textura franca, con buen contenido de materia orgánica y un pH entre 6 y 6.5. (Pallo, 2012, p. 23)

1.12.3. Características botánicas

1.12.3.1. Raíz

La especie *Passiflora ligularis* se caracteriza por presentar raíces fibrosas, fasciculadas y poco profundas, tiene una raíz primaria la cual no crece mucho a través de esta se derivan un gran número de raíces secundarias. (Ocampo, 2013, p. 15)

1.12.3.2. Tallo

Posee un tallo que es cilíndrico, estriado y voluble, su principal función es de actuar como soporte para la planta además es el lugar donde se almacena agua. Su tallo y ramas se caracterizan por presentar nudos cada 12 a 15 cm y en cada nudo se identifican 7 estructuras: una hoja; dos brácteas o estipulas; dos yemas florales; y un zarcillo. El zarcillo, estructura filamentososa en forma de espiral, tiene como función ayudar a la planta a trepar y enredarse. (Ocampo, 2013, p. 15)

1.12.3.3. Hojas

P. ligularis posee hojas de gran tamaño alrededor de 8-20 cm de largo y 6,5 cm de ancho es de color verde intenso en su borde presenta un aspecto liso y nervaduras bien pronunciadas en el envés. Hacia las axilas de las hojas crecen estípulas pareadas, oblongo-lanceoladas. (Ocampo, 2013, p. 15)

1.12.3.4. Flores

Sus flores miden de 6 a 8 cm de diámetro, tiene sépalos y pétalos de color blanco y ligeramente amarillento en la corona se encuentra ciertas bandas las cuales poseen coloraciones moradas y blancas alternadas, las flores empiezan a dar fruto entre 1 y 3 años. (Ocampo, 2013, p. 15)

1.12.3.5. Fruto

El fruto es ovoide o elíptico, se encuentra sostenido a través de un pedúnculo largo que mide de 6 a 12 cm. Externamente presenta una cascara dura, de color amarilla con presencia de puntos blancos y con seis líneas del ápice a la base, de color variable en función del grado de madurez. El epicarpio está formado por varias capas de células cortas de paredes muy gruesas y amarillas, miden menos de 1mm de espesor pero es responsable de la solidez que presenta la fruta. (Ocampo, 2013, p. 15)



Figura 2-1. Hojas, flores y fruto de GRANADILLA (*Passiflora ligularis*)

Realizado por: Nataly Pinduisaca

1.12.3.6. Semillas

Sus semillas se caracterizan por presentar agrupaciones longitudinales situadas en las paredes. Morfológicamente las semillas son planas, elípticas, negras y rodeadas de un arilo transparente y gelatinoso que constituye en la parte comestible. La granadilla se caracteriza por ser una trepadora suele subir o trepar los arboles bajos o troncos donde se enreda completamente. (Pallo, 2012, p. 23)

1.12.4. Composición química

Tabla 1-1. Datos de la composición química que presenta la especie *P. ligularis*.

Componentes	Contenido de 100mg parte comestible
Vitamina C	7mg
Hierro	2.0mg
Potasio	348mg
Vitamina B	0.1mg
Calcio	30mg
Magnesio	29mg
Fosforo	68mg

Fuente: (Center for Invasive Species and Ecosystem Health, 2010, <http://www.invasive.org/browse/subinfo.cfm?sub=55925>)

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

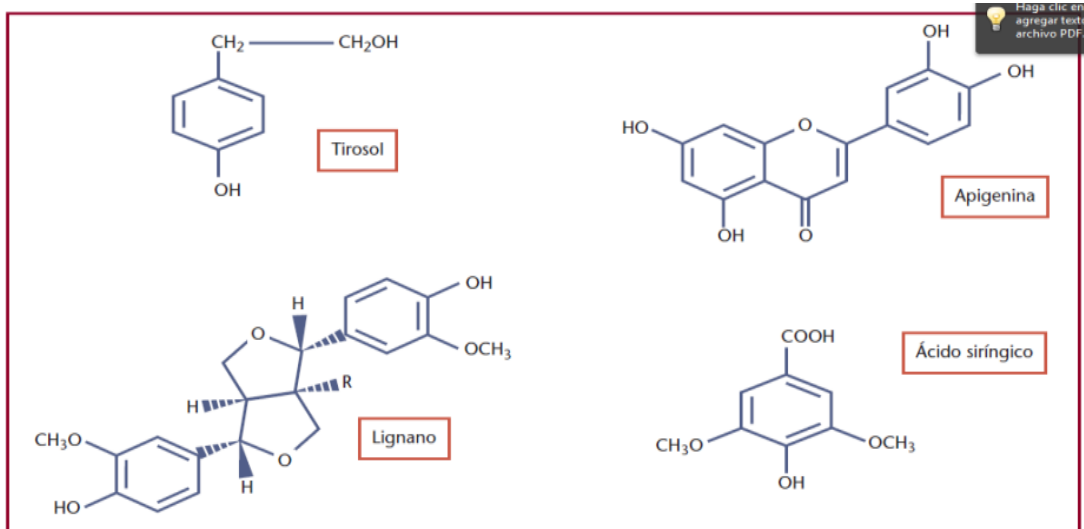


Figura 3-1. Diferentes estructuras de los compuestos fenólicos.

Fuente: (Cartaya & Reynaldo, 2001)

1.12.7.1. Clasificación general de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se pueden clasificar de muchas maneras debido a su diversidad estructural:

Tabla 2-1. Clasificación de los compuestos fenólicos.

No flavonoides	Flavonoides
Fenoles no carboxílicos: C ₆ , C ₆ -C ₁ , C ₆ -C ₃ .	Antocianos
Ácidos fenoles: derivados del ácido benzoico C ₆ -C ₁ y derivados del ácido cinámico C ₆ -C ₃ .	Flaonas, flavononas, flavanoles y flavanonoles.
	Flavanoles, taninos condensados y lignanos

Fuente: (Cartaya & Reynaldo, 2001)

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

1.12.8. Flavonoides

Los Flavonoide se tratan de metabolitos secundarios conocidos como polifenoles tiene una estructura química basada en un esqueleto C₆-C₃-C₆ (Cartaya & Reynaldo, 2001, p. 40), en el cual la cadena de tres carbonos entre los grupos fenilos forman un puente ciclado con oxígeno (anillo pirano glucósidos o en el estado libre como agliconas con grupos hidroxilo o metoxilo presentes en la aglicona) además en su estructura química se encuentra un grupo cetona y normalmente pigmentos de coloración amarilla de donde viene su nombre (del latín flavus, "amarillo").

Los flavonoides son muy importantes para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas, ya que actúan como atrayentes de animales en la oviposición, como agentes protectores contra la luz UV o contra la infección por organismos fitopatógenos; además, estos compuestos presentan propiedades relacionadas con la salud humana, lo cual está basado en su actividad antioxidante.

Según la insaturación y el grado de oxidación del segmento C₃, varias familias de flavonoides pueden ser distinguidas como: flavonoles, flavanonas, flavonas, antocianinas e isoflavonas.

Se trata de uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos dentro de la naturaleza, se pueden encontrar como aglicona y /o glicósidos, los cuales se hallan presentes en todas las partes de la planta, uno de los grupos más importantes y comúnmente encontrado son las flavonas y flavonoles. (Ambiga, et al., 2007, p. 45). Estudios acerca de los flavonoides han demostrado que una dieta rica en los mismos puede disminuir el riesgo de cáncer pero no se ha encontrado significación estadística además se ha demostrado que tiene grandes actividades farmacológicas para ellos se ha utilizado modelos “in vitro” por medio de los cuales se ha comprobado su capacidad: antioxidantes, antiinflamatorias, antialérgicas, antibióticas, antidiarreicas y contra el cáncer. Por otro lado, en modelos “in vivo” no se ha podido demostrar la actividad antioxidante, así como tampoco se ha logrado relacionar directamente con la efectividad contra el cáncer. (Pallo, 2012, p. 23)

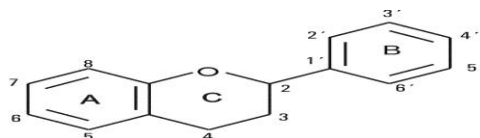


Figura 4-1. Estructura básica representativa de los flavonoides.

Fuente: (Biesaga, 2011, pp.2505-2512)

Existen flavonoides glicosilados los cuales se suelen encontrar habitualmente en las plantas, en este caso podemos observar que uno o más grupos hidroxilos del núcleo del flavonoide se encuentran unidos a algún azúcar. Por lo general el azúcar con el que se encuentran unidos es la glucosa, pero también puede encontrarse la galactosa, ramnosa y xilosa, y el disacárido rutinosa. La glicosilación es la unión de flavonoide-azúcar con la cual permiten que estos se vuelvan menos reactivos y más solubles en agua. (Cartaya & Reynaldo, 2001, p. 40)

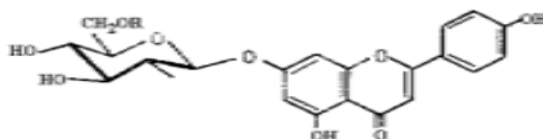


Figura 5-1. Estructura de un flavonoide glicosilado (O-glicósido de flavonoide: Apigenina 7-O-β-D glicopiranosida)

Fuente: (Biesaga, 2011, pp.2505-2512)

En los siguientes figuras se puede observar algunos de los ejemplos de agliconas y glicosidos:

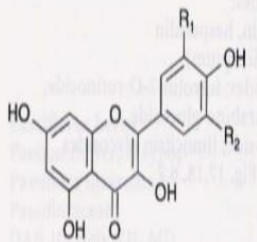
Flavonols	R ₁	R ₂	Aglycone
	OH	H	Quercetin
	H	H	Kaempferol
	OH	OH	Myricetin
	OCH ₃	H	Isorhamnetin

Figura 6-1. Ejemplos de flavonoides agliconas

Fuente: Wagner & Bladt, 2001, p. 204

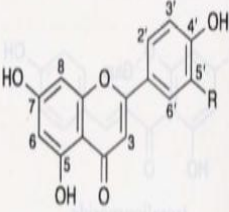
Flavones	Aglycone	Glycoside
	Apigenin R = H	A-8-C-glucoside (vitexin) A-6-C-glucoside (isovitexin)
	Luteolin R = OH	A-7-O-apiosyl-glucoside (apiin) A-6-α-L-arabinopyranoside-8-C-glucoside (schaftoside)
		L-5-O-glucoside (galuteolin) L-8-C-glucoside (orientin) L-6-C-glucoside (iso-orientin)

Figura 7-1. Ejemplos de flavonoides glicósidos

Fuente: Wagner & Bladt, 2001, p. 205

1.12.8.1. Síntesis Flavonoides

Los flavonoides para su biosíntesis siguen la vía metabólica del fenilpropano, ahí gracias a la presencia del aminoácido fenilalanina da origen a su formación dando como primer compuesto el cumaril-SCoA que, conjugado con el malonil-CoA, crean un grupo de sustancias llamadas chalconas las cuales son el esqueleto que será utilizado para la biosíntesis de todos los flavonoides y antocianos.

(Anon., 2006, p. 10)

Los tipos de flavonoides están relacionados por una ruta biosintética común, la que incorpora precursores de las rutas del shiquimato y la acetato- malonato (4, 5). Posteriores modificaciones ocurren en varios estados, lo que resulta en la extensión de la hidroxilación, metilación, isoprenilación, dimerización y glicosilación, produciendo O y C-glicósidos (6).

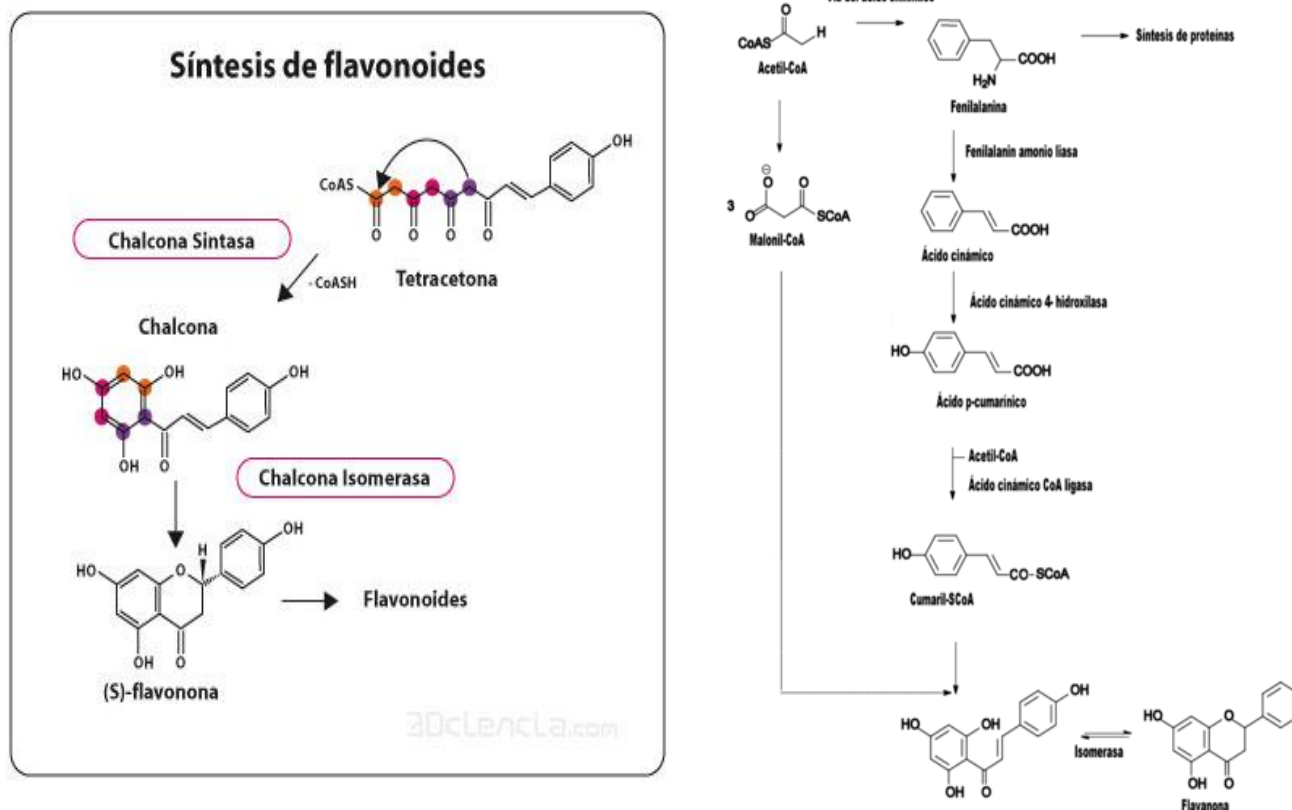


Figura 8-1 Síntesis de los flavonoides

Fuente: (Biesaga, 2011, pp.2505-2512)

1.12.8.2. Clasificación de los flavonoides

- ❖ Flavanona: estructuras que tienen un grupo carbonilo en la posición cuatro, precursores de la formación de flavonoides.
- ❖ Dihidroflavonol: presentan una hidroxilación en la posición 3, además poseen un carbonilo en la estructura base
- ❖ Flaván-3,4-diol: estructuras donde se reduce el dihidroflavonol del grupo carbonilo de la posición cuatro.
- ❖ Flavona: presentan un doble enlace entre las posiciones dos y tres de la flavanona.

- ❖ Flavonol: presentan la introducción de un doble enlace entre las posiciones dos y tres del dihidroflavonol.

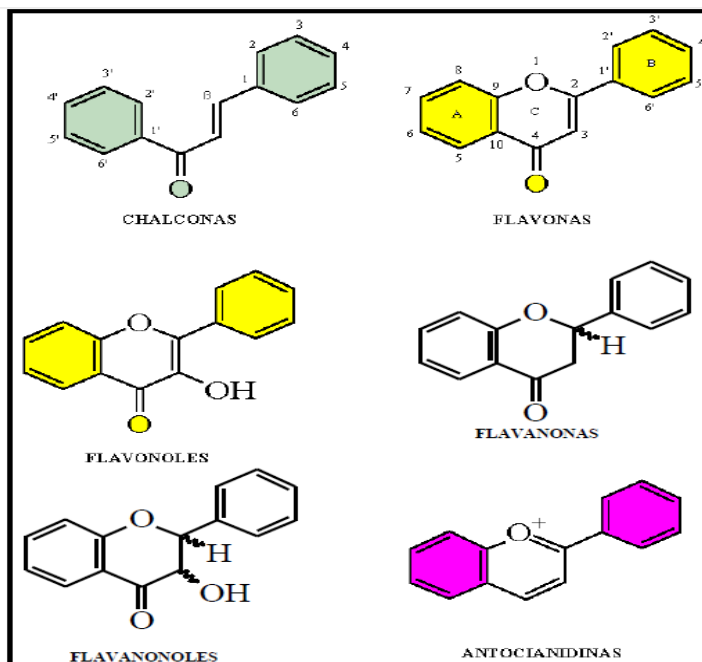


Figura 9-1. Estructura química y sub-clasificación de los distintos tipos de flavonoides

Fuente: (Cartaya & Reynaldo, 2001)

1.12.9. Flavonoides de interés farmacológico.

1.12.9.1. Quercetina

Se trata de uno de los flavonoides más importantes el cual es obtenido mediante hidrólisis. Se caracteriza por ser el flavonoide que proporciona el color a flores, frutas, hortalizas. Uno de los aspectos más importantes son sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antihistamínicas, entre otras. (Anon., 2006, p. 10)

1.12.9.2. Crisina

La crisina es un flavonoide muy representativo se encuentra presente en la familia *Passifloraceae* utilizadas desde mucho tiempo atrás como sedante y ansiolítico natural. Estudios sistemáticos han revelado la presencia de flavonoides como la crisina, los cuales son de gran importancia ya que presentan afinidad por el receptor GABAA, y como respuesta a esto tienden a modular la actividad de los canales de Cl⁻ en las neuronas ejerciendo así algunos efectos ansiolíticos (Anon., 2006, p. 10)

1.12.9.3. Vitexina y Isovitexina

Estos tipos de flavonoides son utilizados en la terapia de la enfermedad de la gota inhibiendo la peroxidasa tiroidea. (Anon., 2006, p. 10)

1.12.9.4. Apigenina

Es un tipo de flavonoide que se utiliza como inmunosupresor y se administra durante los trasplantes de órganos. Además, se ha podido demostrar que la Apigenina es una substancia capaz de estimular el transportador de monoaminas alterando los niveles de neurotransmisores. Estudios recientes demuestran que la Apigenina tiene acciones como ansiolítico y sedante actuando sobre los receptores de GABA. (Anon., 2006, p. 11)

1.12.9.5. Luteonina y Orientina (glucósido de luteonina)

Se tratan de los flavonoides más importantes ya que poseen actividades farmacológicas que han sido demostradas mediante estudios preclínicos entre ellas tenemos antioxidantes, antiinflamatorias, antibióticas y para combatir el cáncer. (Anon., 2006, p. 11)

Tabla 3-1. Descripción de los efectos farmacológicos de algunos flavonoides.

Efectos	Flavonoide	Referencias
Antineoplásico	quercetina, kaemferol, fisetina	19,21
Cardiotónicos	3-metil-quercetina	22,23
Disminuyen la fragilidad capilar	rutina, quercetina, naringenina	19,24
Antitrombóticas	tangeretina, hesperidina, rutina	23,25
Disminución del colesterol	liquiritigenina	26
Protección y regeneración hepática	silimarina, apigenina	24,27,28
Antiulcéricos	Kaemferol, quercetina	29,30
Antimicrobianos	quercetina, baicalina	
Antibacterial	crisina, rutina	31,32
Antiviral	crisoeriol	33,34
Antifúngica	cloroflavonina, apigenina	
Antiinflamatorios	hesperidina, luteolina, quercetina	35,36
Analgésico	hesperidina	37,38
Anticancerígeno	quercetina	20,39,40

Fuente: SciElo (2012) "Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central " México

1.12.10. Efectos farmacológicos de los flavonoides

- ❖ **Actividad ansiolítica:** estudios han demostrado de la influencia de los flavonoides sobre el SNC, aun todavía es escasa la información de cómo permean la barrera hematoencefálica (BHE)

sin embargo investigaciones recientes *in vitro* e *in vivo* indican que tanto los flavonoides hidrolizados (agliconas) como sus productos de conjugación son capaces de atravesar la BHE.

1.12.11. Ansiedad

La ansiedad es una enfermedad que se presenta generalmente a causa de una manifestación afectiva, proviene del latín “anxietas” que significa angustia o aflicción; al referirse al término ansiedad se dice que es el mecanismo que posee el ser humano para adaptarse al medio y la manera de superar exigencias de la vida. En este sentido podemos considerar a la ansiedad como una *defensa organizada frente a estímulos que rompen el equilibrio fisiológico y psicológico* (Blai, 2014, p. 24).

En la actualidad la ansiedad es una de los problemas y afecciones más comunes entre humanos, y la mayoría de personas lo sufrimos o nos vemos afectados por dicha condición en alguna época de la vida. Los trastornos de ansiedad constituyen las enfermedades psiquiátricas más frecuentes en el entorno socio-cultural y representan aquellas afecciones más atendidas por médicos generales. (Gilman & Goodman., 2011) (Ferre & Camarillo, 2013)

Como una manera de respuesta normal ante el temor y otros estímulos que suponen una condición de amenaza, la ansiedad tiene diversos componentes; entre los más importantes se puede mencionar los reflejos autónomos, comportamientos defensivos y pesimistas, estado de alerta, emociones negativas y secreción de glucocorticoides. (Ferre & Camarillo, 2013) En términos patológicos, la ansiedad puede describirse como la vivencia de un sentimiento de amenaza, expectación de carácter tenso ante el futuro inmediato y de alteración del equilibrio psicosomático ante acciones que no representan un peligro real o, por lo menos, desproporcionada en relación con el estímulo desencadenante. (Flórez, 2014)

1.12.11.1. Manifestaciones clínicas

La ansiedad afecta al pensamiento, el aprendizaje y la percepción. (Escamilla, 2011) Es así que la condición ansiosa frecuentemente tiende a manifestar ciertas distorsiones en la percepción en tiempo y espacio, respecto a hechos e individuos. Dichas distorsiones pueden tener efecto sobre el aprendizaje y la atención.

Los síntomas de la ansiedad se pueden definir en tres tipos; físicos, cognitivos y psicológicos.

Tabla 4-1. Síntomas de los trastornos de ansiedad.

Psicológicos	Miedos anticipatorios, estado de hipervigilancia (irritabilidad, sensibilidad al ruido) dificultad para concentrarse en su actividad diaria, inquietud, preocupaciones excesivas (en algunos casos obsesiones), ánimo bajo
Físicos	
Gastrointestinales	Sequedad de boca, disfagia, molestias epigástricas, meteorismo, alteración de ritmo intestinal
Respiratorios	Opresión centrotorácica, dificultad para la inspiración, hiperventilación
Cardiovasculares	Palpitaciones, dolor precordial
Genitourinarios	Disuria, urgencia miccional, disfunción eréctil, dismenorrea, amenorrea
Sistema neuromuscular	Temblor, parestesias, tinnitus, mareo, cefalea, mialgias
Alteraciones del sueño	Insomnio, terrores nocturnos
De conducta	Rituales, conducta de evitación
Cognoscitivos	Despersonalización, desrealización Hiperfocalización, dificultad en la elaboración de estrategias de enfrentamiento y análisis de causas

Fuente: Tomada de Escamilla. Trastornos de ansiedad (I). Trastorno de ansiedad generalizado. Trastorno de pánico. Medicine. 2011; 10(87). (Escamilla, 2011)

1.12.11.2. Causas de los trastornos ansiedad

La ansiedad como se mencionó anteriormente puede ser una condición normal de respuesta, pero cuando se pasa este umbral y se vuelve una patología el personal de salud, principalmente médicos especialistas y psicólogos necesitan conocer las causas de las cuales deriva la condición ansiosa, de tal manera se pueden citar ciertas causas que involucran una predisposición a un trastorno de ansiedad:

- ❖ Estilo de vida (condiciones de presión laboral, jornadas de trabajo extensas, sedentarismo, etc.)
- ❖ Falta de sueño (dormir menos de 7 horas con calidad de sueño)
- ❖ Alimentación (nutrición inconsistente, comidas a destiempo)
- ❖ Vicios (alcohol, tabaco)
- ❖ Factores fisiológicos (enfermedad que afecten el estilo de vida)
- ❖ Predisposición conductual (mal manejo ante condiciones de riesgo, malestar autónomo)
- ❖ Factores sociales (rechazo, acoso)

1.12.11.3. Tipos de Ansiedad

La ansiedad no es una enfermedad con un cuadro sintomático único. Existen varios tipos de ansiedad, varias vertientes de esta enfermedad como el TAG (Trastorno de Ansiedad Generalizado) suele ser el más común, pero no el único. Los trastornos obsesivos compulsivos, las crisis de angustia, la fobia social y los trastornos pos-traumáticos son sólo algunos de estos desordenes que pueden afectar la

vida del individuo y que pueden interferir en su quehacer diario así podemos clasificar a la ansiedad como. (Acosta, y otros, 2008)

Tabla 5-1. Tasas de prevalencia según los tipos de trastorno y porcentaje de población.

Tipo de trastorno	Porcentaje población
Trastorno de pánico sin agorafobia	0,8 % - 1 %
Trastorno de pánico con agorafobia	1,2 % - 3,8 %
Fobias específicas	4,1 % - 7,7 %
Fobia social	1,7 % - 2 %
Trastorno obsesivo compulsivo (t.o.c.)	1,6 % - 2,5 %
Trastorno de ansiedad generalizada (t.a.g.)	6,4 % - 7,6 %
Trastorno de estrés postraumático	1 %

Fuente: Virues, R. (2005) "Estudio sobre Ansiedad" México: Universidad Autónoma de Nuevo León

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

1.12.11.4. Tratamiento de la ansiedad

Dentro del grupo de fármacos más utilizados para combatir el trastorno de ansiedad encontramos los siguientes:

- ❖ Los Ansiolíticos en este grupo los más utilizados son las benzodiazepinas de alta potencia como el Alprazolam, Loracepam, Diacepam, Cloracepam, se tratan de farmacos que producen un efecto tranquilizante. Actúan reduciendo los síntomas de ansiedad en cuestión de minutos y disminuyendo tanto la intensidad como la frecuencia de los episodios de angustia.
- ❖ Los antidepresivos comúnmente empleados hoy en día en el tratamiento de los trastornos de angustia son los ISRS (Inhibidores Selectivos de la Recaptación de la Serotonina). Constituyen el tratamiento de elección primaria. Diversos estudios apuntan a la implicación de la serotonina como principal neurotransmisor involucrado en los trastornos de ansiedad, aunque hay otros. El grupo de los ISRS está constituido por la Fluoxetina, Paroxetina, Fluvoxamina, Sertralina, Citalopram y Escitalopram. (Flórez, 2014) (Ferre & Camarillo, 2013) (Escamilla, 2011)

Tabla 6-1. Dosis diaria recomendada en el tratamiento farmacológico de los trastornos de ansiedad.

	Primera línea		Segunda línea		Otras alternativas	
	Fármaco	Dosis (mg)	Fármaco	Dosis (mg)	Fármaco	Dosis (mg)
Trastorno por ansiedad generalizada	Escitalopram	10-20	Clonazepam	2-8	Quetiapina	50-300
	Paroxetina	20-40	Diazepam	10-30	Buspirona	10-20
	Sertralina	50-100	Cloracepato	15-45	Hidroxicina	25-75
	Fluoxetina	20-40	Imipramina	50-100		
	Fluvoxamina	100-300	Clomipramina	75-150		
	Venlafaxina	75-225	Pregabalina	75-300		
Trastorno por crisis de angustia o pánico	Duloxetina	60-120				
	Escitalopram	10-20	Clonazepam	2-8	Quetiapina	50-300
	Paroxetina	20-40	Diazepam	10-30	Valproato	300-1000
	Sertralina	50-100	Alprazolam	2- 6	Gabapentina	300-800
	Fluoxetina	20-40	Lorazepam	2-4		
	Fluvoxamina	100-300	Mirtazapina	15-30		
	Citalopram	10-30	Venlafaxina	75-300		
	Clomipramina	75-150				
Fobia simple	Imipramina	50-100				
Fobia social	Paroxetina	20-40	Escitalopram	10-20		
	Sertralina	50-200	Clonazepam	2-10		
	Fluvoxamina	100-300				
	Escitalopram	10-20				
	Paroxetina	20-40				
	Venlafaxina	75-150				

Fuente: Tomada de Ferre F, Camarillo L. Estado actual de tratamiento de ansiedad. Medicine. 2013; 11(46): p. 2752. (Ferre & Camarillo, 2013)

1.12.11.5. Efectos adversos e interacciones

Debido a todos los efectos adversos que pueden provocar los fármacos utilizados para la ansiedad se recomienda iniciar con dosis bajas el tratamiento, y asociarlos con tranquilizantes las primeras semanas. Otro inconveniente es que el efecto terapéutico no se inicia hasta las 2-3 semanas de iniciar la toma del antidepresivo

Tabla 7-1. Efectos adversos de los fármacos convencionales utilizados en la ansiedad.

Tratamiento Ansiedad	Efectos Adversos
Benzodiacepinas	Somnolencia
	Alteraciones de la memoria
	Alteraciones de la atención
	Alteraciones de la concentración
	Dependencia (adicción)
	Tolerancia (Pérdida progresiva de efectividad)
	Efectos tóxicos a causa de sobre dosis aguda
Antidepresivos (ISRS)	Ganancia de peso
	Somnolencia
	Disfunción sexual

Fuente: Tomada de Ferre F, Camarillo L. Estado actual de tratamiento de ansiedad. Medicine. 2013; 11(46): p. 2752. (Ferre & Camarillo, 2013)

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 20016

En relación con las benzodiazepinas, la pasiflora no tiene el efecto secundario negativo en el uso tanto a corto como a largo plazo. Las benzodiazepinas pueden conducir a sedación y la confusión significativa durante el día, y han sido asociadas con la abstinencia, síntoma que se presenta tras la interrupción súbita. La Administración de Drogas y Alimentos (FDA) clasifica a la pasiflora como "generalmente considerados como seguros", y los estudios de la pasiflora en humanos parece que es bien tolerado y sin efectos secundarios significativos, tales como somnolencia o alteraciones motoras. (KOLE, C. 2011)

- ❖ **Actividad antioxidante:** esta capacidad de los flavonoides es otorgada debido a la combinación de las propiedades quelantes que posee de hierro y a la vez el secuestro de radicales libres. Actúan inhibiendo las enzimas como las oxidasas, la lipoxigenasa, la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa, la ciclooxigenasa y la mieloperoxidasa. (Pérez, 2003, p. 17). Se ha demostrado que los polifenoles poseen una estructura química ideal para secuestrar radicales libres, lo que le aporta actividad antioxidante que es mayor que la producida por las vitaminas E y C *in vitro* (Blai, 2014 pág. 65). También, debido a su efecto antioxidante, estas sustancias pueden prevenir la formación de placas de ateroma, siendo beneficiosos en la prevención de la arterioesclerosis y el infarto del miocardio ((FAE), 2012 pág. 50).

Estas propiedades antioxidantes son el motivo de sus posibles implicaciones en la salud humana, como son la prevención del cáncer, de las enfermedades cardiovasculares o incluso de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

1.12.12. Prevención del cáncer

Los mecanismos a través de los que los compuestos fenólicos pueden prevenir el cáncer no están aun definitivamente establecidos. Estudios de laboratorio en animales de experimentación han puesto de manifiesto efectos y actividades biológicas muy variadas. Se cree que su función en algunos tipos de cáncer es dentro del proceso de inducción y proliferación de los tumores (62).

Potter (1996) recogieron datos procedentes de 206 estudios epidemiológicos, lo que puso de manifiesto que consumos elevados de frutas y hortalizas están relacionados con una baja incidencia de distintos tipos de cáncer, como los de estómago, pulmón, cavidad oral, faringe, endometrio, páncreas y colon. Sin embargo, en estos estudios es muy difícil discernir si el efecto es debido a un compuesto en concreto o si, lo más probable, es debido a un efecto sinérgico de distintos fitoquímicos presentes en estos alimentos como son, además de los polifenoles, las vitaminas C y E, los carotenos, el ácido fólico, la fibra, etc.

1.12.13. *Prevención de enfermedades cardiovasculares*

De todos los compuestos fenólicos, el grupo de los flavonoides es el más extendido en la naturaleza y dentro de ellos, los flavonoles son los que poseen una mayor actividad antioxidante. Estudios epidemiológicos han demostrado que una ingestión rica en flavonoides se correlaciona con un menor riesgo de enfermedad cardiovascular y se ha observado que actúan a diferentes niveles

Tabla 8-1. Efectos benéficos atribuidos a los compuestos fenólicos en la prevención de las enfermedades cardiovasculares.

- Disminución de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL)
- Disminución del proceso inflamatorio en la placa de ateroma
- Inhibición de la agregación plaquetaria
- Estimulación de la síntesis de óxido nítrico
- Estabilización de las fibras de colágeno de la pared arterial
- Actuación como fitoestrógenos (isoflavonas y lignanos)

Fuente: Petroni et al (1994); Mazur y Adlercreutz (1999)

1.12.14. *Alcaloides*

Los alcaloides son los metabolitos secundarios con mayor porcentaje de existencia en las plantas, estos se encuentran presentes en las semillas, raíces, cortezas y hojas; al estado libre o como glicósidos, o formando sales con ácidos orgánicos, poseen significativa actividad farmacológica como: antiespasmódico, anestésico local, sedante, analgésico, hipnótico, emético, expectorante, antipirético, amebicida, estimulante cardíaco, diurético, midriático, narcótico, tónico, emenagogo, antiséptico, vasoconstrictor, relajante muscular, antitumoral, hipotensoras. (Pallo, 2012 pág. 30)

1.12.11.4. 1.12.11.14.1. Harmano

Dentro de la familia *Passiflora* se describe la presencia de Harmano en la década de 1950, demostrando que se encuentra en cantidades apreciables. (Pallo, 2012 pág. 30) Tienen actividad sedante o hipnótica tienen, interactuar con una variedad de sistemas de neuroreceptores, y son inhibidores de la monoamino oxidasa (MAO) enzima.

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Lugar de recolección del material vegetal

Especie *Passiflora ligularis*, se recolectó en Ecuador, provincia Chimborazo, cantón Penipe, parroquia Puela, sector Manzano.

Punto de recolección:

Latitud: -1.6045601689869464

Longitud: -78.62596392631531

Altitud: 2670 msnm

2.2. Lugar de investigación

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, localizado en la provincia Chimborazo, cantón Riobamba, dentro del Grupo de Investigación de Productos Naturales y Farmacia (GIPRONAF) en el marco del proyecto institucional “Estudio comparativo de la actividad psicoactiva de pasifloras de la provincia de Chimborazo”.

2.3. Materiales, equipos y reactivos

2.3.1. Material vegetal

Las partes que se utilizaron de la planta *P. ligularis* fueron las flores y las hojas, las cuales se lavaron muy cuidadosamente con agua clorada, posteriormente fueron secadas durante tres días a una temperatura de 40 °C y se trituradas en el molino marca Arthur H. Thomas C.O hasta alcanzar un tamaño de partícula de 2 a 3 milímetros para los diferentes análisis físicos químicos.

2.3.2. Materiales

Tabla 1-2. Lista de materiales empleados en los diferentes ensayos.

MATERIAL	CANTIDAD
CONTROL DE CALIDAD DE MATERIA PRIMA	
Cápsulas de porcelana	2
Pisceta	1
Reverbero	1
Pinzas para cápsulas	2
TAMIZAJE FITOQUÍMICO	
Refrigerante de bolas	1

Balones esmerilados de 250mL	2
Pinzas universales	3
Mangueras	4
Reverbero	1
Embudos simples	1
Trípodes	1
Vasos de precipitación de 100mL	4
Tubos de ensayo	20
Gradilla	1
Pipeta de 5mL	3
Pipeta de 1mL	3
CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)	
Cuba cromatográfica	1
Capilares	10
Aspersor	1
Micropipeta automática de 100uL	1
Puntas amarillas de 100uL	10
EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN (ESPECTRO UV)	
Frasco de vidrio ámbar de 250mL	5
Vaso de 50mL	3
Balones aforados de 10mL	2
Balones aforados de 25mL	2
Balones aforados de 50mL	2
Balones aforados de 100mL	2
Probeta de 50mL	1
Micropipeta automática de 1000uL	1
Micropipeta automática de 100uL	1
Tubos de vidrio de 10mL	20
Puntas azules de 1000uL	20
Puntas amarillas de 100uL	20
Paquete de papel aluminio	1
CROMATOGRAFIA DE ALTA EFICACIA	
Cartucho de extracción C18	3
Filtro	2
Membrana	2
Balón aforado de 250mL	2
Cubeta	1
Jeringuilla de 10mL	1
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	
Balones esmerilados de 50mL	2
Tubos de vidrio de 10mL	30
Micropipeta automática de 1000uL	1
Micropipeta automática de 100uL	1
Puntas azules de 1000uL	20
Puntas amarillas de 100uL	20
Pipeta de 5mL	2
Gradilla	1
Papel aluminio	1
Balones aforados de 10mL	2
Balón aforado de 250mL	1
Probeta de 50 mL	1
Vasos de precipitación de 100mL	2
Vasos de precipitación de 50mL	2

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

2.3.3. Equipos

Tabla 2-2. Lista de equipos empleados en las diferentes determinaciones.

ANÁLISIS	EQUIPOS
Control de calidad materia prima y Tamizaje Fitoquímico	Molino Arthur H. Thomas C.O
	Sonicador Branson 2510
	Estufa RedLine by Binder
	Mufla SNOL 8.2/110
	Desecador
	Balanza analítica HDM
Cromatografía en capa fina (TLC)	Agitador magnético
	Cámara UV
Extracción y cuantificación de fenoles y flavonoides totales (espectro UV) y determinación de la capacidad antioxidante	Balanza analítica HDM
	Refrigerador
	Espectrofotómetro S-2150 Spectrophotometer
	Estufa RedLine by Binder
	Cronómetro
	Rotavapor R 110
Cromatografía de alta eficiencia (HPLC)	HPLC
	Desgacificador
	Bomba de vacío

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

2.3.4. Reactivos

Tabla 3-1. Lista de reactivos empleados en la investigación

ANÁLISIS	REACTIVOS
Tamizaje fitoquímico	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reactivo de Dragendorff ▪ Reactivo de Mayer ▪ Reactivo de Wagner ▪ Reactivo de Baljet ▪ Reactivo de Lieberman Buchard ▪ Reactivo para Catequinas ▪ Reactivo para resinas ▪ Reactivo de Fehling ▪ Reactivo de FeCl₃ ▪ Reactivo de Borntrager ▪ Reactivo de Shinoda ▪ Reactivo de Antocianidinas ▪ Cloruro férrico ▪ Magnesio metálico ▪ Cloruro de sodio (polvo)
Cromatografía en capa fina (TLC)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Papel cromatográfico ▪ Acetato de etilo

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ácido acético glacial ▪ Ácido fórmico Baker Analyzed Reagent ▪ Cloroformo ACS ▪ Agua bidestilada ▪ Metanol ▪ Acetato de etilo
Extracción y cuantificación de fenoles y flavonoides totales (espectro UV)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Soluciones de ácido gálico ▪ Metanol 98% ▪ Etanol 96% ▪ Agua destilada ▪ Agua bidestilada ▪ Nitrito de Sodio 5% ▪ Tricloruro de aluminio 10% ▪ Hidróxido de sodio 1M ▪ Soluciones de quercetina ▪ Carbonato de sodio saturado ▪ Reactivo de Folin-Ciocalteu 20%
Determinación de la actividad antioxidante	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Agua bidestilada ▪ DPPH ▪ Metanol 98.8% ▪ Agua destilada ▪ Etanol 96%
Cromatografía de alta eficiencia	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Agua bidestilada ▪ Acido fórmico ▪ Ácido clorhídrico fumante 37% ACS ▪ Hexano ACS ▪ Acetonitrilo grado HPLC ▪ Metanol grado HPLC ▪ Solución de Apigenina ▪ Solución de Quercetina ▪ Solución de Luteolina

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

2.4. Acondicionamiento de la materia vegetal *P. ligularis*

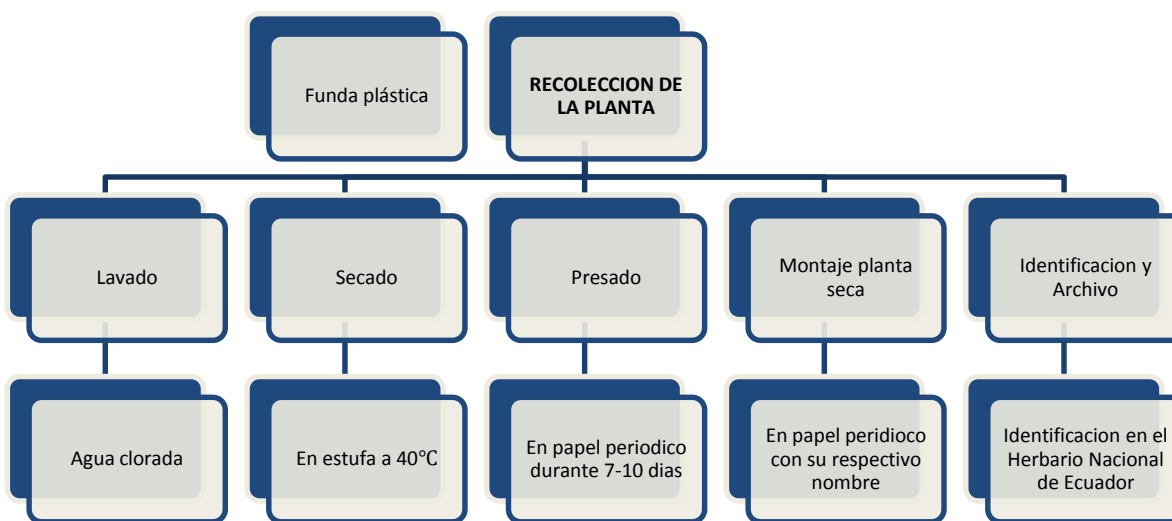


Figura 1-2. Acondicionamiento de la materia vegetal de la especie *Passiflora ligularis*.

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

2.4.1. Selección

Se escogió la materia prima necesaria y suficiente la cual cumplió con todos los parámetros establecidos y se encontró en condiciones adecuadas y perfectas para la realización de las diferentes pruebas.

2.4.2. Lavado

La materia seleccionada se procedió a lavar, para ello se utilizó agua o agua clorada la misma que eliminó cualquier impureza que pueda contaminar la muestra.

2.4.3. Secado

La planta limpia se procedió a secar para ello se le colocó en una mufla a 40 °C con constante vigilancia para evitar el daño de la misma.

2.4.4. Molienda

En la molienda se logró reducir el tamaño de la materia vegetal hasta obtener un tamaño de partícula de 2 a 3 milímetros la cual fue utilizada para el proceso de extracción. Una vez que la materia prima estuvo completamente adecuada se procedió a guardar en fundas limpias libres de contaminantes.

2.5. Técnicas y Métodos

Para las diferentes pruebas de control de la materia vegetal se utilizó la metodología descrita por Miranda.

2.5.1. Determinación del contenido de humedad

El contenido de Humedad se determinará mediante el método Gravimétrico de estufa de aire caliente. (Miranda, 2006, pp. 32-62)

2.5.2. Determinación de cenizas totales

La cantidad de Cenizas Totales se determinará mediante el método en mufla. (Miranda, 2006, pp. 32-62)

2.5.3. Determinación de cenizas solubles en agua

El contenido de Cenizas Solubles en agua se determinará mediante el método de la mufla (Miranda, 2006, pp. 32-62)

2.5.4. Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

El contenido de Cenizas solubles en agua se determinara mediante el método de la mufla. (Miranda, 2006, pp. 32-62)

2.5.5. Tamizaje Fitoquímico.

Se realizaron diferentes extractos a partir de las hojas y flores de la especie *P. ligularis*, a los cuales se midió el volumen obtenido y se calculó la concentración, esto es miligramos de sustancias extraídas por mL de extracto. (Miranda, 2006, pp. 32-62)

La obtención de los extractos se realizó de acuerdo al siguiente diagrama:

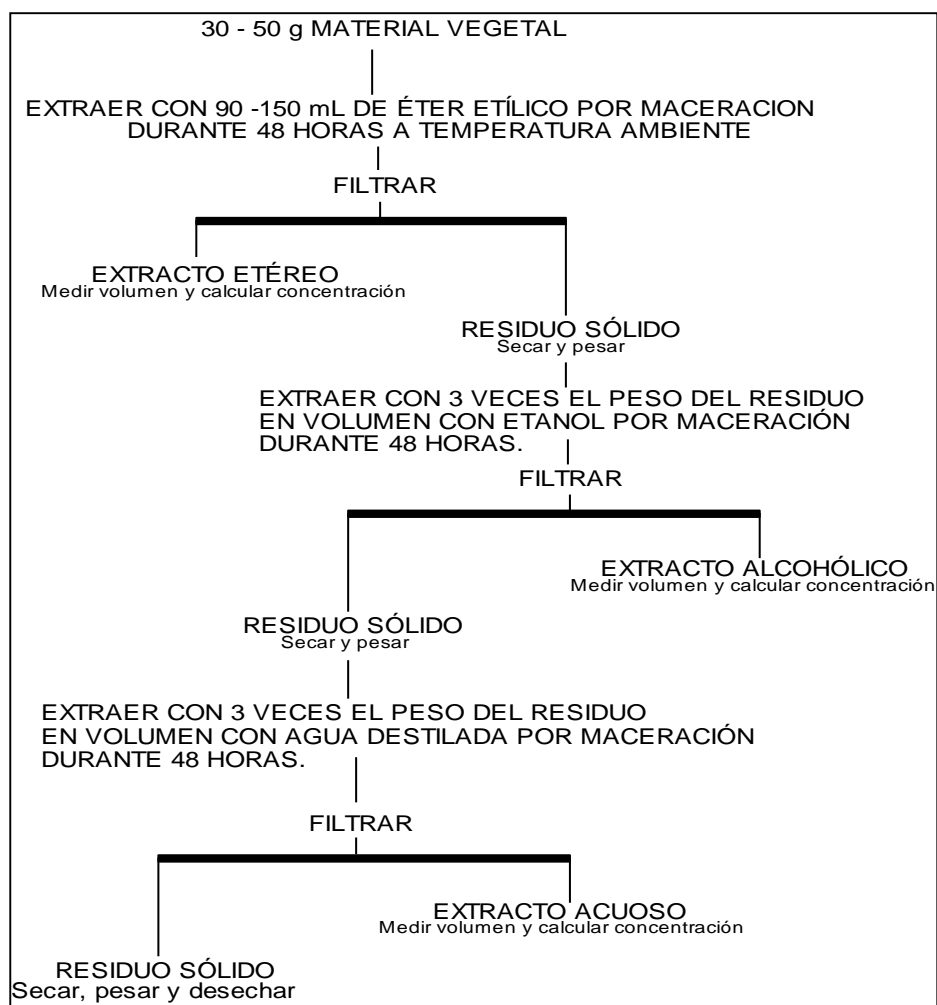


Figura 2-2. Diagrama de flujo para obtención de extractos de *P. ligularis*

Fuente: (Miranda, 2006, pp. 32-62).

A partir de la elaboración de los diferentes extractos se procede a realizar el tamizaje fitoquímico, en esta fase se lograra identificar y establecer cualitativamente los grupos químicos importantes presentes en la especie *P. ligularis*.

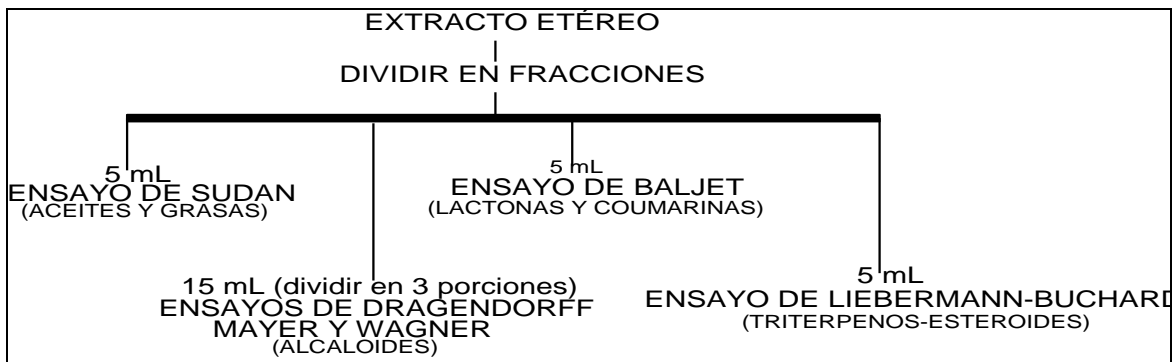


Figura 3-2. Tamizaje Fitoquímico extracto etéreo.

Fuente: (Miranda, 2006, pp. 32-62).

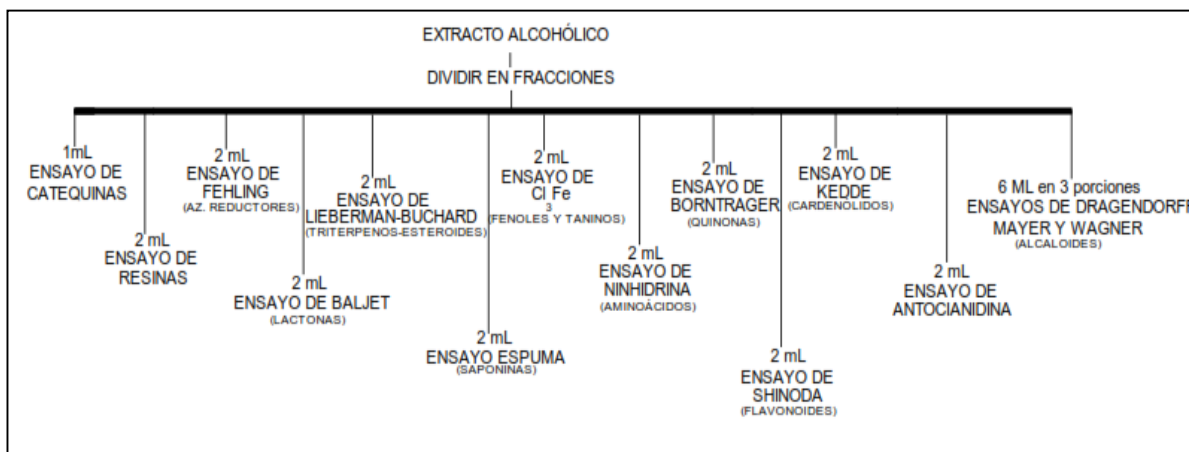
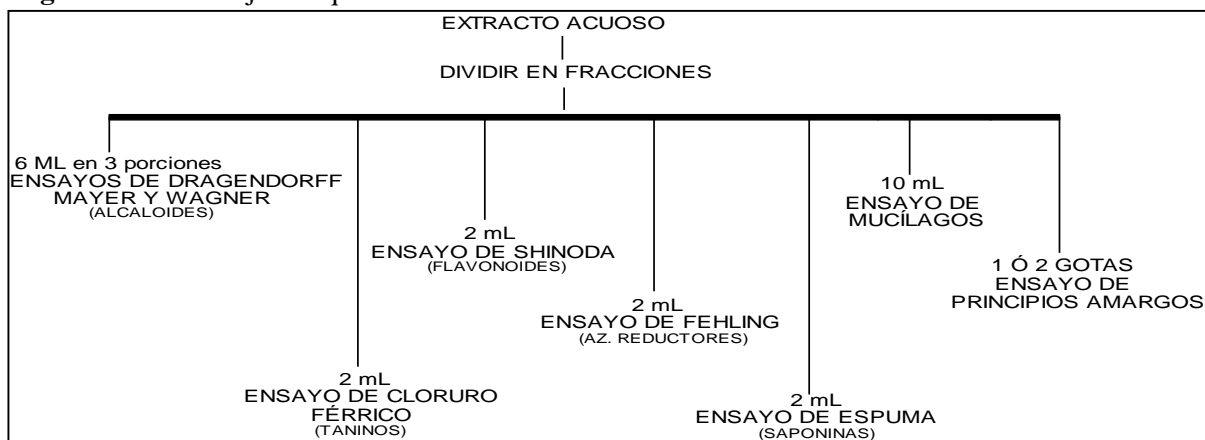


Figura 4-2. Tamizaje Fitoquímico extracto alcohólico.

Fuente: (Miranda, 2006, pp. 32-62).

Figura 5-2. Tamizaje Fitoquímico extracto acuoso.



Fuente: (Miranda, 2006, pp. 32-62).

2.5.6. Preparación del extracto de *P. ligularis* y cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina (TLC) se utilizó con el propósito de identificar los componentes químicos presentes en la planta para ello se probó varios métodos de extracción y a su vez varias fases móviles hasta encontrar una que nos proporcione buena eficiencia y resolución.

2.5.6.1. Métodos de preparación de los extractos

2.5.6.1.1. Extracción por sonicación de flavonoides

- Se pesaron 3 muestras con 2 gramos de materia vegetal en polvo respectivamente
- Añadir en cada muestra 15 ml de acetato de etilo, 15 mL de agua y 15 mL de alcohol respectivamente
- Sonificar durante un periodo de 30 minutos realizando una revisión a la mitad del tiempo.
- Filtrar cada extracto y guardar en frascos ámbar limpios.
- Realizar cromatografía

Mediante este método de extracción se obtuvo tres extractos con los cuales se realizaron cromatografías utilizando las siguientes fases móviles:

- Tolueno, metilisobutil cetona, acetato de etilo, agua (5: 3:1:1)

CONSTANTE DIELECTRICA DEL SISTEMA: 13,93

REVELADOR: UV

- Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético, agua, metil isobutil cetona (6:0,5:0,5,:1:4)

REVELADOR: vapores de NH₃

- Acetato de etilo, acetona, ácido acético, agua (6:2:1:1)

REVELADOR: UV

- Tolueno, acetato de etilo, ácido acético, agua (3.6:1.2:1:1)

REVELADOR: UV

- Metil isobutil cetona, ácido fórmico, acetato de etilo, ácido acético, agua (2.6:0,7:7:2:1)

REVELADOR: UV

- Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético, agua, (80:1:8:10)

REVELADOR: UV

2.5.6.1.2. Extracción por infusión y sonicación de flavonoides

- Se pesó 1 g de la materia vegetal de hojas y flores de la especie *P. ligularis*
- Adicionar 10 mL metanol al 98% , llevar a infusión y sonicación durante 5 min
- Obtener el extracto metanólico, filtrar y separar
- Adicionar acetato de plomo para precipitar clorofilas, centrifugar y separar
- Al extracto metanólico sin clorofilas se dividió en dos partes iguales
- Con la primera se realizó una cromatografía y con la otra parte se realizó una hidrólisis durante 2 h, con HCl 2 N, a una temperatura de 80 °C
- A la porción hidrolizada se le realizó una cromatografía en capa fina

Las fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico se corrieron en las siguientes fases móviles:

Fracción no hidrolizada

- Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético, agua, (100:11:11:26)

CONSTANTE DIELECTRICA DEL SISTEMA: 34.382

REVELADOR: UV

Fracción hidrolizada

- Cloroformo, metanol, agua, (40:9:11)

CONSTANTE DIELECTRICA DEL SISTEMA: 13.91

REVELADOR: UV

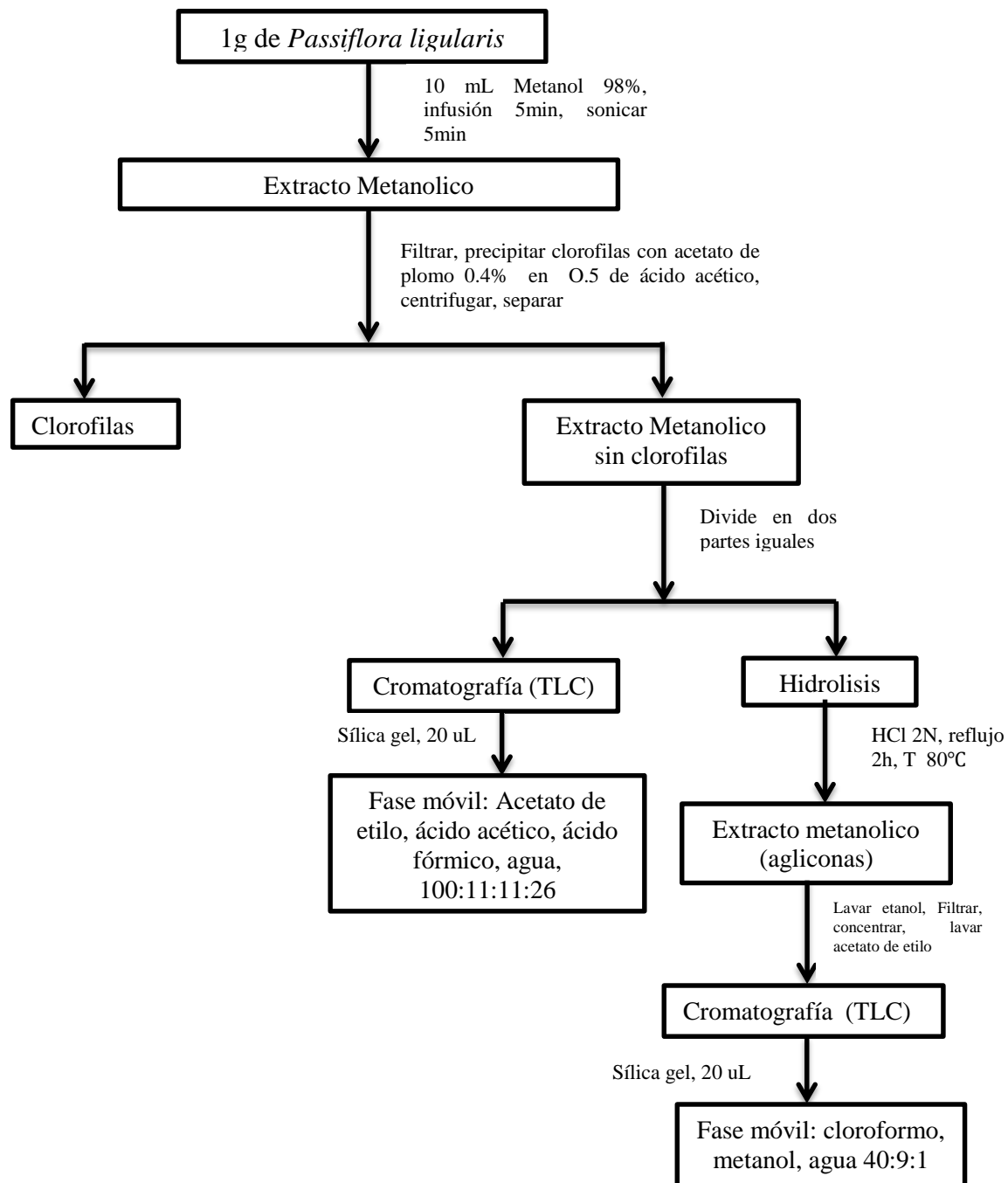


Figura 6-2. Diagrama de flujo de extractos de *P. ligularis* para TLC.

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

2.5.7. *Cuantificación de fenoles totales mediante un método colorimétrico*

Se procedió a cuantificar fenoles totales presentes en el extracto metanólico 98%, para lo cual se prepara una curva de calibración con un estándar ácido gálico a determinadas concentraciones: 20; 40; 60; 80 y 100 mg/L.

- Se pesaron 5 g de materia vegetal de hojas y flores de la especie *P. ligularis*
- Se añadió 50 mL de acetato de etilo 100%, maceró por 12 h, sónico 1 h, se filtró y separo
- El extracto de acetato de etilo se concentró hasta sequedad mientras que al residuo vegetal se le añadió 50 mL de metanol al 98% se maceró por 12 horas, sónico durante 1 h, se filtró y separo
- El extracto de metanolico obtenido se concentró hasta sequedad
- Se volvió a pesar 5 g de materia vegetal, se añadió 50 mL de etanol al 70% se maceró por 12 horas, sónico durante 1 h, se filtró y separo
- Al extracto etanólico obtenido se le concentró hasta sequedad
- A las tres muestras concentradas se las redisolvió con 10 mL de metanol
- Se prepararon disoluciones a partir de los diferentes extractos para acetato de etilo se realizó una disolución de 1/100 en hojas, y 1/500 en flores, para el extracto metanolico una disolución de 1/2500 en hojas y 1/500 en flores y para el extracto etanólico una disolución en 1/5000 en hojas y 1/1000 en flores
- Se tomó 2mL de muestra o estándar diluido
- Se añadió 0.5mL de reactivo Folin-Ciocalteu 20%
- Después de 5 minutos se añadió 0.5mL de solución de carbonato de sodio saturado (75g/L)
- Inmediatamente se añadió 5mL de agua destilada
- Se dejó reposar la mezcla por una hora bajo sombra a temperatura ambiente
- Se efectuó las lecturas a una longitud de onda de 765nm
- Trazar la curva de calibración (concentración vs absorbancia). (Hua & Teik, 2012, pp.122-127)

Los resultados se expresan como miligramos equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramos de muestra seca.

$$x = \frac{A * B * C}{\text{Peso muestra seca}(5g)}$$

Dónde:

X= mg/g de fenoles totales expresados como ácido gálico

A= Concentración del extracto obtenido por interpolación en la curva de calibración ppm

B= Volumen de redisolución (10 mL)

C= Factor de dilución de los diferentes extractos

2.5.8. *Cuantificación de flavonoides totales mediante un método colorimétrico*

Se cuantificó flavonoides presentes en el extracto metanólico 98%, para lo cual se preparó una curva de calibración con estándar quercetina a concentraciones: 20; 40; 60; 80 y 100 mg/L.

- Se pesaron 5 g de materia vegetal de hojas y flores de la especie *P. ligularis*
- Se añadió 50 mL de acetato de etilo 100%, maceró por 12 h, sónico durante 1 h, se filtró y separo
- El extracto de acetato de etilo se concentró hasta sequedad mientras que al residuo vegetal se le añadió 50 mL de metanol al 98% se maceró por 12 horas, sónico durante 1 h, se filtró y separo
- El extracto de metanolico obtenido se concentró hasta sequedad
- Se volvió a pesar 5 g de materia vegetal, se añadió 50 mL de metanol al 70% se maceró por 12 horas, sónico durante 1 h, se filtró y separo
- Al extracto etanólico obtenido se le concentró hasta sequedad
- A las tres muestras concentradas se las redisolvió con 10 mL de metanol
- Se preparó disoluciones a partir de los diferentes extractos en acetato de etilo se realizó una disolución de 1/50 hojas, y 1/25 en flores, para el extracto metanolico una disolución 1/250 en hojas y 1/50 flores, para el extracto etanólico una disolución 1/5000 en hojas y 1/100 en flores
- Se tomó 1mL de la muestra o estándar diluido
- Se añadió 4mL de agua destilada.
- A tiempo cero se añadió 0.3mL de NaNO₂ al 5%.
- Después de 5 minutos se adicionó 0.3mL de AlCl₃ al 10%
- Se esperó 6 minutos y se añadió 2mL de NaOH 1M.
- Se mezcló y dejó en reposo por 5 minutos a temperatura ambiente bajo sombra
- Leer la absorbancia de la mezcla caracterizada por un color rosado a 510 nm.
- Trazar la curva de calibración (concentración vs absorbancia) (Boukhris, Simmonds, Sayadi, & Bouaziz, 2012, pp.1-8)

Los flavonoides totales se expresan como miligramos equivalentes de quercetina (QE) por gramos de muestra seca.

$$x = \frac{A * B * C}{\text{Peso muestra seca}(5g)}$$

Dónde:

X= mg/g de fenoles totales expresados como quercetina

A= Concentración del extracto obtenido por interpolación en la curva de calibración ppm

B= Volumen de redisolución (10 mL)

C= Factor de dilución de los diferentes extractos

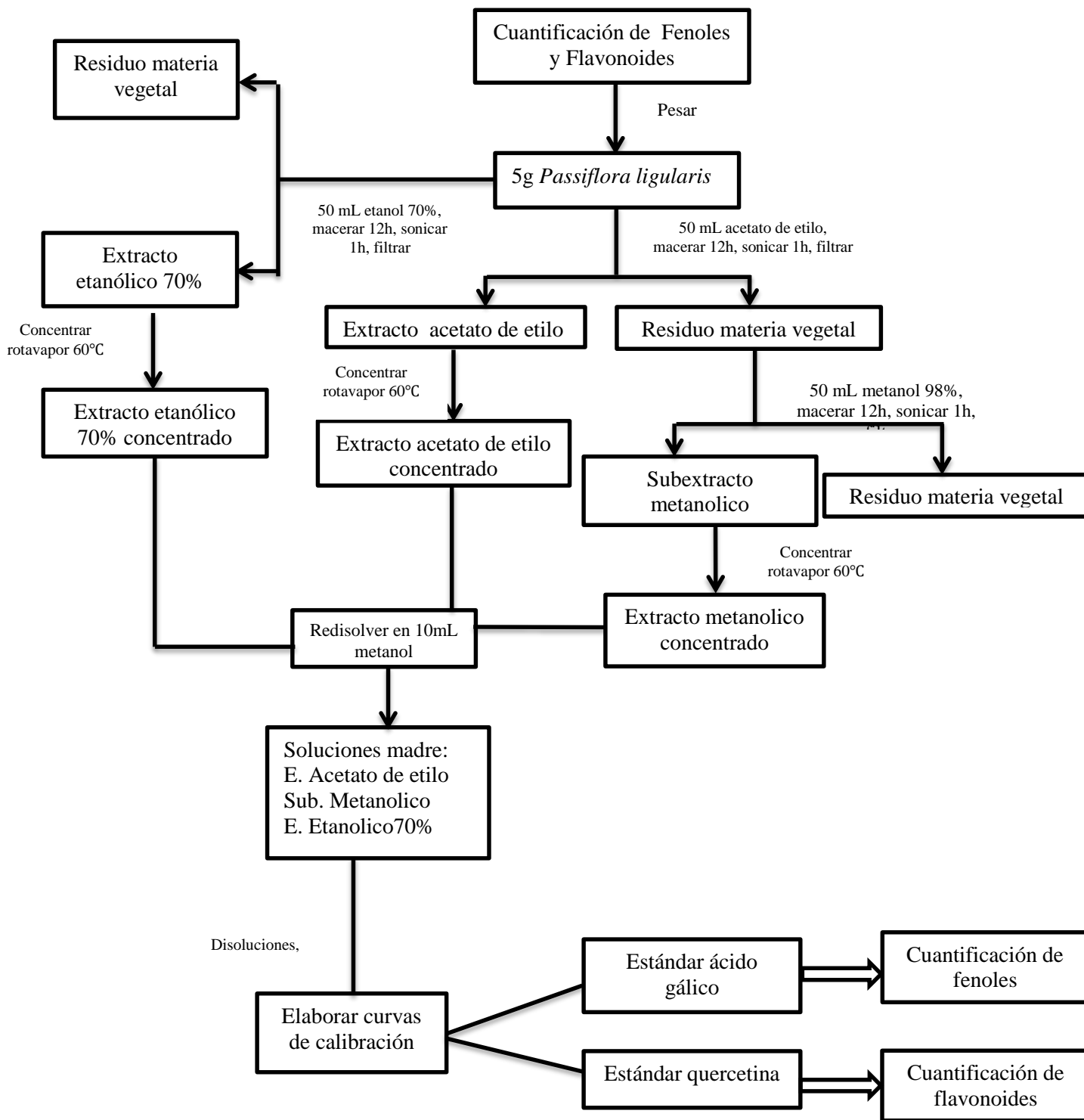


Figura 7-2. Diagrama de flujo de cuantificación de fenoles y flavonoides, de los extractos de *P. ligularis*.

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

2.5.9. Análisis HPLC

El análisis HPLC se realizó en una columna Supelco LC-18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) con una fase móvil ácido fórmico 0,1%: acetonitrilo: metanol (60:16:24) a 30±1°C con un flujo de 1.0mL/min. El volumen de inyección utilizado fue 10 µL, a una longitud de onda de 350 nm para el análisis cuantitativo, la proporción de los componentes de la fase móvil es tomada del estudio realizado por Chen, Kong, Song, Li & Jiang, Huidi en el año 2012. Los reactivos empleados, tanto aceto nitrilo y metanol tienen grado HPLC, mientras el reactivo ácido fórmico Baker Analyzed Reagente.

2.5.9.1. Preparación de las soluciones de trabajo

Las soluciones patrón de apigenina y luteolina (aproximadamente 0.5 mg/mL) y de quercetina (aproximadamente 1 mg/mL) fueron preparadas disolviendo las cantidades pertinentes de las referencias en metanol, respectivamente.

A partir de la solución madre se elaborarán soluciones patrón de 5 µg/mL para apigenina y luteolina y de 10 µg/mL para quercetina.

2.5.9.2. Preparación de la muestra problema

- Se pesaron 0,5 g de materia vegetal de la especie *P. ligularis*
- A la muestra se le añadió 10mL de hexano+ 10mL de etanol al 70% y agitó en el vortex durante 15 minutos
- Filtró y lavó la muestra con 10mL de hexano+ 10mL de etanol al 70%
- La fase hexánica fue separada de la fase hidroalcohólica
- A la fase hidroalcohólica se hidrolizó con HCl 2N, durante 2h y a 80°C
- Se acondicionó el cartucho C18 con ayuda de metanol
- La muestra hidrolizada se pasó por el cartucho previamente acondicionado
- Eluir la muestra con metanol guardarla y llevarla al HPLC

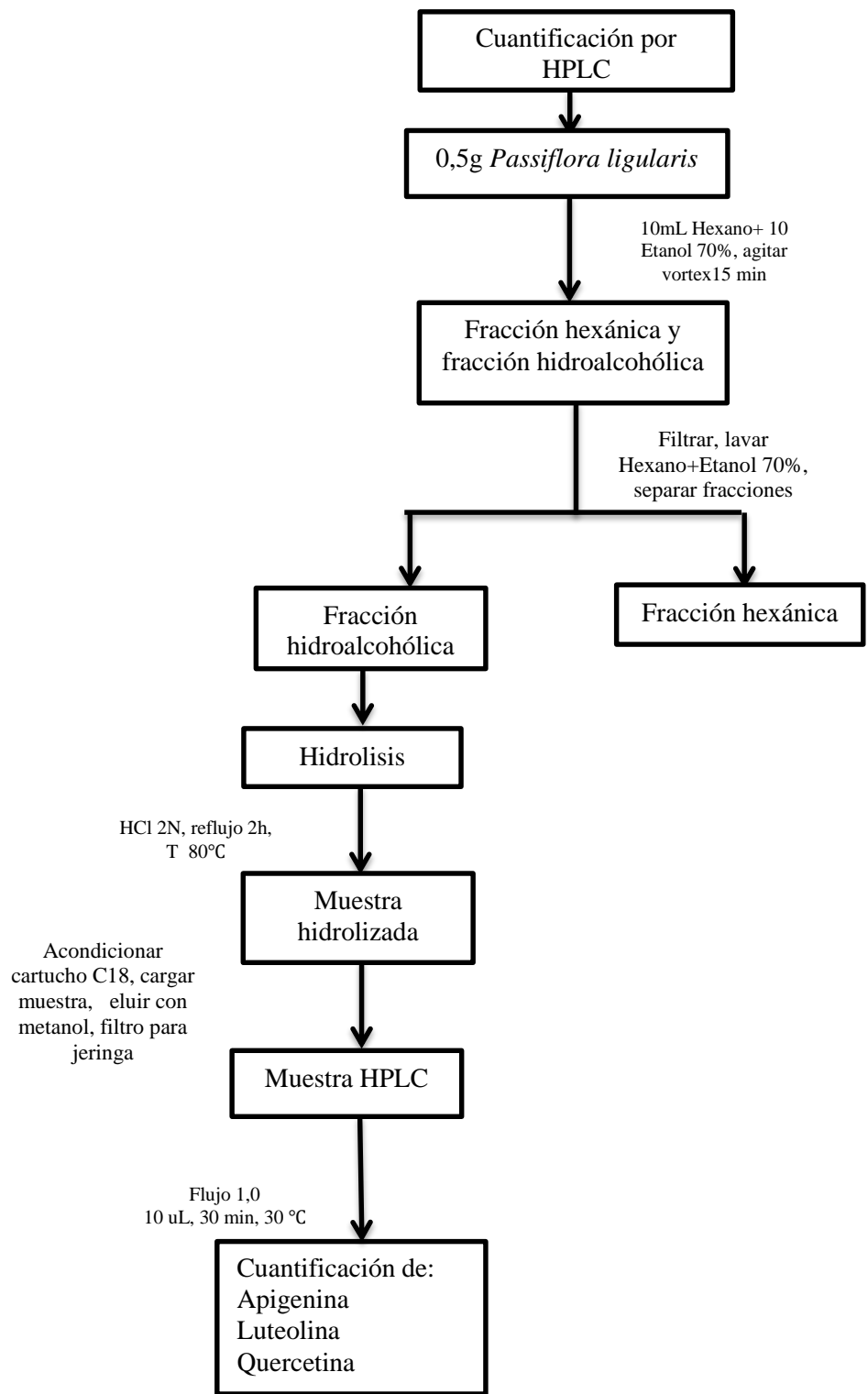


Figura 8-2. Diagrama de cuantificación de extractos de *P. ligularis* mediante HPLC.

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

2.5.10. Actividad captadora de radicales libres

Se procede a cuantificar la actividad antioxidantes del extracto metanolico de hojas y flores de *P. ligularis* mediante la utilización de 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH).

2.5.10.1. Preparación del DPPH

La solución de DPPH se preparó a 60 μM concentración que fué tomada del estudio realizado por W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier and C. Berset en el año 1994 para ello se pesó 5,9 mg de DPPH y se aforó a 250 mL con metanol.

La solución elaborada fue almacenada en un frasco ámbar y puesto en refrigeración para no perder estabilidad.

2.5.10.2. Preparación de la muestra

- Se pesó 5 g de materia vegetal seca de la especie *P. ligularis*
- Se adicionó 50 mL de metanol al 99.8%, macerar por 12 horas y sonicar durante 1 hora
- Filtró mediante un embudo bushner y obtener el extracto metanolico
- Al extracto metanolico se le concentró hasta sequedad
- La muestra concentrada fué redisuelta con metanol al 99.8%

A partir de la muestra madre de extracto metanolico de hojas y flores de *P. ligularis* se elaboran diferentes disoluciones con las cuales se procede a realizar el siguiente procedimiento:

2.5.10.3. Cuantificación de la actividad captadora de radicales libres

- Se tomó 100 μL de la muestra o disolución correspondiente
- A los 100 μL se adicionó 3.9 de solución DPPH
- Se dejó en reposo durante 30 minutos
- Leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 515 nm
- Se elaboró curva de calibración, además se obtuvo el IC 50

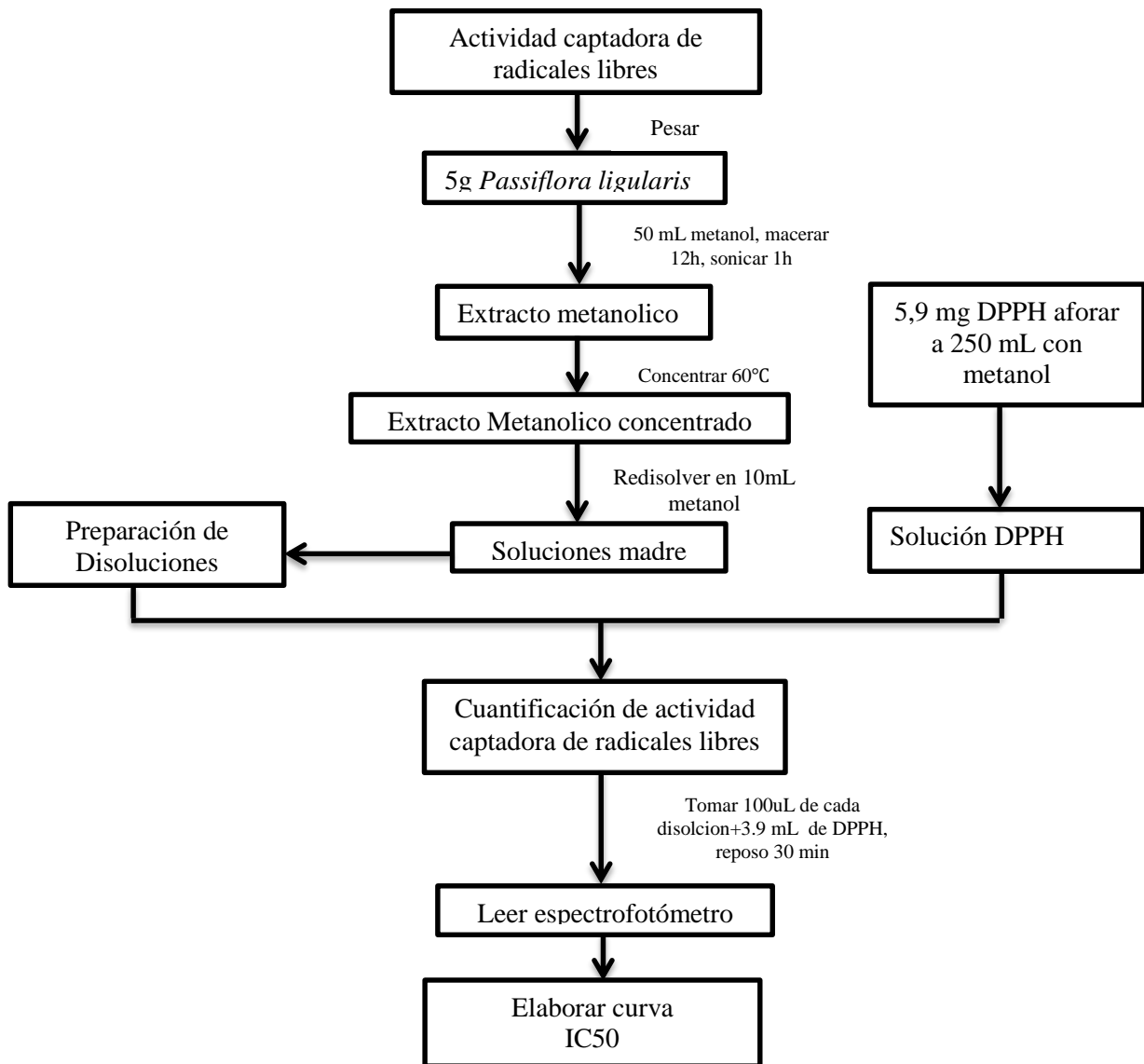


Figura 9-2. Diagrama de flujo de la actividad captadora de radicales libres en la especie *P. ligularis*.

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Mediante la realización de los diferentes ensayos en hojas y flores de la especie *Passiflora ligularis* se obtuvieron los diferentes resultados.

3.1. Control de calidad materia vegetal

Cuadro 1-3. Control de calidad de las hojas de la planta seca *P. ligularis*.

Parámetros	Hojas <i>P. ligularis</i>	Flores <i>P. ligularis</i>	Especificaciones USP# 28
Contenido de humedad (%)	9,32±0,01	9,92±0,01	7-14%
Contenido de cenizas totales (%)	7,29±0,05	7,58±0,02	Hasta 12%
Contenido de cenizas solubles en agua (%)	4,77±0,01	4,50±0,01	Hasta 7%
Contenido de cenizas insolubles en Ácido clorhídrico	2,53±0,02	2,22±0,02	Hasta 5%

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

En el cuadro N°1-3 se expresa los resultado obtenidos a través del ensayo de control de calidad donde se indican ciertos parámetros como el porcentaje de humedad de la planta seca tanto en hojas 9,32% como en flores 9,92%, demostrando que los valores obtenidos se encuentra dentro de los rangos establecidos para materia vegetal según la USP # 28, lo cual indica que las condiciones de secado, conservación y almacenamiento son óptimas. El contenido de humedad nos ayuda a conocer sobre la estabilidad de la materia vegetal, si hay pequeños porcentajes de agua se evita el crecimiento bacteriano y micótico.

Se muestra, además, que para hojas el porcentaje de cenizas totales fue de 7,29%; cenizas solubles en agua de 4,77% y de cenizas insolubles en ácido clorhídrico de 2,53%. Mientras que para las flores se obtuvo 7,58% para cenizas totales; 4,50% de cenizas solubles en agua; y 2,22% de cenizas insolubles en ácido clorhídrico, valores que están dentro de los establecidos por la USP # 28, lo que significa que la recolección de la materia prima fue adecuada.

La determinación de cenizas totales es un indicativo del contenido de minerales en la muestra vegetal, considerada como una medida general de calidad porque la materia mineral puede estar inmiscuida en alguna acción farmacológica; si existe un porcentaje elevado de cenizas insolubles en ácido quiere

decir que la materia prima no se recolectó adecuadamente y puede estar contaminada con arena, tierra silíceas.

3.2. TAMIZAJE FITOQUIMICO

En los cuadros N°2-3 y 3-3 se muestra las concentraciones de sólidos totales obtenidas a partir de los diferentes extractos de hojas y flores de *P. ligularis*, presentando mayor concentración el extracto alcohólico con 37,4 mg/mL en hojas y 24,0 mg/mL flores, seguido del acuoso con 25,2 mg/mL hojas y 19,7 mg/mL flores y por último el etéreo que presenta en hojas 12,9 mg/mL y 5,2 mg/mL en flores.

El porcentaje de extracción obtenido para las hojas fue de 59 % extracto alcohólico, 47% extracto acuoso y 22% extracto etéreo mientras que para las flores fue 62% extracto alcohólico, 40% extracto acuoso y 33% extracto etéreo. Todo esto indica que el mejor extracto fue el alcohólico ya que a partir de él se obtiene mayor porcentaje de extracción, indicando que el solvente más adecuado para extraer es el etanólico ya que presenta mayor rendimiento es decir extrae de mejor manera los compuestos de interés.

Cuadro 2-3. Concentraciones de los extractos de hojas de *P. ligularis*

EXTRACTOS DE HOJAS	CONCENTRACIÓN mg/ml	% DE EXTRACCIÓN
ETÉREO	12,9±0.0186	22%
ALCOHÓLICO	37,4±0.0053	59%
ACUOSO	25,2±0.0042	47%

Cuadro 3-1. Concentraciones de los extractos de flores de *P. ligularis*

EXTRACTOS DE FLORES	CONCENTRACIÓN mg/mL	% DE EXTRACCIÓN
ETEREO	5,2±0.0003	33%
ALCOHÓLICO	24,0±0.0006	62%
ACUOSO	19,7±0.0004	40%

Cuadro 4-3. Tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso de hojas de *P. ligularis*.

Ensayo	Metabolito	Ex. Etéreo	Ex. Alcohólico	Ex. Acuoso
Sudán	Aceites y grasas	++	NA	NA
Dragendorff	Alcaloides	-	+	+
Mayer	Alcaloides	-	+	+
Wagner	Alacloides	-	+	+
Baljet	Lactonas y Cumarinas	-	++	NA
Liebermann-Buchard	Triterpenos y/o esteroides	+++	++	NA
Catequinas	Catequinas	NA	-	NA
Resinas	Resinas	NA	-	NA
Fehling	Azúcares reductores	NA	-	-
Espuma	Saponinas	NA	+++	+++
Cl₃Fe	Taninos	NA	+++ Coloración verde intensa	+++ Coloración verde intensa
Borntrager	Quinonas	NA	-	NA
Shinoda	Flavonoides	NA	+++ Coloración amarilla	+++ Coloración Amarilla
Antocianidina	Flavonoides	NA	++	NA
Mucílagos	Mucílagos	NA	NA	-
Principios Amargos	Principios amargos	NA	NA	+

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

Dónde: +++ (Abundante); ++ (Moderado); + (Escaso); - (Negativo); N/A (No aplica)

Cuadro 5-3. Tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso de flores de *P. ligularis*.

Ensayo	Metabolito	Ex. Etéreo	Ex. Alcohólico	Ex. Acuoso
Sudán	Aceites y grasas	++	NA	NA
Dragendorff	Alcaloides	-	+	+
Mayer	Alcaloides	-	+	+
Wagner	Alacloides	-	+	+
Baljet	Lactonas y Cumarinas	++	++	NA
Liebermann-Buchard	Triterpenos y/o esteroides	++	++	NA
Catequinas	Catequinas	NA	+	NA
Resinas	Resinas	NA	-	NA
Fehling	Azúcares reductores	NA	-	-
Espuma	Saponinas	NA	-	-
Cl₃Fe	Taninos	NA	+++ Coloración rojo vino	+++ Coloración rojo vino
Borntrager	Quinonas	NA	-	
Shinoda	Flavonoides	NA	+++ Coloración rojo vino	+++ Coloración roja
Antocianidina	Flavonoides	NA	+++	NA
Mucílagos	Mucílagos	NA	NA	-
Principios Amargos	Principios amargos	NA	NA	+

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

Dónde: +++ (Abundante); ++ (Moderado); + (Escaso); - (Negativo); N/A (No aplica)

Cuadro 6-2. Ensayo de glicósidos cianogénicos en hojas y flores de *P. ligularis*.

	Ensayo	Resultado
Hojas	Glicósidos cianogénicos	NEGATIVO
Flores	Glicósidos cianogénicos	NEGATIVO

Los resultados obtenidos a través del tamizaje fitoquímico en los diferentes extractos de hojas y flores de *P. ligularis*, demuestran cualitativamente la presencia de metabolitos. En el extracto etéreo hay aceites y grasas, además de triterpenos y/o esteroides; en el extracto alcohólico, presencia de alcaloides, lactonas y cumarinas, triterpenos y/o esteroides, saponinas, taninos, flavonoides; mientras que en el extracto acuoso, presencia de alcaloides, saponinas, taninos y principios amargos. Para el ensayo de glicósidos cianogénicos el resultado que se obtuvo fue negativo tanto para hojas como para flores

Los compuestos fenólicos y flavonoides se encuentran en mayor cantidad pudiendo decir que son los metabolitos responsables de la actividad ansiolítica además de ser los representantes en el vegetal., demostrando que son los responsables de otorgar resistencia contra la fotooxidación de la luz ultravioleta del sol, intervienen en el transporte de hormonas, defensa ante los depredadores, resistencia a las infecciones fúngicas y virales. Otra propiedad es la de antioxidante, la cual puede deberse a sus capacidades reductoras o por influenciar el estado de oxidación/reducción (*redox*) intracelular. Este potencial antioxidante ha sido asociado con la reducción del riesgo de ciertas enfermedades crónicas, la prevención de algunas enfermedades cardiovasculares y de algunas clases de cáncer, además se describen propiedades antiinflamatorias y ansiolíticas por producir efectos sobre el SNC. Esta explicación se relaciona con el estudio realizado por Reyes, R. Ubaldo-Suárez, D. Araujo-Escalona, A. (2012), donde explican la función que cumplen los flavonoides dentro de la planta y el hombre.

Los resultados del tamizaje fitoquímico se corroboran con varios estudios de especies de la familia *Passifloracea*, Chittaranjan. K (2011), Spinella. M (2001), Cooper. E y Yamaguchi. N (2002), Lader. M y colaboradores (2006), Watson. R y Preedy. V (2008) indican que la familia *Passiflora* se caracteriza por tener flavonoides y alcaloides indólicos en su composición química llegando a determinar que el flavonoide crisina y flavonoides glicosilados como vitexina, isovitexina e isoorientina dan la actividad ansiolítica y en la mayoría de especies también el alcaloide harmano. Por otra parte, existe literatura de los triterpenos con reportes de acción estimulante y depresora del Sistema Nervioso Central (Cuellar et. al, 2001). Mientras que Mercado, G. Carrillo, L. Medrano, A.

Díaz, J. y Parrilla, E. en su trabajo muestran los efectos potenciales que presentan los compuestos fenólicos en la actividad antioxidante. Carvajal-de Pabón, L, Turbay y colaboradores (2014) describen la composición fitoquímica de la especie *P. ligularis* demostrando la existencia de flavonoides y compuestos fenólicos en flores y hojas.

3.2.1. Cromatografía en capa fina de la fracción flavónica no hidrolizada de hojas y flores

En la porción no hidrolizada se procedió a obtener la fracción flavónica previamente preparada en la fase móvil acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua en proporciones (100:11:11:26).

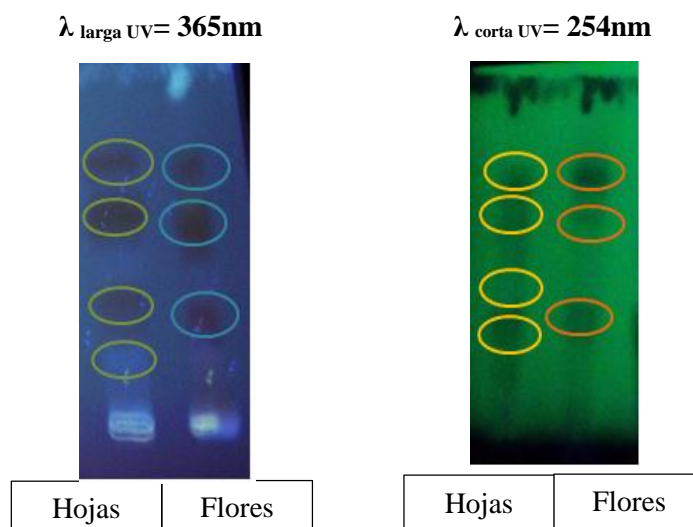


Figura 1-3. Cromatografía en capa fina de la fracción flavónica no hidrolizada de hojas y flores de *P. ligularis*

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

Adsorbentes: Sílica gel 60PF 254 (Sigma Aldrich)

Sistema de solventes: Acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético-agua (100:11:11:26)

Revelador: UV λ larga λ corta

Cuadro 7-3. Resultados de la determinación de Rf de la cromatografía en capa fina de la fracción flavónica de hojas y flores de *P. ligularis*

MUESTRAS	OBSERVADAS	Rf	COMPUESTO IDENTIFICADO
Hojas	1	0,29	Vitexina 2 ^o -O-glucosido
	2	0,41	Isoorientina
	3	0,61	Vitexina
	4	0,74	Quercetina 3 ^o -O-glucosido
Flores	1	0,32	Vitexina 2 ^o -O-glucosido
	2	0,58	Orientina
	3	0,64	Vitexina

Realizado por: Nataly Pinduisaca 2016

Revelador: UV λ larga λ corta

Los resultados descritos en el cuadro N° 6-3 muestran la presencia de metabolitos encontrados en la cromatografía en capa fina de hojas y flores de la especie *P. ligularis* para los cuales previamente se calculó los Rf según Según Wagner & Bladt, 2001, obteniendo vitexina 2''-O-glucosido con un Rf 0.28, isoorientina un Rf 0.45, vitexina un Rf 0,62, quercetina 3''-O-glucosido un Rf 0.72 y orientina Rf 0,57. Por lo tanto, al observar la Figura 1-3 se identifican compuestos separados mediante una fase móvil compuesta por acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (100:11:11:26) con un valor de constante dieléctrica de 34,382 indicando que dichos compuestos posiblemente pueden corresponder a vitexina 2''-O-glucosido, isoorientina, vitexina y quercetina 3''-O-glucosido para hojas; mientras que para las flores se encontrarían vitexina 2''-O-glucosido, orientina y vitexina, lo cual coincide con un estudio realizado en especies del género *Passiflora* donde se resaltan la presencia de constituyentes flavónicos como la vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina. (Peky NORIEGA, 2011, pp. 5-16)

Cálculo de la constante dieléctrica

$$\epsilon_r = \frac{(6 \cdot 100) + (6.2 \cdot 11) + (58 \cdot 11) + (82 \cdot 26)}{100} = 34,382$$

Para la porción hidrolizada se procedió a eluir la fracción flavónica previamente preparada en la fase móvil de cloroformo: metanol: agua, en proporciones (40:9:1), se puede observar que presentó separación de manchas. Al no encontrar en bibliografía valores de Rf de los flavonoides aislados en esta fase móvil, se eluyó los estándares luteolina, quercetina y apigenina.

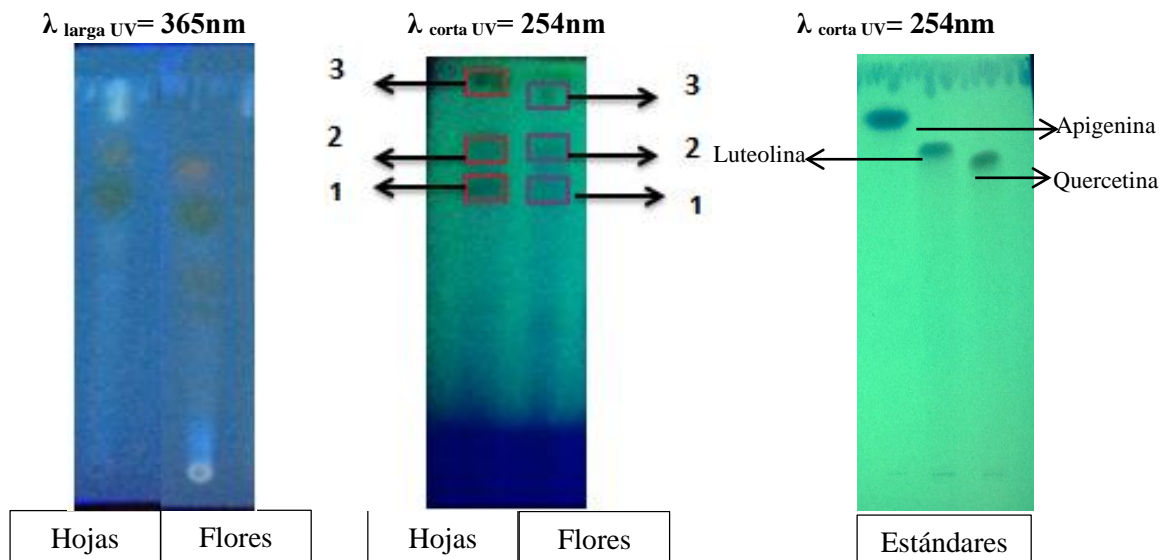


Figura 2-3. Cromatografía en capa fina de la fracción flavónica de las hojas y flores de *P. ligularis*.
Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

Adsorbentes: Sílica gel 60PF 254 (Sigma Aldrich)

Sistema de solventes: Cloroformo-metanol-agua (40-9-1)

Revelador: UV λ larga λ corta

Cuadro 8-3. Resultados de la determinación de Rf de la cromatografía en capa fina de la fracción flavónica de hojas y flores de *P. ligularis*

MUESTRAS	OBSERVADAS	Rf	COMPUESTO IDENTIFICADO
Hojas	1	0,76	Quercetina
	2	0,83	Luteolina
	3	0,89	Apigenina
Flores	1	0,75	Quercetina
	2	0,81	Luteolina
	3	0,87	Apigenina
Estándares	1	0,77	Quercetina
	2	0,82	Luteolina
	3	0,88	Apigenina

Realizado por: Nataly Pinduisaca 2016

Revelador: UV λ larga λ corta

La constante dieléctrica de la fase móvil utilizada es 13,91 y al calcular los Rf para los estándares y extractos, se puede indicar que posiblemente quercetina, luteolina y apigenina están presentes en la fracción flavónica de las hojas y flores. El cálculo de la constante dieléctrica se presenta a continuación:

Calculo de la constante dieléctrica

$$\epsilon_r = \frac{(4.8*40)+(33*9)+(82*11)}{100} = 13,91$$

3.3. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales

3.3.1. Cuantificación de fenoles totales

Se cuantificaron fenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu, para ellos primero se elaboró la curva de calibración del estándar ácido gálico y luego se obtuvo la ecuación de la recta cuyo coeficiente de correlación $R^2 = 0,9992$.

En el **Anexo Ñ** se indica las diferentes concentraciones a la que fue sometido el ácido gálico y sus respectivas absorbancias establecidas por espectrofotometría a una lectura de 715nm, datos que

sirvieron para realizar una curva de calibración expresada en el **Anexo Ñ**, para poder determinar el contenido de fenoles en los diversos extractos.

Cuadro 9-3. Cuantificación de fenoles totales expresados en % de Fenoles y en mg/g

PARÁMETRO	<i>Extracto Acetato de etilo 100%</i>		<i>Extracto Metanólico 98%</i>		<i>Extracto Etanólico 70%</i>	
	HOJAS	FLORES	HOJAS	FLORES	HOJAS	FLORES
% Fenoles	14,11±0,0005	5,83±0,001	28,06±0,0005	6,11±0,0005	71,67±0,001	12,22±0,0005
mg/g	141,11±0,0005	58,33±0,001	280,56±0,0005	61,11±0,0005	716,67±0,001	122,22±0,0005

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

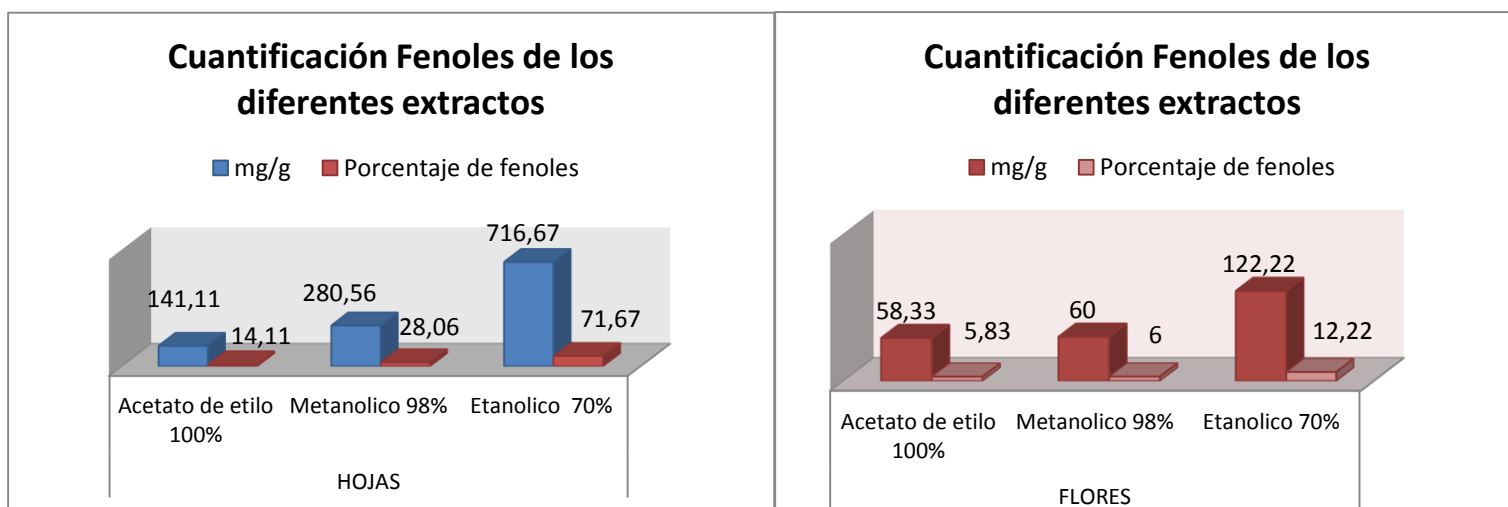


Figura 3-3. Cuantificación de fenoles totales de las hojas y flores de *Passiflora ligularis*.

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

Los extractos etanólico al 70% elaborados a partir de hojas alcanzaron mayor concentración de fenoles (716,67mg de ácido gálico/g de hojas secas) con respecto a los demás extractos revelando así la presencia de mayor contenido de compuestos fenólicos, en comparación con los obtenidos a partir de flores (122,22mg de ácido gálico/g de flores secas). Mientras que para los demás extractos la concentración de fenoles fue menor obteniendo en el metanolico al 98% una concentración de 280,56 mg de ácido gálico/g de hojas secas y 60 mg de ácido gálico/g de flores secas, para el extracto de acetato de etilo al 100% la concentración obtenida de fenoles menor en comparación con los dos extractos anteriormente mencionados obteniendo 141,11 mg de ácido gálico/g de hojas secas y 58,33 mg de ácido gálico/g de flores secas. Los valores obtenidos muestran presencia de compuestos

fenólicos expresados como miligramos de ácido gálico por gramos de muestra seca de hojas y flores del *P. ligularis* en una cantidad significativa. Ver **Anexo O**

Al comparar la concentración de fenoles obtenidos en hojas y flores de los diferentes extractos se puede apreciar que la especie *P. ligularis* presenta mayor concentración en hojas que en flores este se debe a la presencia de componentes asociada con el crecimiento natural de la planta que forman parte de las estrategias de defensa contra patógenos y predadores cuando hay daño o infección a su vez está relacionado con procesos de maduración. (Torres, 2014)

El factor tipo de solvente presentó un efecto significativo sobre la cantidad final de fenoles extraídos, coincidiendo con los resultados realizados por Cabrera, S. Sandoval, A. y colaboradores (2014) donde se mostró que los extractos hidroalcohólicos para hojas y flores del género *Passiflora* pero sobre todo de la especie *P. ligularis* presentan mayor cantidad de compuestos fenólicos, alcanzando contenidos máximos de 14.32 mg Eq Ac. Gal/g materia seca. (Cabrera, et al., 2014)

Al tomar la lectura de las absorbancias de los extractos de hojas y flores de *P. ligularis* ver **Anexo O**, encontramos que las diluciones de mayor concentración presentan mayor coloración y por ende mayor absorbancia.

3.3.2. Cuantificación de flavonoides totales

Se cuantificaron flavonoides totales mediante un método colorimétrico, se elaboró la curva de calibración del estándar quercetina obteniendo la ecuación de la recta con coeficiente de correlación $R^2 = 0,9991$

En el **Anexo P** se indica las diferentes concentraciones a la que fue sometido la quercetina usada como estándar y sus respectivas absorbancias establecidas por espectrofotometría a una lectura de 510nm, datos que sirvieron para realizar una curva de calibración expresada en el **Anexo P**, para poder determinar el contenido de fenoles en los diversos extractos.

Cuadro 10-3. Cuantificación de flavonoides totales expresados en % de Flavonoides y en mg/g

PARÁMETRO	<i>Extracto Acetato de etilo 100%</i>		<i>Extracto Metanólico 98%</i>		<i>Extracto Etanólico 70%</i>	
	HOJAS	FLORES	HOJAS	FLORES	HOJAS	FLORES
% Flavonoides	0,31±0,0005	0,30±0,0005	3,22±0,001	0,52±0,001	5,43±0,001	1,25±0,001
mg/g	3,12±0,0005	2,95±0,0005	32,17±0,001	5,18±0,001	54,33±0,001	12,53±0,001

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

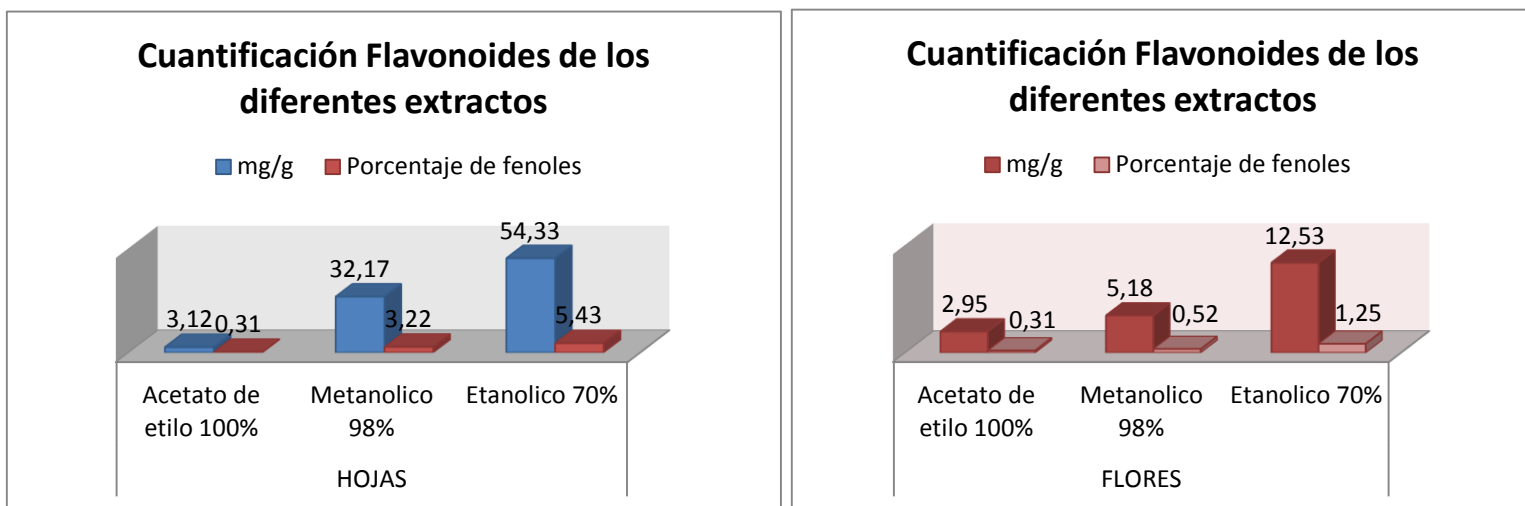


Figura 4-3. Cuantificación de fenoles totales de las hojas y flores de *Passiflora ligularis*.
 Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

El extracto etanólico al 70% elaborado a partir de hojas alcanzaron mayor concentración de flavonoides (54,33mg de quercetina/g de hojas secas) con respecto a los demás extractos revelando así la presencia de mayor contenido de flavonoides, en comparación con los obtenidos a partir de flores (12,53mg de quercetina/g de flores secas). Mientras que para los demás extractos la concentración de flavonoides fue menor obteniendo en el metanolico al 98% una concentración de 32,17 mg de quercetina/g de hojas secas y 5,18 mg de quercetina/g de flores secas, para el extracto de acetato de etilo al 100% la concentración obtenida de flavonoides fue mucho menor en comparación con los dos extractos anteriormente mencionados obteniendo 3,12 mg de quercetina/g de hojas secas y 2,95 mg de quercetina/g de flores secas. Los valores obtenidos demuestran la presencia de flavonoides expresados como miligramos de quercetina por gramos de muestra seca de hojas y flores del *P. ligularis*, en una cantidad significativa.

Al comparar la concentración de flavonoides obtenidos en hojas y flores de los diferentes extractos se puede apreciar claramente que la especie *P. ligularis* presenta mayor concentración de flavonoides totales en hojas que en flores ver **Anexo Q**, lo cual coincide con los resultados de fenoles totales.

El factor tipo de solvente presentó un efecto significativo sobre la cantidad final de flavonoides extraídos, lo que coincide con los resultados obtenidos por de Cabrera, S. Sandoval, A. y colaboradores (2014) donde se muestra que los extractos etanólico 70% tanto para hojas como para flores presentan mayor concentración de flavonoides totales expresados como vitexina (10.47 mg Eq Vitexina/g materia seca). Mendonca Freitas *et al.* (2007) revela en otros estudios que la

cuantificación en extractos metanólicos también presentan considerables concentraciones de flavonoides 14.9 mg Eq Vitexina/g materia seca.

Investigaciones realizadas por Fiallo *et al.* (2001) indican que se han encontrado flavonoides totales en otras especies del género *Passiflora* como en *P. incarnata*, en cambio Muller *et al.* (2005) confirma la presencia del flavonoide vitexina en extractos de *P. alata*.

Al tomar la lectura de las absorbancias de los extractos de hojas y flores de *P. ligularis* encontramos que las diluciones de mayor concentración presentan mayor coloración ver **Anexo Q** y por ende mayor absorbancia.

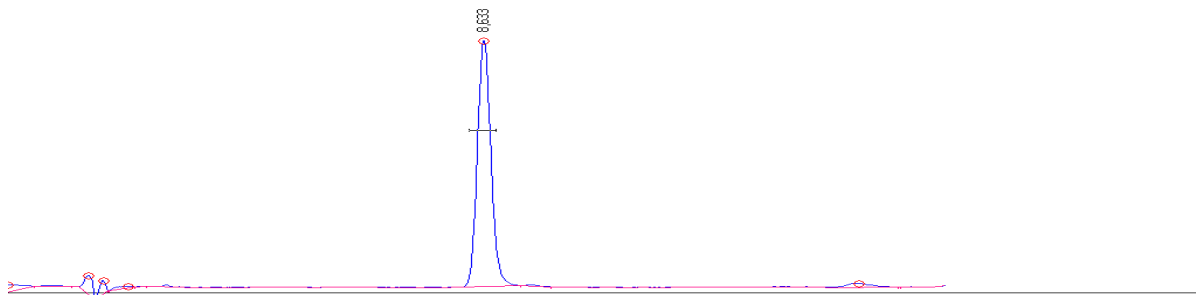
3.4. Análisis HPLC

Apigenina y luteolina poseen estructuras similares, por lo tanto requieren de una fase móvil polar para una mejor separación de las agliconas, en función de su logP el cual es mayor para luteolina, debido a la presencia de un OH más en posición 3'. La fase móvil seleccionada fue ácido fórmico: acetonitrilo: metanol (60:16:24) basada en el estudio "*Pharmacokinetic study of luteolin, apigenin, chrysoeriol and diosmetin after oral administration of Flos Chrysanthemi extract in rats*", en el cual se valida el método para cuantificar apigenina, luteolina crisoeriol y diosmetina con estándar interno quercetina, con una linealidad de 0.025–10 µg/ml (Chen, et al., 2012). El método planteado por (Chen, et al., 2012) es mínimamente modificado para el presente estudio; T^a=30±1°C con un flujo de 1ml/min.

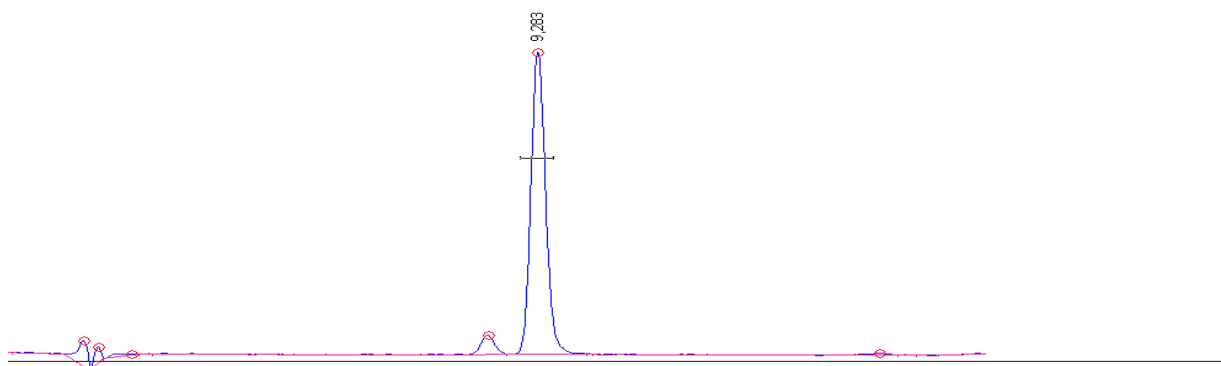
Es importante considerar que según bibliografía la planta de estudio presenta en su estructura los siguientes flavonoides; quercetina, kaepherol, apigenina, luteololina), C-flavonoides (crisina, vitexina, isovitexina, orientina, flavononas cumarinas, ácidos fenólicos y trazas de aceite esencial. (Anon., 2006, p. 10). Una vez el extracto es hidrolizado la muestra presenta en su mayoría agliconas, apigenina, quercetina y luteolina como se podrá evidenciar en los cromatogramas obtenidos también existe Luteolina.

Figura 5-3. Cromatogramas HPLC de apigenina, luteolina y quercetina en etanol 70%. (A) Estándar de quercetina (10ug/mL), (B) estándar de luteolina (5ug/mL), (C) estándar de apigenina (5ug/mL), (D) muestra estandares, (E) muestra etanólica al 70%hidrolizada diluida

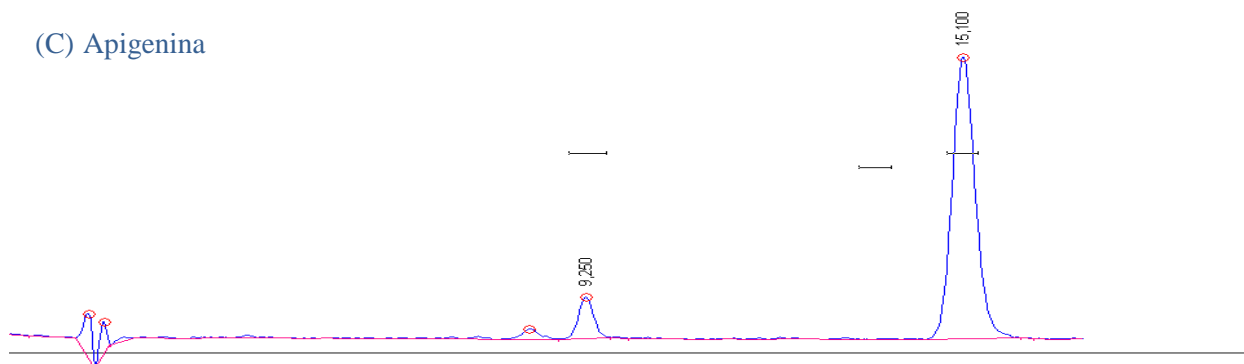
(A) Quercetina



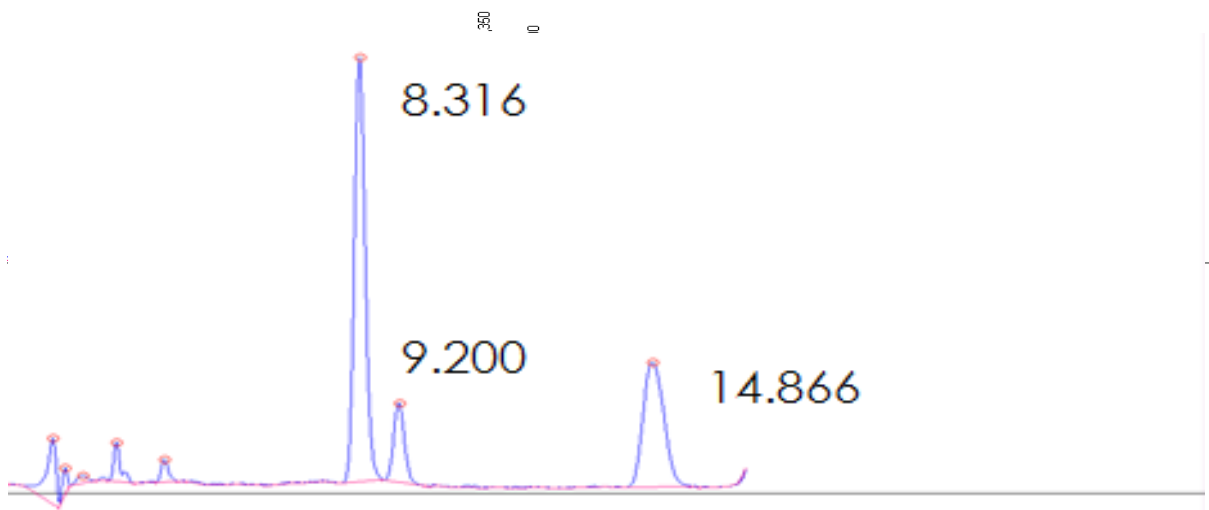
(B) Luteolina



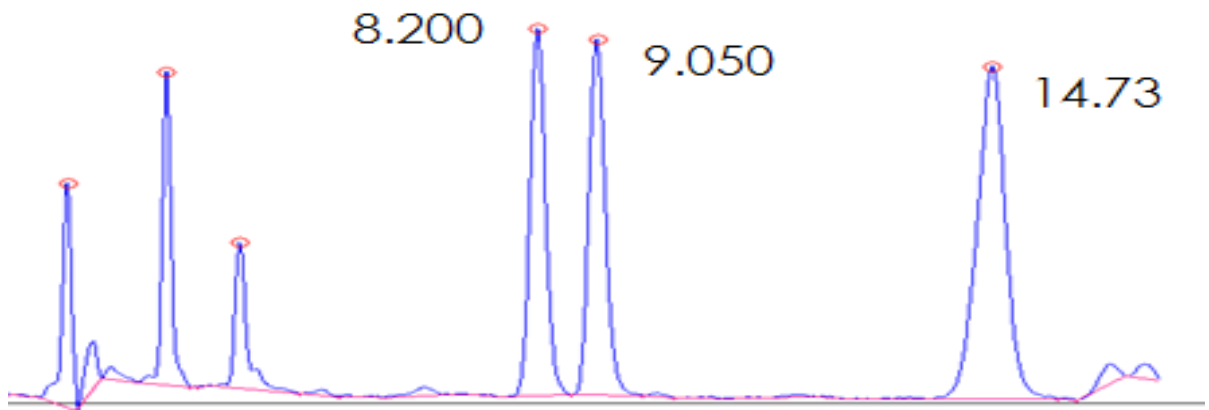
(C) Apigenina



(D) Mezcla estándares



(G) Muestra hidrolizada flores



Cuadro 11-2. Resultados de la cuantificación de flavonoides totales mediante HPLC

	PORCENTAJE DE FLAVONOIDES		mg/100g planta	
	HOJAS	FLORES	HOJAS	FLORES
Flavonoides totales (expresados como quercetina)	0,02464	0,05385	73,0368	57,5044
Flavonoides totales (expresados como luteolina)	0,00268	0,01140	2,6818	11,4052
Flavonoides totales (expresados como apigenina)	0,07303	0,05750	24,6493	53,8519

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

Mediante cromatografía líquida de alta eficiencia se cuantificó la concentración de flavonoides resultados que fueron expresados en mg/100g de planta obteniendo para quercetina 73,0368 mg/100g en hojas; para luteolina 2,6818 mg/100g en hojas y para quercetina 24,6493 mg/100g hojas; mientras que para flores se obtuvo de quercetina 57,5044 mg/100g de luteolina 11,4052 mg/100g y de apigenina 53,8519 mg/100g

La concentración de flavonoides se muestran en el **Anexo R** indicando que tanto para hojas como para las flores los resultados fueron aceptables, se puede apreciar que el flavonoide que se encuentra en mayor concentración es la quercetina tanto en hojas como en flores, esto puede relacionarse significativamente con los datos encontrados anteriormente encontrados mediante TLC ya que muestran la presencia de la aglicona quercetina dentro de esta especie. (Anon., 2006, p. 10)

3.5. Actividad captadora de radicales libres.

El 1,1-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), es un radical libre estable que presenta una coloración púrpura en medio metanólico, como consecuencia de la donación de un electrón o un protón por un compuesto con poder antioxidante la tonalidad desaparece.

Para comprobar la actividad captadora de radicales libres *in vitro* de la fracción fenólica tanto de hojas como flores de la especie *P. ligularis* se utilizó como agente oxidante al DPPH para el desarrollo de los ensayos.

En la tabla 12-3 y 13-3 se muestran los resultados obtenidos en hojas y flores los mismos que fueron expresados a través del IC 50 (mg/L) para hojas se obtuvo una concentración de 310,06661 µg/mL

mientras que para flores de 4692,6153 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estos resultados muestran que ha esta concentración ha llegado a consumirse el 50% del DPPH. **Anexo T (I, II).**

Los valores de la capacidad inhibitoria muestran que tiene mejor capacidad antioxidante los extractos de hojas con respecto al de flores esto puede quizá puede deberse a que el extracto metanólico de hojas presento un contenido más alto de fenoles totales.

Lo contrario ocurre con la absorbancia, ya que a mayor concentración tiende a disminuir, esto ocurre debido a que a mayor concentración mayor cantidad de compuestos fenólicos por lo tanto el DPPH tiene más posibilidades de cambiar un electrón o un protón por un compuesto con poder antioxidante haciendo que la tonalidad purpura desaparezca y por lo tanto la absorbancia disminuye. Ver **Anexo T (I,II)**

La curva de la actividad captadora de radicales libres de ácido gálico ver **Anexo S** se realizó con el fin de poder comparar el % de inhibición que posee este con el de los extractos de flores y hojas de la especie de estudio lo cual no pudo realizarse ya que los extractos son una muestra pura. Por ello se consultó en otras fuente bibliográficas donde *Cabrera, N. Sandoval, A. Forero, F.* muestran que los extractos acuosos e hidroalcoholcios de *P. ligularis* si tienen actividad antioxidante además determinan que los extractos hidroalcohólica 70% elaborados a partir de flores y hojas, poseen mayores actividades antioxidantes. Por otro lado Carvajal de Pabón *et al.* (2011) cuantificaron esta misma actividad para extractos metanólicos de hojas de *P. ligularis* obteniendo valores de 233.097 $\mu\text{MEq Trolox}/100 \text{ g}$ de extracto seco. En otras especies de *Passifloras* también se ha observado actividad antioxidante, así, Masteikova *et al.* (2008) encontraron dicha actividad en extractos acuosos de *P. incarnata* y Bendini *et al.* (2006) hallaron hasta de 50 $\mu\text{M Eq Trolox}/\text{g}$ material fresco en extractos metanólicos de hojas de *P. nítida*. (Cabrera, et al., 2014)

Cuadro 12-3. Curva de la actividad captadora de radicales libres y porcentaje de inhibición en el extracto metanólico al 99,8% mediante el método de DPPH

EXTRACTO METANOLICO 99,8%		
HOJAS		
Concentración	Absorbancia	% Inhibición
5000	0,040±0,1073	92,50±0,1073
4000	0,045±0,2245	91,66±0,2245
3000	0,049±0,1920	90,92±0,1920
2000	0,054±0,1414	89,99±0,1414
1000	0,048±0,2272	91,10±0,2272
800	0,046±0,1955	91,41±0,1955
700	0,091±0,1163	83,13±0,1163
600	0,137±0,1244	74,49±0,1244
500	0,18±0,3504	66,64±0,3504
400	0,23±0,2936	57,38±0,2936
300	0,271±0,3259	49,78±0,3259

IC50 EXTRACTO METANOLICO 99,8% HOJAS		
	Concentración	% Inhibición
IC50	310,06661±4,1767	50

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

Cuadro 13-3. Curva de la actividad captadora de radicales libres y porcentaje de inhibición en el extracto metanólico al 99,8% de flores mediante el método de DPPH

EXTRACTO METANOLICO 99,8%		
FLORES		
Concentración	Absorbancia	% Inhibición
10000	0,087±0,0973	84,26±0,0973
9000	0,127±0,1686	77,57±0,1686
8000	0,160±0,0973	71,89±0,0973
7000	0,201±0,1686	65,09±0,1686
6000	0,239±0,0973	58,57±0,0973
5000	0,276±0,1686	52,44±0,1686
4000	0,317±0,1686	45,53±0,1686
3000	0,354±0,1686	39,29±0,1686
2000	0,398±0,0973	31,81±0,0973

IC50 EXTRACTO METANOLICO 99,8% FLORES		
	Concentración	% Inhibición
IC50	4692,6153±14	50

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

El método DPPH evaluó la actividad captadora de radicales libres en el ácido gálico observando que tiene una actividad captadora de radicales libres buena debido a que su IC 50 muestra que ha una concentración de 43,7894 ha llegado a consumirse el 50% del DPPH indicando que el ácido gálico presenta una inhibición adecuada ya que no necesita de mucha concentración para poder tener actividad captadora de radicales libres.

Cuadro 14-3. Curva de la actividad captadora de radicales libres y porcentaje de inhibición en el ácido gálico mediante el método de DPPH

ACIDO GALICO		
Concentración (ppm)	Absorbancia	% Inhibición
80	0,058±0,1776	89,69±0,1776
60	0,178±0,1025	68,26±0,1025
40	0,299±0,1776	46,89±0,1776
20	0,431±0,1776	23,44±0,1776
10	0,4966±0,1025	43,67±0,1025
ACIDO GALICO IC50		
	Concentración	% Inhibición
IC50	43,7894±0,1566	50

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

CONCLUSIONES

1. Se estableció que la materia vegetal seca de hojas y flores de *P. ligularis* cumple con los valores de humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua, cenizas insolubles en ácido clorhídrico, establecidos por la USP # 28, indicando que es apta para su uso y que no posee ningún tipo de contaminación; a la vez que las condiciones de secado, conservación y almacenamiento fueron correctas. Se realizó el tamizaje fitoquímica de los extractos de las hojas y flores de *P. ligularis*, donde se resaltó la presencia de fitoconstituyentes fenólicos sobre todo flavonoides, sin descartar la presencia de compuestos como alcaloides, terpenos, saponinas
2. Se identificaron cualitativamente los compuestos presentes en la fracción flavónica del extracto de hojas y flores no hidrolizado mediante cromatografía en capa fina utilizando una fase móvil acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua (100:11:11:26) observando la posible presencia de vitexina 2''-O-glucosido, isoorientina, vitexina y quercetina 3''-O-glucosido para hojas mientras que en las flores, vitexina 2''-O-glucosido, orientina y vitexina. Para la fracción flavónica de los extractos hidrolizados se utilizó una fase móvil compuesta por cloroformo: metanol: agua (40:9:1), en la misma que se determinó la posible presencia de apigenina, quercetina y luteolina.
3. Se cuantificó fenoles y flavonoides a partir de la elaboración de extractos de hojas y flores de *P. ligularis*, demostrando que la mayor concentración de fenoles se encuentra en el extracto etanólico con 716,67 mg de ácido gálico/g de hojas secas y 122,22 mg de ácido gálico/g de flores secas, lo mismo ocurrió en la cuantificación de flavonoides obteniendo en el extracto etanólico 54,33 mg de quercetina/g de hojas secas y 12,53 mg de quercetina/g de flores secas. En la cuantificación mediante HPLC se encontró para apigenina 24,6493 mg/100g planta (hojas) y 53,8519 mg/100g planta (flores); para luteolina 2,6818 mg/100g planta (hojas) y 11,4052 mg/100g planta (flores) y quercetina 73,0368 mg/100g planta (hojas) y 57,5044 mg/100g planta (flores)
4. Se evaluó la actividad captadora de radicales libres en los extractos metanólicos de hojas y flores de *Passiflora ligularis*, los resultados fueron expresados a través del IC50 el cual indica la concentración en la que ha llegado a consumirse el 50% del DPPH determinando que mejor actividad antioxidante posee el extracto metanólico de hojas con 310,066 mg/L con respecto al de flores que presento 4692,615 mg/L

RECOMENDACIONES

- Cuando se realiza un ensayo enzimático es recomendable trabajar sobre un área totalmente limpia y fuera del alcance de la luz para evitar algún tipo de contaminación o reacción no deseada, a la vez se debe respetar los tiempos establecidos de medición porque se trata de métodos muy sensibles.
- Repetir este estudio utilizando como materia prima hojas y flores de *P. ligularis* provenientes de una zona geográfica diferente, tomando en cuenta que la composición química puede variar en concentración y por ende aumentar su actividad neurofarmacológica.
- Es aconsejable realizar un estudio más exhaustivo sobre los constituyentes flavónicos presentes en las hojas y flores del *P. ligularis* para de este modo determinar qué compuestos son causantes de la actividad biológica.
- Utilizar las concentraciones obtenidas en la cuantificación de los metabolitos responsables de la actividad farmacológica para realizar una forma farmacéutica y así continuar con el estudio de *Passiflora ligularis* usando resultados de la presente investigación.

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, A., RODRÍGUEZ, A., & LOTERO, J. “Epidemiología de los trastornos de ansiedad y depresión de adolescentes en una población rural”. *Epidemiología de los trastornos de ansiedad y depresión de adolescentes en una población rural*. [En línea] 2008. (Ecuador). Vol 1. [Consulta: 18 Octubre 2014]. Disponible en: http://www.med.unne.edu.ar/revista/revista184/2_184.pdf.

AMBIGA, S. “Evaluation of wound healing activity of flavonoids from *Ipomoea carnea* Jacq”. *Ancient Science of Life*, vol.26, n°3 (2007), (Buenos Aires), pp. 45-51.

BLAI, R. *PsicoSitio. Consejo y Orientación Terapéutica de los Trastornos de Ansiedad y los Trastornos de la Alimentación*. [blog]. [Consulta: 26 septiembre 2015]. Disponible en: <https://psicositio.wordpress.com/dr-ramon-blai-psicologo-y-nutricionista/la-ansiedad-definicion-y-caracteristicas/>.

CABRERA, S., SANDOVAL, A., & FORERO, F. *Potencial antioxidante y antimicrobiano de extractos acuosos*. [En línea] 2014. Ecuador: Corpoica. [Consulta: 26 septiembre 2015]. Disponible en: http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/viewFile/41976/46209.

CAICEDO, V., CARCHI, S., & CHUQUIMARCA, M. *Determinacion de la prevalencia del trstorno de ansiedad y factores asociados en los/las adolescenetes de octavo, noveno y decimo de educacion basica*. [En línea]. Ecuador [Consulta: 26 de 09 de 2015]. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3536/1/MED130pdf>.

CARTAYA, O., & REYNALDO, INÉS. *Flavonoides: Características químicas y aplicaciones*. 3ª ed. 2001, pp. 5-11.

CHEN, Z. “Pharmacokinetic study of luteolin, apigenin, chrysoeriol and diosmetin after oral administration of Flos Chrysanthemi extract in rats”. *Fitoterapia*. vol 83, pp. 1616-1622.

CONTRERA, E. *Retorno a las Plantas Medicinales*. 2ª ed. Madrid-España : Ciencia y Tecnica, 2004, pp, 56-58.

CRUZ, S. “Modelos de Ansiedad”. *Revista Mexicana de Análisis de Conducta*, vol 28, nº 1 (2003), (Mexico) pp 23-25.

DARR, A. *Tecnología Farmacéutica*. 2ª ed. Madrid-España : Acribia, 1982, pp. 24.

ECHEMENDÍA, R., & MORÓN, F. "Tintura de hojas de *Psidium guajava* L. en pacientes con diarrea aguda simple". *Revista fitofarmacología internacional*. [En línea] 2006, vol.1, nº1. [Consulta: 26 septiembre 2015]. Disponible en: <http://fitointernacional.blogspot.com/>.

ESCAMILLA, J. “Trastornos de ansiedad (I). Trastorno de ansiedad generalizado. Trastorno de pánico”. *Medicine*, vol 10, nº 87 (2011), pp 10.

ESTRADA, R., UBALDO, D., & ARAUJO, A. “Los Flavonoides y el Sistema nervioso central”. *Salud Mental*, vol 35 (2012), (Argentina) pp. 375-384.

FERRE, F., & CAMARILLO, L. “Estado actual de tratamiento de ansiedad”. *Medicine*, vol. 1146, nº 3 (2013), (Madrid), pp. 2747-2744.

FESTORAZZI, A., RODRIGUEZ, L., & LOTERO, J. "Epidemiología de los trastornos de ansiedad y depresión en adolescentes de una población rural". *Revista de Posgrado de la Via de Medicina*, vol.1, nº1 (2008), (Buenos Aires), pp.184.

FLORES, R. *Atlas de las Plantas Medicinales y Curativas*. 2ª ed. Madrid: s.n, 1998, pp. 93-94.

FUNDACION CANNA. *Flavonoides* [blog]. [Consulta: 27 septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.fundacion-canna.es/flavonoides>.

GILMAN, & GOODMAN. *Tratamiento farmacológico de la depresión y los trastornos de ansiedad*. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11ª ed. México: McGRRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A, (2011). pp. 397-415.

GÓMEZ, C., GONZÁLEZ, A., & RODRÍGUEZ, R. “Modelos animales para el estudio de Ansiedad: una aproximación crítica”. *Salud Mental*, vol 25 (2002). (Ecuador) pp. 8

HARRISON, J. *Farmacognosia*. 14^a ed. Buenos Aires: Panamericana, 2000, pp. 135-147.

HERNÁNDEZ, F. *Eficacia del extracto fluido de Passiflora incarnata L. en los trastornos de ansiedad*. [En línea]. Ecuador, 2007. [Consulta: 27 noviembre 2015]. Disponible en: <http://www.medicentro.sld.cu/index.php/medicentro/article/download/584/620>

LI, HONGWEI. “Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* ‘edulis’ y *Passiflora edulis* ‘flavicarpa’” *Journal of ethnopharmacology*, vol 113 (2011) pp. 185-190.

LOCK, O. *Análisis Fitoquímico y Metabolitos secundarios*. Venezuela: Es Salud, 2004, pp. 15-27.

MINISTERIO DE SANIDAD., & CONSUMO (España). Guía de Práctica Clínica para el manejo de pacientes con trastornos de Ansiedad en atención primaria. *Guía de Práctica Clínica para el manejo de pacientes con trastornos de Ansiedad en atención primaria*. [En línea]. España, 2013. [Consultado: 18 octubre 2015]. Disponible en: http://www.guiasalud.es/GPC/GPC_430_Ansiedad_Lain_Entr_compl.pdf.

MIRANDA, M. *Farmacognosia y productos naturales. (Normas Ramales, De drogas crudas y extractos y tinturas.)*, 6^o ed. La Habana-Cuba: Félix Varela, 2006 pp. 32-62

MORALES, M., & MORALES, J. *Plantas medicinales, fitofármacos y fitomedicamentos: hacia una fitomedicina (Fitoterapia moderna y racional), basada en el conocimiento científico actual*. Chile: Sociedad Chilena de Fitoterapia, 2009, pp. 30

MSP. *Informe de la Evaluación de los Sistemas de Salud Mental del Ecuador basado en el Instrumento IESM-OMS*. [En línea]. Ecuador, 2008. [Consulta: 26 septiembre 2015]. Disponible en: http://www.who.int/mental_health/ecuador_who_aims_report.pdf.

OCAMPO, J. *Naturalista*. [blog]. [Consulta: 26 septiembre 2015]. Disponible en: <http://conabio.inaturalist.org/taxa/166208-Passiflora-ligularis>.

OROZCO MAYRA. “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE UN GEL ELABORADO A BASE DE LOS EXTRACTOS DE MOLLE (*Schinus molle*), COLA DE

CABALLO (*Equisetum arvense L.*), LINAZA (*Linum usitatissimum L.*) EN RATONES (*Mus musculus*)". Escuela Superior Politecnica de Chimborazo ,Riobamba, Chimborazo, Ecuador .2013. pp. 35

PADILLA, A., RINCÓN, M., & BOU, L. "Contenido de polifenoles y actividad antioxidante". *Revista Scielo*, vol.58, n°3 (2008), (Buenos Aires), pp.18.

PALLO, M. "EVALUACIÓN DEL EFECTO ANSIOLÍTICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE FLOR DE GRANADILLA (*Passifloraligularis*) EN RATONES (*Mus musculus*)". Escuela Superior Politecnica de Chimborazo ,Riobamba, Chimborazo, Ecuador. 2012. pp. 30-50

PEKY, N., MAFUD, D., & STRASSER, M. "Passiflora alata Curtis: a Brazilian medicinal plant". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, vol 10 (2011). (Brazil) pp. 5-16.

PÉREZ, G. "Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes". *Cubana Invest Biomed*, vol. 22, n° 1 (2003), (Cuba) pp.1-3.

REA, V. "EVALUACIÓN DEL EFECTO ANSIOLÍTICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE FLOR DE BADEA (*Passiflora quadrangularis*) EN RATONES (*Mus musculus*)". Escuela Superior Politecnica de Chimborazo ,Riobamba, Chimborazo, Ecuador. 2012. pp. 38-60

RIOFRIO, K. "EVALUACIÓN DEL EFECTO ANSIOLÍTICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE FLOR DE TAXO (*Passiflora tripartita var. Mollissima*) EN RATONES (*Mus musculus*)". Escuela Superior Politecnica de Chimborazo ,Riobamba, Chimborazo, Ecuador. 2014. pp. 40-60

RODRIGUEZ, R. *Guía de farmacología y terapéutica*. 5ª ed. México: McGraw Hill, 2007, pp. 51-55.

ROERSCH, C. *Plantas Medicinales*. 4ª ed. Alemania: KoeltzScientificBookeKonigstein, 2004, pp.234, 235, 245-249.

VILLALBA, R., GOMEZ, R., & PARRA, M. *Manual Técnico del Cultivo de Granadilla (Passiflora ligularis)*. [En línea]. Granadilla. [Consulta: 27 septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.huila.gov.co/documentos/M/manual%20tecnico%20del%20cultivo%20de%20granadilla%20en%20el%20Huila.pdf>.

VOIGT, R. *Tratado de tecnología Farmacéutica*. 3ª ed. Acriba: s.l, 1982, pp 50.

WAGNER, H., & BLADT, S. *Plant Drug Analysis a Thin Layer Chromatography*. 2º ed. Germany-Europa: Verlag Berlin Heidelberg, 2001 pp. 220-232

XU, Y., & LIANG, JING. “Chemical Constituents of *Sonchus oleraceus* L.[J]”. *Journal of China Pharmaceutical University*. vol 5, pp. 7

ANEXOS

ANEXO A: Materia prima *Passiflora ligularis*



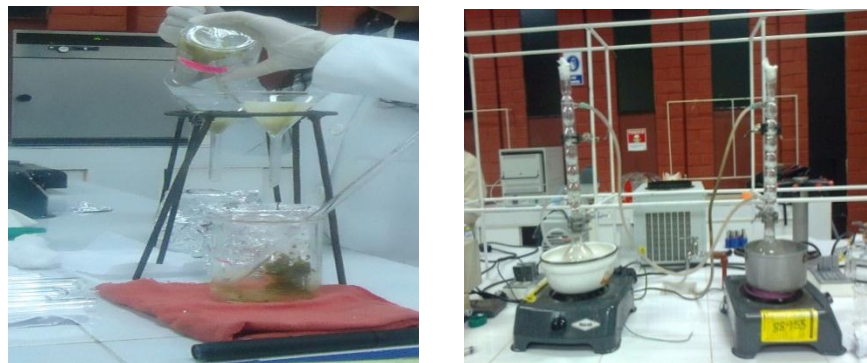
Fuente: Nataly Pinduisaca, 2016

ANEXO B: Parámetros de calidad del material vegetal



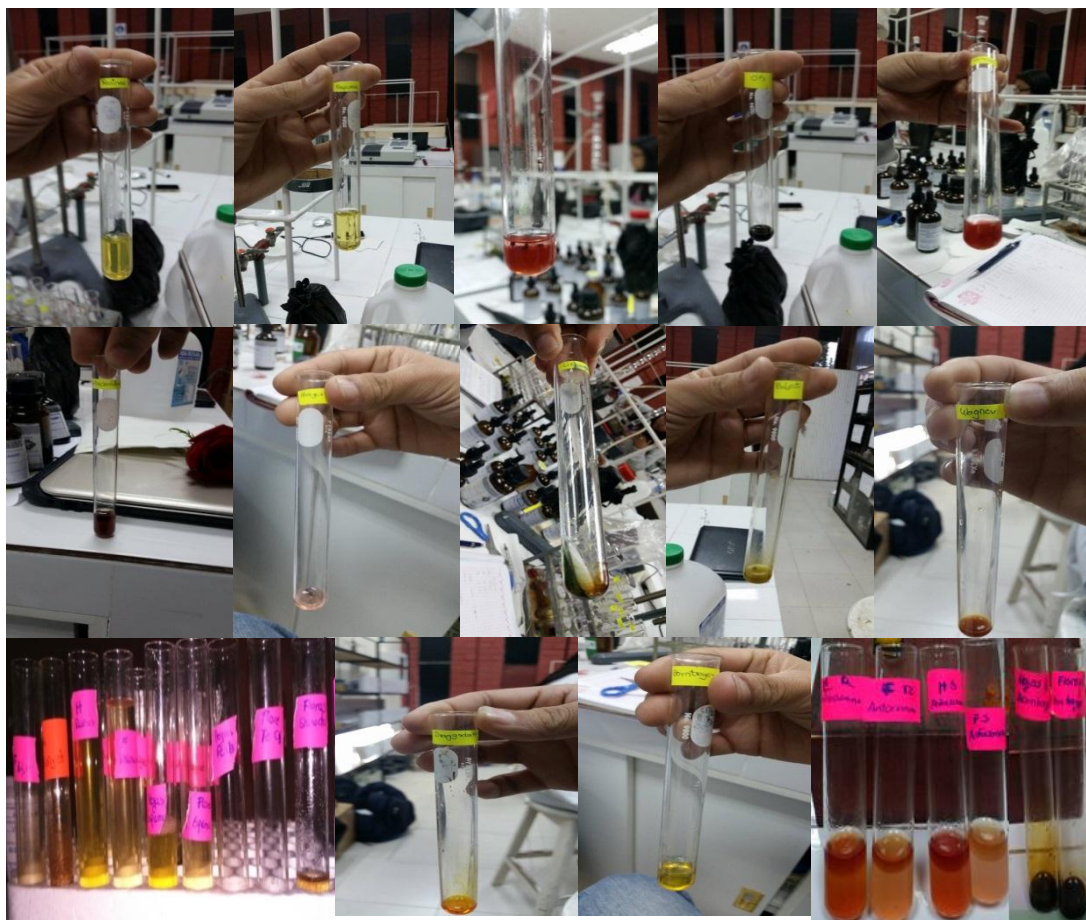
Fuente: Nataly Pinduisaca, 2016

ANEXO C: Obtención de extractos de flores y hojas del *P. ligularis*



Fuente: Nataly Pinduisaca, 2015

ANEXO D: Tamizaje fitoquímico de los extractos



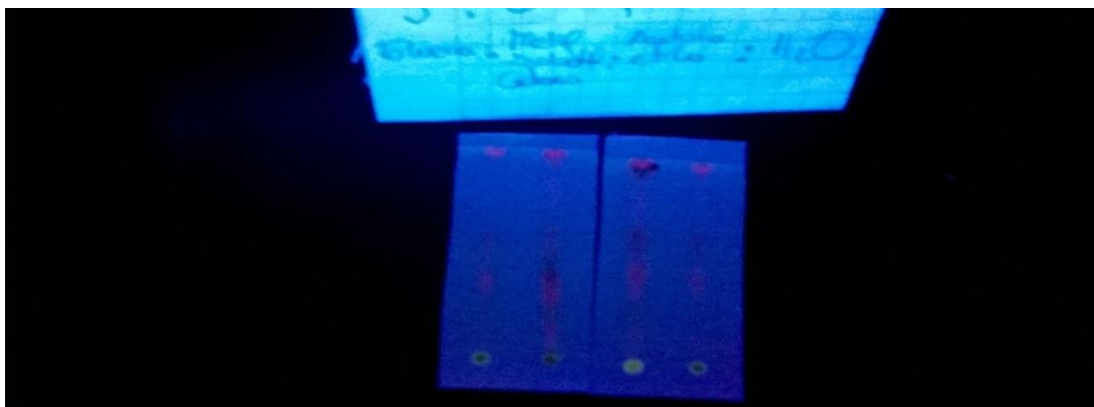
Fuente: Nataly Pinduisaca, 2016

ANEXO E: Cromatografía en capa fina



Fuente: Nataly Pinduisaca, 2016

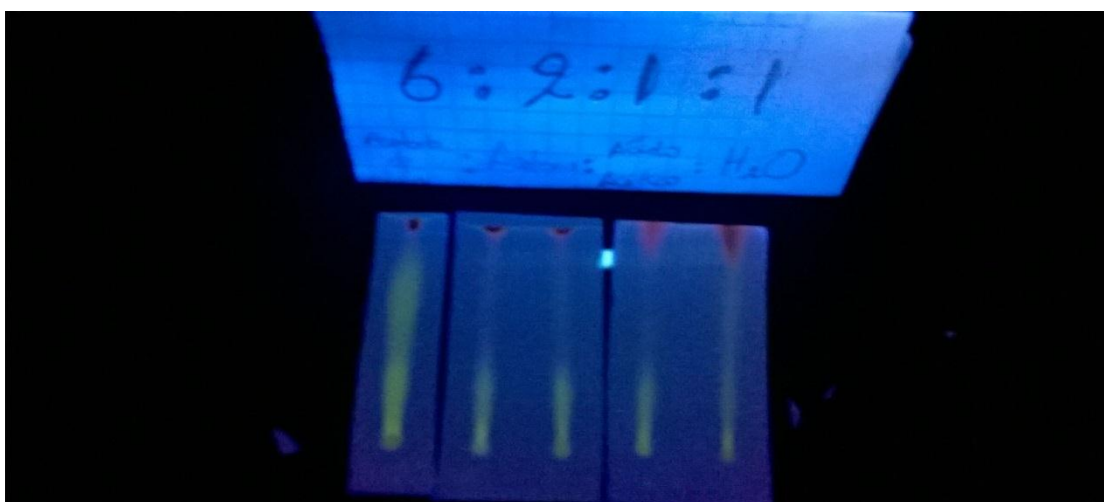
ANEXO F: Cromatografías en capa fina con fases móviles probadas



SISTEMA DE SOLVENTES: Tolueno, metilisobutil cetona, acetato de etilo, agua (5: 3:1:1)



SISTEMA DE SOLVENTES Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético, agua, metil isobutil cetona (6:0,5:0,5:1:4)



SISTEMA DE SOLVENTES Acetato de etilo, acetona, ácido acético, agua (6:2:1:1)



SISTEMA DE SOLVENTES Agua, ácido fórmico, metil isobutil cetona, acetato de etilo (1:1:3:5)

Fuente: Nataly Pinduisaca, 2016

ANEXO G: Obtención de la fracción flavónica de las hojas y flores del *P. ligularis*



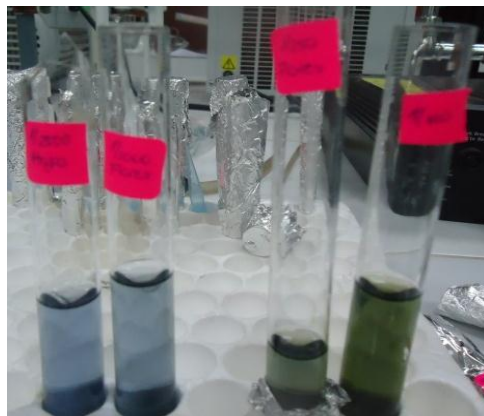
Fuente: Nataly Pinduisaca, 2016

ANEXO H: Preparación del reactivo de Folin Ciocalteu



Fuente: Nataly Pinduisaca, 2016

ANEXO I: Cuantificación de compuestos fenólicos totales



Fuente: Nataly Pinduisaca, 2016

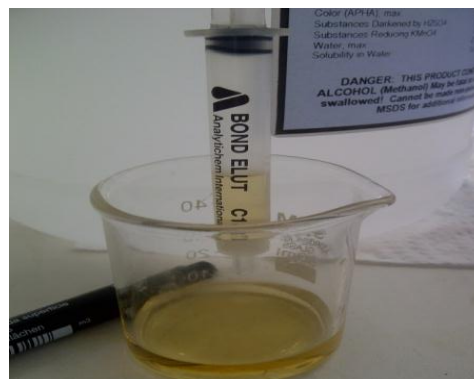
ANEXO J: Cuantificación de compuestos flavónicos



Fuente: Nataly Pinduisaca, 2016



ANEXO K: Preparación de la muestra para el en HPLC



Fuente: Nataly Pinduisaca, 2016

ANEXO L: Cuantificación en HPLC del extracto hidroalcoholico de *P. ligularis*



Fuente: Nataly Pinduisaca, 2016

ANEXO M: Cuantificación de la actividad captadora de radicales libres

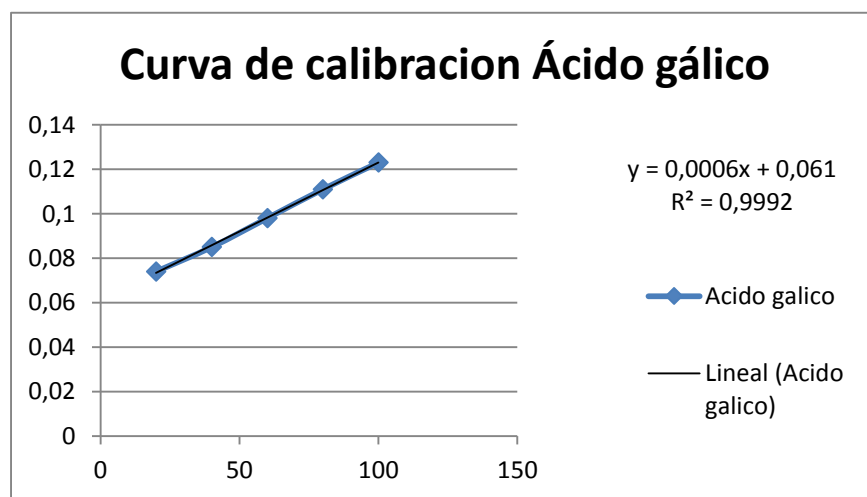


Fuente: Nataly Pinduisaca, 2016

ANEXO Ñ: Curva de calibración del ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu

CURVA DE CALIBRACIÓN ÁCIDO GÁLICO	
Concentración (ppm)	Absorbancia
20	0,074
40	0,085
60	0,098
80	0,111
100	0,123

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

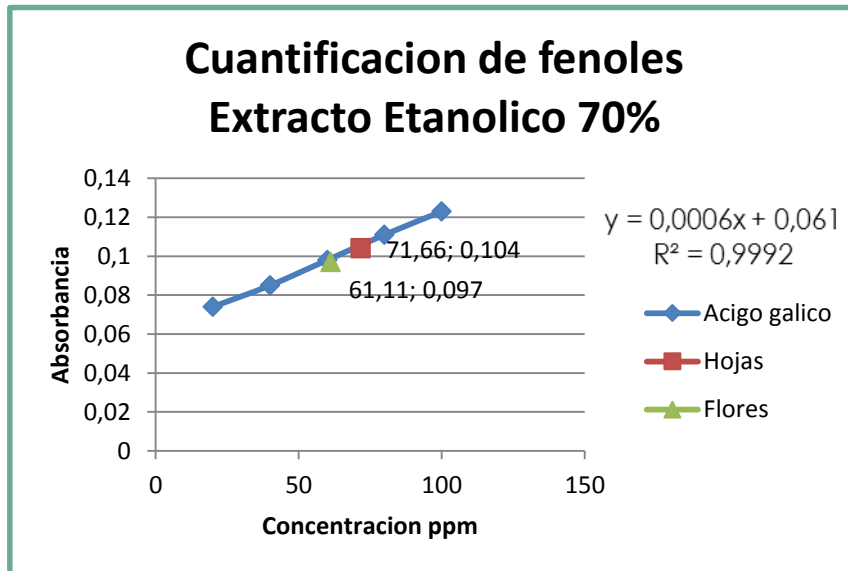
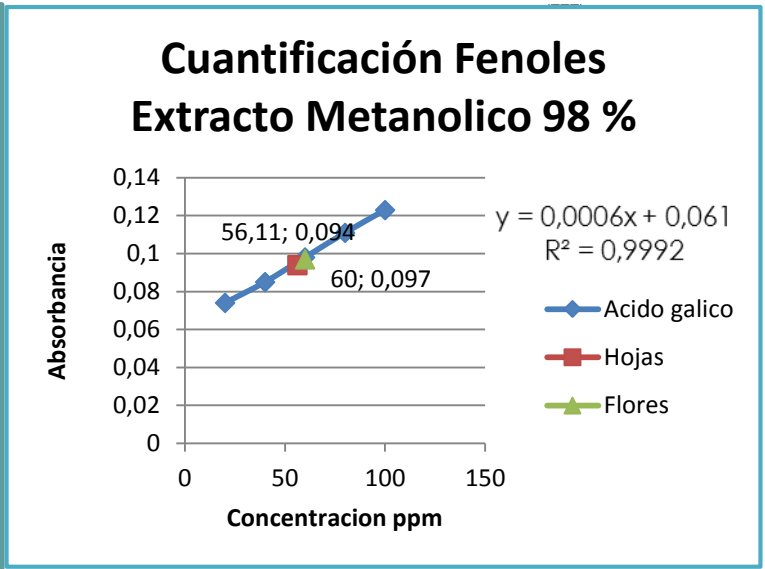
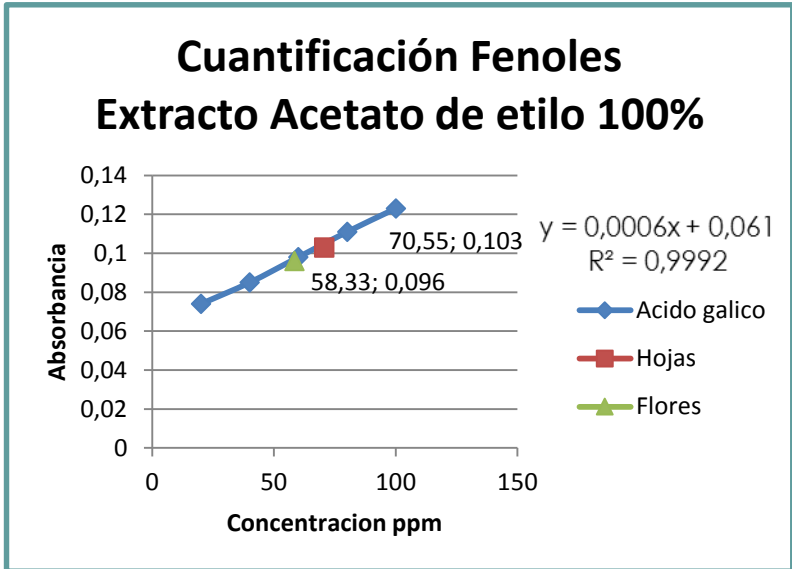


Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

ANEXO O: Cuantificación de fenoles totales en los extractos Acetato de etilo 100% (I), Metanólico

(I) 98% (II) y Etanólico 70% (III) por el método de Folin-Ciocalteu. (II)

(II)

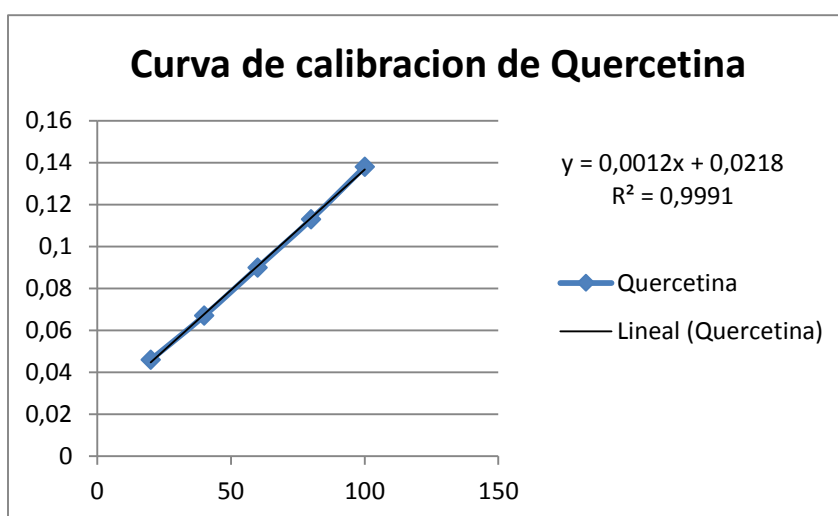


Fuente: Nataly Pinduisaca, 2016

ANEXO P: Curva de calibración de quercetina por el método de tricloruro de aluminio

CURVA DE CALIBRACIÓN DE QUERCETINA	
Concentración (ppm)	Absorbancia
20	0,046
40	0,067
60	0,090
80	0,113
100	0,138

Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

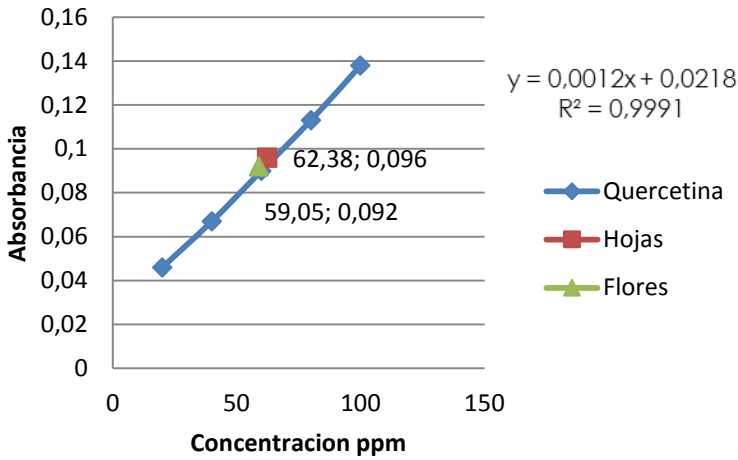


Realizado por: Nataly Pinduisaca, 2016

ANEXO Q: Cuantificación de flavonoides totales en los extractos Acetato de etilo 100% (I), Metanólico 98% (II) y Etanólico 70% (III).

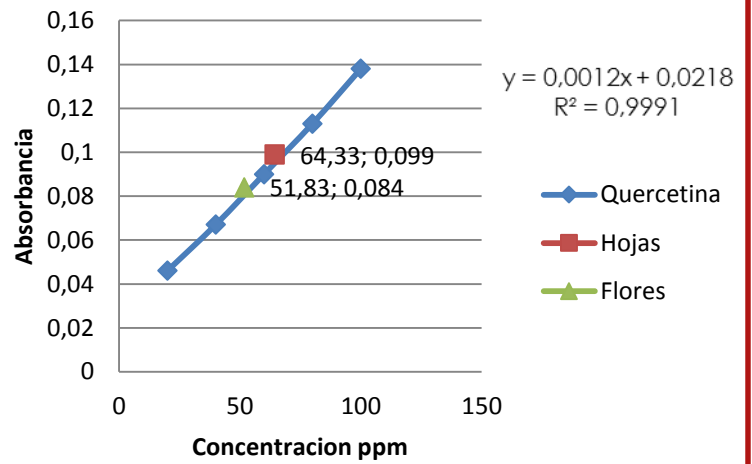
(I)

**Cuantificación de flavonoides
Extracto Acetato de etilo 100%**



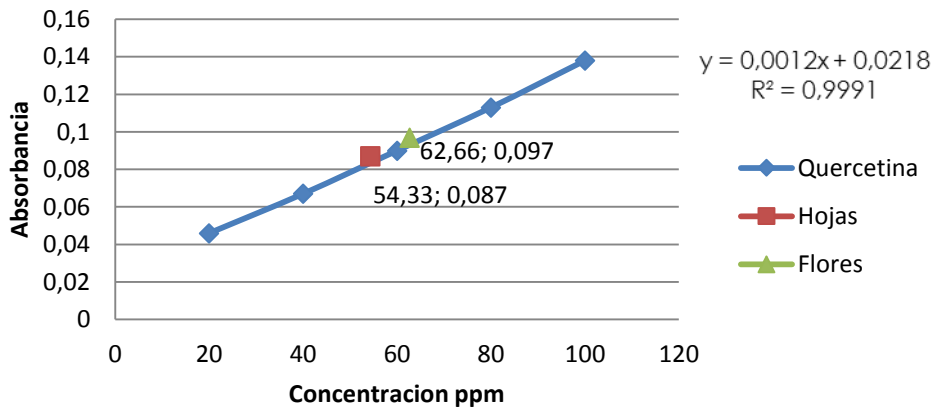
(II)

**Cuantificación de flavonoides
Extracto Metanólico 98%**



(III)

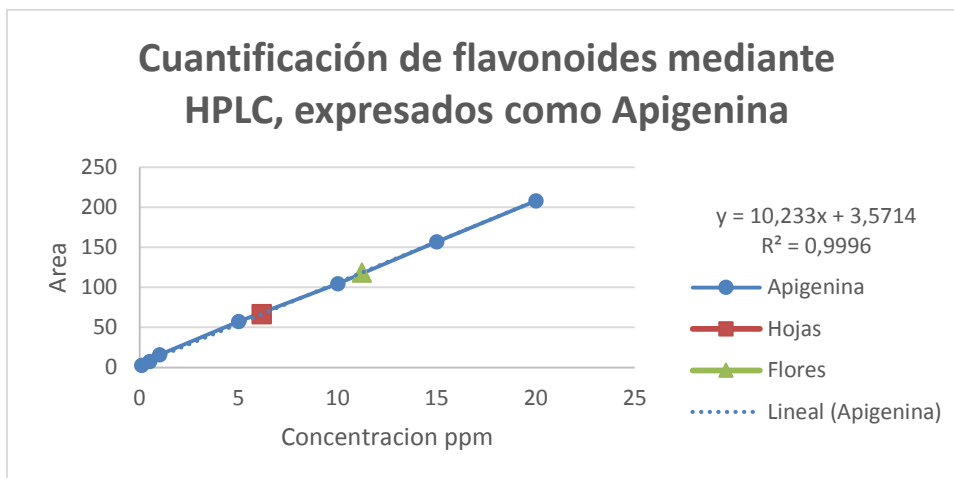
**Cuantificación de flavonoides
Extracto Hidroalcoholico 70%**



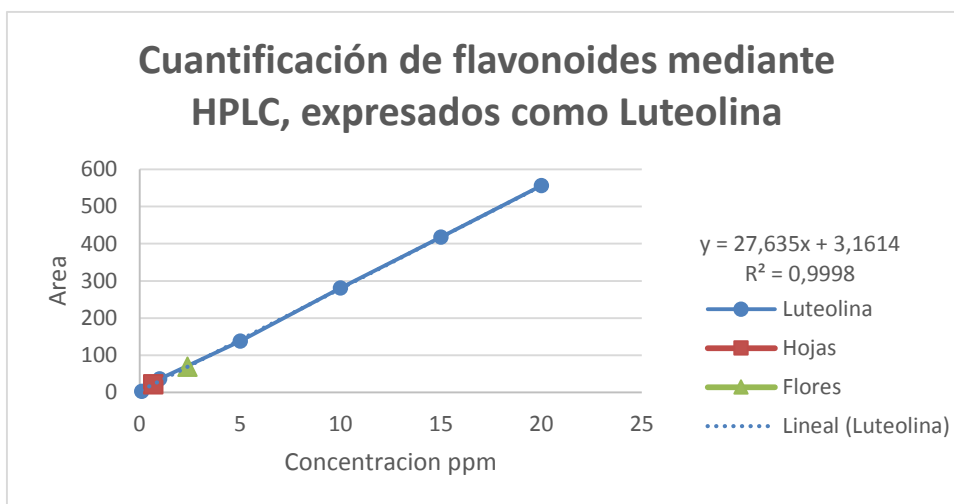
Fuente: Nataly Pinduisaca, 2016

ANEXO R: Cuantificación de flavonoides totales mediante HPLC, expresados como Apigenina (I), Luteolina (II) y Quercetina (III).

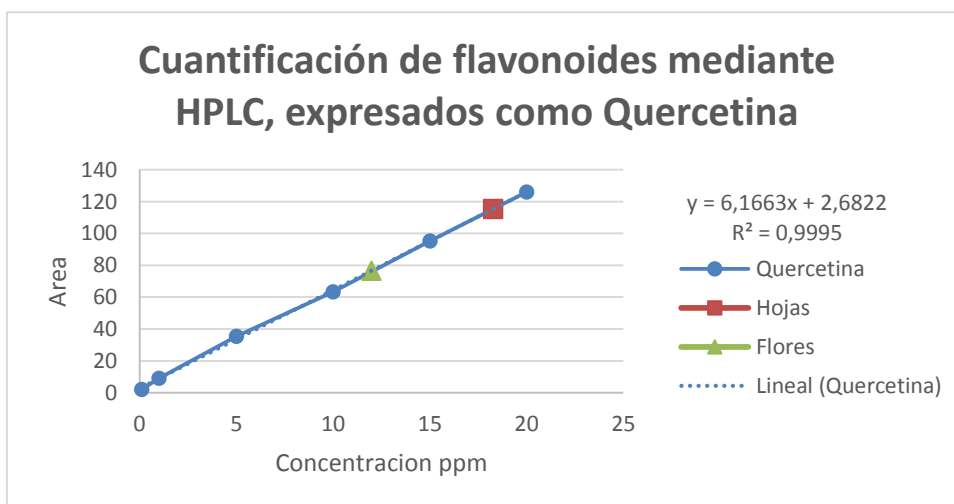
(I)



(II)

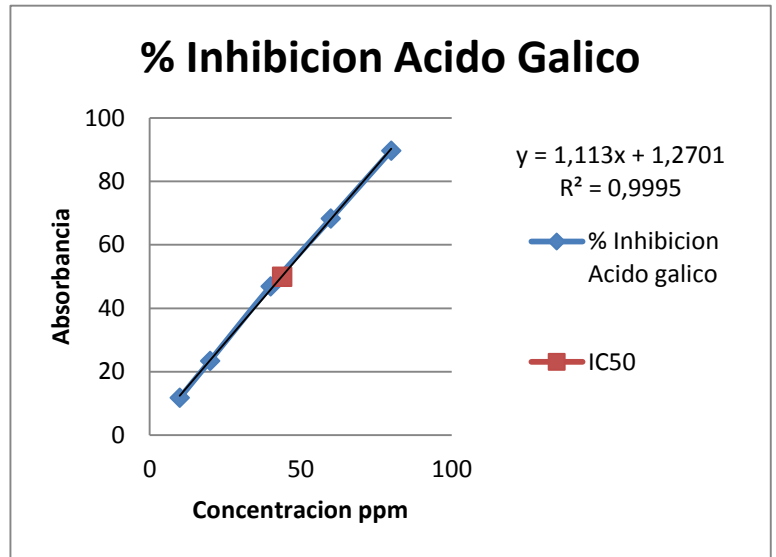
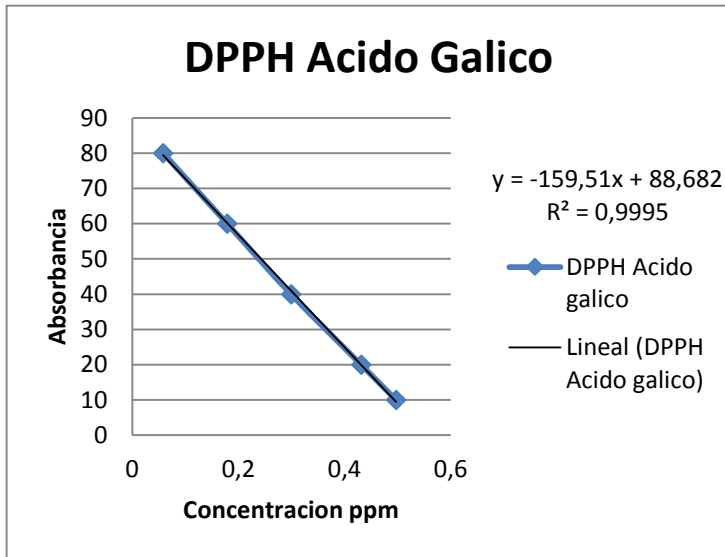


(III)



Fuente: Nataly Pinduisaca, 2016

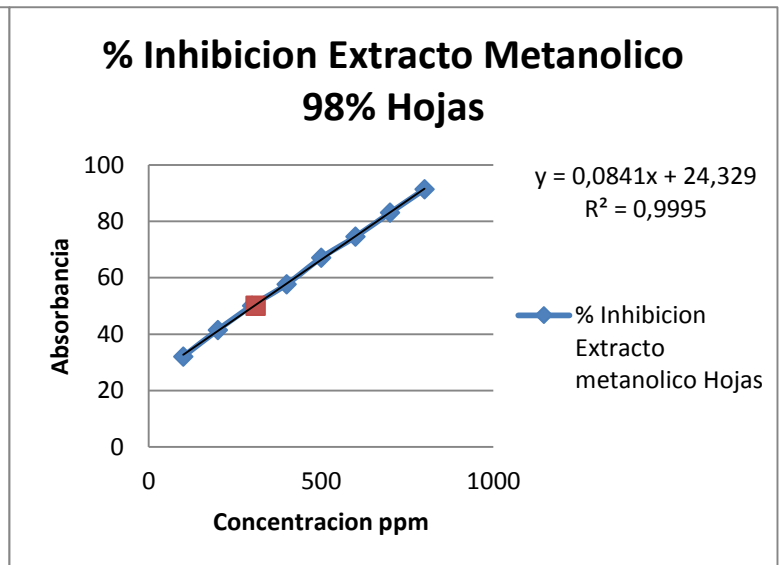
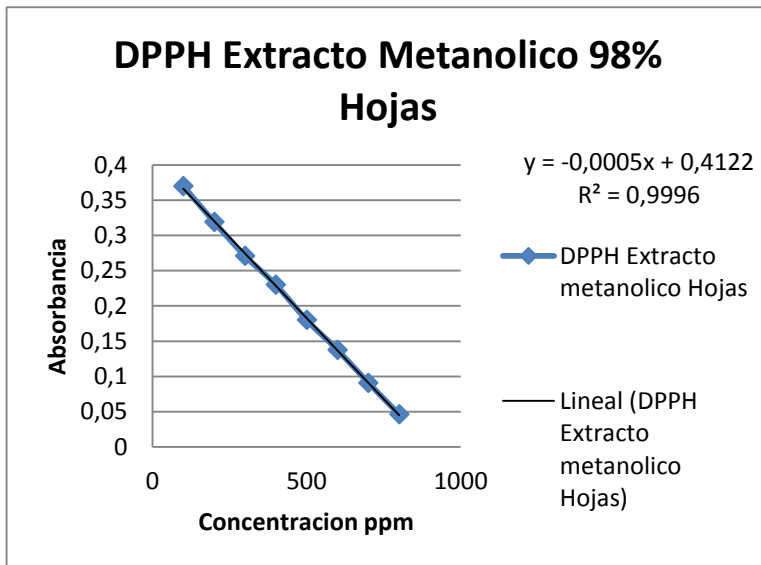
ANEXO S: Cuantificación de la actividad captadora de radicales libres en el ácido gálico.



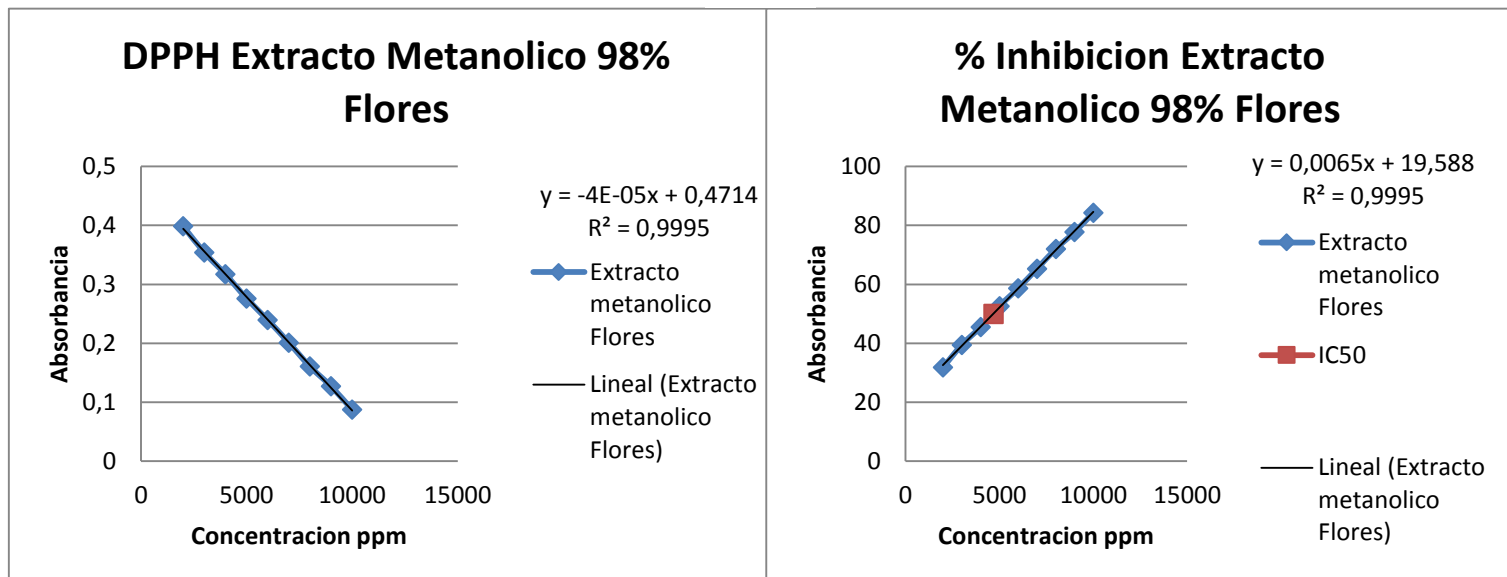
Fuente: Nataly Pinduisaca, 2016

ANEXO T: Cuantificación de la actividad captadora de radicales libres en el extracto metanolico 99,8% de hojas (I) y flores (II) de la especie *P. ligularis*.

(I)



(II)



Fuente: Nataly Pinduisaca, 2016