



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ESTUDIO FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN
VITRO DE HOJAS Y FLORES DE *Passiflora manicata*”**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: ANAHÍ BELÉN BONILLA RODRÍGUEZ

TUTOR: BQF. DIEGO VINUEZA TAPIA, M.Sc.

Riobamba – Ecuador

2016

© 2016, ANAHÍ BELÉN BONILLA RODRÍGUEZ

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 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO DE HOJAS Y FLORES DE *Passiflora manicata*” de responsabilidad de la señorita egresada, Anahí Belén Bonilla Rodríguez ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF Diego Vinuesa Tapia, M.Sc.

**DIRECTOR DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

Lic. Karen Acosta, M.Sc

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DOCUMENTALISTA

SISBIB ESPOCH

NOTA DEL

TRABAJO DE TITULACIÓN

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Anahí Belén Bonilla Rodríguez, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 5 de Febrero del 2016

ANAHÍ BELÉN BONILLA RODRÍGUEZ

CI: 060333888-0

DEDICATORIA

A Dios y a la Madre Dolorosa, por brindarme la dicha de la salud y bienestar físico y espiritual.

A mis papis, por haberme forjado como la persona que soy, por ser mi ejemplo y por brindarme su amor, comprensión, cariño y constante esmero.

Y a todos mis seres queridos y amigos, quienes han estado presentes en mi vida.

Anahí

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por la formación profesional que me ha brindado.

Al Grupo de Investigación de Productos Naturales y Farmacia de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, encabezado por la Dra. Susana Abdo, por permitirme ser parte de este proyecto.

A mi tutor, B.Q.F Diego Vinueza Tapia y colaboradora Lic. Karen Acosta por el aporte y apoyo durante la realización de la presente investigación.

Anahí

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	4
1.1 Fitoquímica	4
1.1.1 Introducción	4
1.1.2 Metabolitos secundarios.....	4
1.2 Género <i>Passiflora</i>	11
1.2.1 Introducción	11
1.2.2 Etnofarmacología	11
1.2.3 Fitoconstituyentes	11
1.2.4 Acción farmacológica	12
1.3. <i>Passiflora manicata</i>	13
1.3.1 Características botánicas	13
1.3.2 Distribución geográfica.....	14
1.3.3 Usos.....	14
1.3.4 Fitoconstituyentes.....	15
1.4 Actividad antioxidante	15
1.4.1 Radical libre	15
1.4.2 Estrés oxidativo	15
1.4.3 Antioxidante.....	16
1.4.4 Actividad antioxidante de flavonoides y ácidos fenólicos	17
CAPÍTULO II	18
2. MARCO METODOLÓGICO	18

2.1 Lugar de investigación	18
2.2 Recolección del material vegetal.....	18
2.3 Equipos y Reactivos	18
2.3.1 Equipos.....	18
2.3.2 Reactivos	18
2.4 Técnicas y métodos	19
2.4.1 Acondicionamiento de material vegetal	20
2.4.2 Control de calidad	20
2.4.3 Tamizaje fitoquímico	23
2.4.4 Cromatografía en capa fina	24
2.4.5 Cuantificación de fenoles totales.....	25
2.4.6 Cuantificación de flavonoides totales.....	26
2.4.7 Análisis HPLC	27
2.4.8. Capacidad captadora de radicales libres in vitro. Método DPPH*	28
CAPÍTULO III	31
3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	31
3.1. Control de calidad	31
3.2 Análisis cualitativo.....	31
3.2.1 Hojas	31
Tabla 2-3: Porcentaje de sólidos totales de los extractos de hojas.....	32
3.2.2 Flores.....	33
3.3 Cromatografía en capa fina (TLC).....	35
3.1.1 Extracto no hidrolizado	35
3.1.2 Extracto hidrolizado	37
3.4 Cuantificación de Fenoles Método de Folin-Ciocalteu	40
3.5 Cuantificación de flavonoides totales	41
3.6 Análisis HPLC	43

3.7 Capacidad captadora de radicales libres.....	46
CONCLUSIONES	48
RECOMENDACIONES	49
BIBLIOGRAFÍA.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Clasificación de terpenoides, según el número de átomos de carbono.....	5
Tabla 2-1: Grupos de flavonoides.....	8
Tabla 3-1: Fitoconstituyentes de varias especies de <i>Passiflora</i>	12
Tabla 1-3: Resultados del control de calidad de hojas y flores de <i>P. manicata</i>	31
Tabla 2-3: Porcentaje de sólidos totales de los extractos de hojas.....	32
Tabla 3-3: Resultados del tamizaje fitoquímico de hojas de <i>P. manicata</i>	32
Tabla 4-3: Porcentaje de sólidos totales de los extractos de flores.....	33
Tabla 5-3: Resultados del tamizaje fitoquímico de flores de <i>P. manicata</i>	33
Tabla 6-3: Posibles compuestos identificados mediante TLC de <i>P. manicata</i>	36
Tabla 7-3: Posibles compuestos identificados mediante TLC de <i>P. manicata</i>	37
Tabla 8-3: Posibles compuestos identificados en los extractos hidrolizados de <i>P. manicata</i> mediante TLC	40
Tabla 9-3: Resultados de la cuantificación de fenoles mediante el método de Folin-Ciocalteu en hojas y flores.....	40
Tabla 10-3: Resultados de la cuantificación de flavonoides totales.....	42
Tabla 11-3: Ecuación de la recta y r^2 para estándares en la cuantificación mediante HPLC.....	43
Tabla 12-3: Resultados de la cuantificación de agliconas mediante HPLC.....	45
Tabla 13-3: IC50 calculado para hojas, flores y el estándar de ácido gálico.....	46

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1-1 Estructura básica de un flavonoide.....	7
Figura 2-1: <i>Passiflora manicata</i>	14
Figura 3-1: Estructura de Isovitexina.....	15
Figura 4-1: Reacción de los flavonoides con radicales libres.....	17
Figura 1-2: Protocolo de la investigación.....	19
Figura 2-2: Obtención de metabolitos secundarios para realizar tamizaje fitoquímico.....	23
Figura 3-2: Esquema del tamizaje fitoquímico correspondiente a los extractos etéreo, acuoso y alcohólico.....	24
Figura 4-2: Esquema de la cuantificación de fenoles totales.....	26
Figura 5-2: Esquema de la cuantificación de flavonoides totales.....	27
Figura 6-2: Esquema de la evaluación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> mediante DPPH*.....	30
Figura 1-3: Cromatografía en capa fina de hojas y flores de <i>P. manicata</i>	35
Figura 2-3: Cromatografía en capa fina de estándares apigenina, luteolina y quercetina.....	38
Figura 3-3: Cromatografía en capa fina de los extractos hidrolizados de hojas y flores de <i>P. manicata</i>	39
Figura 4-3: Cromatogramas HPLC (A) Muestra extracto hidrolizado hojas, (B) Muestra extracto hidrolizado flores, (C) estándares de apigenina, quercetina y luteolina.....	44
Figura 5-3. Cromatograma 3D, en donde se representa los estándares y las muestras hidrolizadas de hojas y flores de <i>P. manicata</i>	45

ANEXOS

ANEXO A: Cromatografía en capa fina de los extractos de hojas y flores de *P. manicata*

ANEXO B: Hidrólisis de los extractos de hojas y flores de *P. manicata*

ANEXO C: TLC con fase móvil: Tolueno, metil isobutil cetona, acetato de etilo, agua (5:3:1:1)

ANEXO D: TLC con fase móvil: Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético, agua, metil isobutil cetona (6:0.5:0.5:1:4)

ANEXO E: TLC con fase móvil: Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético, agua, metil isobutil cetona (6:0.5:0.5:1:4)

ANEXO F: TLC con fase móvil: Agua, ácido fórmico, metil isobutil cetona, acetato de etilo (1:1:3:5)

ANEXO G: Método DPPH* para evaluación de la capacidad antioxidante.

ANEXO H: Curva de calibración para ácido gálico usada en la cuantificación de fenoles.

ANEXO I: Curva de calibración para quercetina usada en la cuantificación de flavonoides.

ANEXO J: Curva de calibración para quercetina usada en la cuantificación HPLC.

ANEXO K: Curva de calibración para luteolina usada en la cuantificación HPLC.

ANEXO L: Curva de calibración para apigenina usada en la cuantificación HPLC.

ANEXO M: Representación del % de inhibición vs la concentración para el cálculo del IC50 (A)Hojas, (B)Flores, (C) Ácido gálico

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue efectuar un estudio fitoquímico de hojas y flores de *Passiflora manicata* y la posterior evaluación de su actividad antioxidante. Previo al análisis cualitativo y cuantitativo se comprobó que la materia vegetal cumple con parámetros de calidad. Se realizó un tamizaje fitoquímico de extractos de diferente polaridad con lo que se pudo identificar cualitativamente su composición química. Por cromatografía de capa fina (TLC) se realizó la identificación presuntiva de flavonoides glicósidos y agliconas. Mediante técnicas espectrofotométricas se cuantificó el contenido de fenoles y flavonoides totales de extractos en acetato de etilo, metanol y alcohol 70 %. Para el análisis cromatográfico se realizó una hidrólisis ácida con el fin de cuantificar las agliconas provenientes de los flavonoides glicósidos. La evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* se realizó mediante el ensayo de captación de radicales libres con el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH*); se usó como antioxidante estándar ácido gálico. Los resultados fueron expresados como concentración inhibitoria 50 (IC50). Los compuestos identificados en TLC fueron: vitexina, isoorientina, vitexina-2''-O-ramnósido e isovitexina-2''-O-ramnósido. El contenido fenólico varió de 956.9892 ± 81.181 a 1389.0967 ± 645.1613 mg/100 gramos de planta, mientras que el contenido de flavonoides de 61.7971 ± 0.004 a 5310.1449 ± 100.4087 mg/100 gramos de planta; siendo el extracto hidroalcohólico de hojas el que presenta mayor contenido de compuestos. Se identificó y cuantificó apigenina en hojas y flores mediante cromatografía líquida de alta eficiencia. El IC50 calculado para hojas fue de 331.9234 ± 3.097 µg/ml y para flores de 3338.6306 ± 4.3089 µg/ml. Se concluye que las hojas presentan una mayor capacidad antioxidante en comparación que las flores, por lo que se recomienda profundizar los estudios farmacológicos, sobre actividades cicatrizante, antiinflamatoria y citotóxica de hojas de *Passiflora manicata*, con el fin de aprovechar su contenido de flavonoides

Palabras Clave: <ESTUDIO FITOQUÍMICO>, <HOJAS Y FLORES [*Passiflora manicata*]>, <2,2-difenil-1-picrilhidrazil [DPPH]>, <CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA>, <FLAVONOIDES TOTALES>, <FITOQUÍMICA>

ABSTRACT

The objective of this research was to conduct a phytochemical study of leaves and flowers of *Passiflora manicata* and the subsequently evaluation of their antioxidant activity. As a preliminary step to a qualitative and quantitative analysis it was necessary to check that the plant material meets quality standards. A phytochemical screening of extracts of different polarity was performed, which enable to identify its qualitatively chemical composition. By thin layer chromatography (TLC) the presumptive identification of flavonoid glycosides and aglycones was done. Through spectrophotometrically techniques it was possible to quantify the phenol and flavonoids total content of the extracts from ethyl acetate, methanol and 70 % alcohol. For the chromatographic analysis, an acid hydrolysis was done in order to quantify the aglycones coming from flavonoid glycosides. The evaluation of antioxidant activity in vitro was performed by radical scavenging assay with the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH*); it was used as standard antioxidant Gallic acid. The results were expressed as inhibitory concentration 50 (IC50). The identified compounds in TLC were: vitexina, isoorientin, vitexin-2''-O-rhamnoside and isovitexin-2''-O-rhamnoside. Phenolic content ranged from 956.9892 ± 81.181 to 1389.0967 ± 645.1613 mg/100 g of plant; being the hydroalcoholic extracto of leaves the one that presents a higher content of compounds. It was identified and quantified apigenin in leaves and flowers by liquid chromatography of high efficiency. The quantified apigenin in leaves of 331.9234 ± 3.097 $\mu\text{g/ml}$ and for the flowers 3338.6306 ± 4.3089 $\mu\text{g/ml}$. As conclusion, the leaves have a higher antioxidant capacity compared to the flowers, so it is recommended further pharmacological studies about cicatrizing, anti-inflammatory and cytotoxic activity of *Passiflora manicata* leaves, in order to benefit its flavonoid content.

Keywords: <STUDY PHYTOCHEMICAL>, <LEAVES AND FLOWERS [*Passiflora manicata*]>, <2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl [DPPH]>, <HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY EFFICIENCY>, <TOTAL FLAVONOIDS>, <PHYTOCHEMICAL>

INTRODUCCIÓN

El ser humano ha recurrido al uso de plantas desde tiempos remotos, siendo éstas usadas para mitigar el hambre y tratar enfermedades. En la actualidad, el uso de plantas medicinales forma parte de la medicina tradicional. En las últimas décadas, ha existido un creciente interés por el uso de medicamentos herbarios en países desarrollados y en desarrollo. (Villar y Villavicencio, 2001, p.9)

Aproximadamente, un 80 % de la población mundial cubre sus necesidades de atención primaria de salud con el uso de medicina tradicional, además es posible asegurar que gran parte de dichos tratamientos están vinculados al uso de extractos de plantas o sus principios activos. (Akerele, 1993, p.390)

Las plantas sintetizan en pequeñas cantidades metabolitos secundarios como alcaloides, polifenoles, flavonoides, saponinas, taninos, etc. Estos metabolitos presentan actividad biológica, por lo que son utilizados como fitofármacos o como parte de la síntesis de utilidad terapéutica. (Waizel, 2011, pp.61-75)

La investigación de productos naturales para su posterior aplicación terapéutica en fitofármacos, es una alternativa para contribuir al buen vivir de la población de nuestro país, ya que permite disminuir la importación de medicamentos y promover la autosuficiencia. (Waizel, 2011, pp.61-75)

En la actualidad, muchas investigaciones se han enfocado en el estudio de aterosclerosis, cáncer, diabetes y otras enfermedades degenerativas en los seres humanos, asociadas a una sobreproducción de radicales libres, lo que se conoce como estrés oxidativo. Ciertas especies vegetales (frutas, verduras, hierbas medicinales, etc.) pueden contener una amplia variedad de moléculas captadoras de radicales libres, tales como compuestos fenólicos (por ejemplo ácidos fenólicos, flavonoides, quinonas, cumarinas, lignanos, estilbenos, taninos), compuestos de nitrógeno (alcaloides, aminas, betalaínas), vitaminas, terpenoides (incluyendo carotenoides), y algunos otros metabolitos endógenos; estos compuestos actúan como antioxidantes naturales. La ingesta de antioxidantes naturales se ha asociado con un menor riesgo de cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes y otras enfermedades. (Cai et al., 2004, pp. 2157-2184)

Varias especies del género *Passiflora* han sido usadas, en la medicina popular, como sedantes y tranquilizantes, dicha actividad ha sido comprobada mediante investigaciones que se han enfocado en el efecto depresor del Sistema Nervioso Central, en especial como ansiolítico y como alternativa al tratamiento con benzodiazepinas. (Dhawan et al., 2004, pp.1-23)

Aproximadamente, 500 especies pertenecen al género *Passiflora*. Dhawan y colaboradores, entre los años 2000 y 2004 realizaron una serie de investigaciones acerca de *Passiflora incarnata*, entre los que se incluyen estudios comparativos con otras especies, evaluación de actividad biológica e identificación de compuestos activos. Además, Dhawan y colaboradores, en el año 2004 publicaron un artículo de revisión acerca del género *Passiflora*, en el cual describe morfología, microscopía, uso tradicional, fitoconstituyentes, informes farmacológicos, las aplicaciones clínicas e informes toxicológicos de varias especies del género *Passiflora*. (Dhawan et al., 2004, pp.1-23)

El artículo “Analyses of Passiflora compounds by chromatographic and electrophoretic techniques” realiza una síntesis acerca de las técnicas analíticas utilizadas para la evaluación de los diferentes compuestos presentes en cada parte de la planta, como hojas, frutas con sus cortezas y semillas. En aquel artículo se mencionan metodologías de extracción, identificación y cuantificación. (Silva & Bottoli, 2014. pp. 76-95)

A pesar del interés en el estudio de algunas especies del género *Passiflora* (*P. incarnata*, *P. edulis* var. *edulis* y *P. edulis* var. *flavicarpa*), otras especies son aún poco investigadas en cuanto a sus composición química y actividad biológica, aunque estas especies han sido ampliamente utilizadas en la medicina popular tradicional y en la dieta diaria, como por ejemplo, *Passiflora manicata* es una especie que no ha sido extensamente estudiada, por lo que es indispensable previo a la comprobación de su actividad farmacológica, realizar un estudio fitoquímico para dilucidar los grupos de componentes presentes en la misma. En el 2008 un estudio evalúa la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de hojas de *P. manicata*, concluyendo que dicho extracto presentó actividad frente a *E. coli*, *Candida albicans* y *B. subtilis*. (Lizcaino & Vergara, 2008, p.117)

Estudios reportaron la presencia de polifenoles de tipo flavónico como: vitexina, isovitexina y orientina, en extractos de hojas de *P. manicata*., dichos compuestos actúan como protectores contra especies de oxígeno reactivo y frente a la glicación de proteínas, pudiendo considerarse esta especie como una nueva fuente de antioxidantes naturales. (Da Silva et al., 2013. pp. 45-51)

Los objetivos de la investigación en *Passiflora manicata*, son identificar y cuantificar los principales componentes fitoquímicos de esta especie y evaluar la capacidad antioxidante de sus hojas y flores, mediante el ensayo *in vitro* DPPH*. Además los datos aportados son de interés para futuras investigaciones acerca de otros tipos de actividad farmacológica.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar la composición fitoquímica y evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de hojas y flores de *Passiflora manicata*.

Objetivos Específicos.

1. Determinar la composición fitoquímica cualitativa de la droga vegetal seca proveniente de hojas y flores de la especie *P. manicata* mediante tamizaje fitoquímico.
2. Identificar los metabolitos secundarios de tipo flavónico en hojas y flores de *P. manicata* mediante cromatografía en capa fina (TLC).
3. Cuantificar el contenido de fenoles y flavonoides de diferentes extractos de hojas y flores de *P. manicata* mediante técnicas espectrofotométricas y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).
4. Evaluar la capacidad captadora de radicales libres *in vitro* de extractos de hojas y flores de *P. manicata* mediante el ensayo DPPH*.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Fitoquímica

1.1.1 Introducción

Las plantas medicinales son una importante fuente de fitoquímicos. Estudios realizados durante las dos o tres últimas décadas han demostrado que estos fitoquímicos tienen un papel importante en la prevención de enfermedades crónicas como el cáncer, diabetes y las enfermedades coronarias. Las principales clases de fitoquímicos con funciones de prevención de enfermedades son: fibra dietética, antioxidantes, anticancerígenos, agentes de desintoxicación, agentes potenciadores de inmunidad y agentes neurofarmacológicos. Algunos de éstos tienen más de una función. (Mamta et al., 2013, pp.168-172)

El objetivo del análisis fitoquímico es la determinación de metabolitos secundarios existentes en especies vegetales. Para lograr este objetivo son usadas una serie de técnicas para su separación, purificación y determinación de su estructura química. (Lock, 1994, pp. 2-5)

1.1.2 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas que no están involucrados directamente en el crecimiento y desarrollo normal de un organismo. Mientras que los metabolitos primarios juegan una función activa en la fotosíntesis y la respiración; la ausencia de metabolitos secundarios no da lugar a la muerte inmediata, a largo plazo existe un deterioro de la capacidad de supervivencia del organismo. Estos compuestos son un grupo muy diverso de productos naturales sintetizado por plantas, hongos, bacterias, algas, y los animales. La mayoría de metabolitos secundarios, tales como terpenos, compuestos fenólicos y alcaloides se clasifican en función de su biosíntesis. (Agostini, 2012, p.131)

Los metabolitos secundarios se producen en niveles más altos durante la transición desde crecimiento activo hasta la fase estacionaria. Estas moléculas juegan un papel importante en la adaptación de las plantas en su entorno. El organismo productor puede crecer en ausencia de su síntesis, lo que sugiere que el metabolismo secundario no es esencial, por lo menos a corto plazo para la supervivencia. Los genes implicados en el metabolismo secundario proporcionan una ventaja genética que permite la

mutación y la selección natural. El metabolismo secundario se basa en el metabolismo primario, el cual suministra las enzimas, energía, sustratos y maquinaria celular necesaria. (Agostini, 2012, p.131)

Una clasificación simple de los metabolitos secundarios incluye los siguientes principales grupos: terpenos (glucósidos cardíacos, carotenoides y esteroides), compuestos fenólicos (tales como ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, flavonoides, estilbenos, taninos y lignina) y compuestos nitrogenados (tales como alcaloides y glucosinolatos). (Agostini, 2012, p.131)

1.1.2.1 Terpenoides

Los terpenoides son los hidrocarburos de origen vegetal derivados de la fórmula general $(C_5H_8)_n$, así como sus derivados oxigenados, hidrogenado y deshidrogenados. La descomposición de terpenoides da isopreno como uno de los productos. (Bano, 2007)

Los principales terpenoides incluyen monoterpenos (con 10 átomos de carbono), sesquiterpenos (15 C), diterpenos (20 C), triterpenos (30 C), esteroides (27 C), tetraterpenos (40 C), y politerpenos. Aunque sus principales bloques de construcción son simples. La mayoría de los terpenos representan estructuras complejas debido a sus sustituyentes y las formaciones de anillo secundario. (Wing, 2004, p.915)

Tabla 1-1: Clasificación de Terpenoides, según el número de átomos de carbono

Número de átomos de carbono	Valor de n	Clase
10	2	Monoterpenoides($C_{10}H_{16}$)
15	3	Sesquiterpenoides($C_{15}H_{24}$)
20	4	Diterpenoides($C_{20}H_{32}$)
25	5	Sesterpenoides($C_{25}H_{40}$)
30	6	Troterpenoides($C_{30}H_{48}$)
40	8	Tetraterpenoides($C_{40}H_{64}$)
>40	>8	Polyterpenoides(C_5H_8) _n

Realizado por: Anahí Bonilla

Fuente: (Bano, 2007)

1.1.2.2 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se caracterizan por poseer al menos un anillo aromático (C_6) que lleva uno o más grupos hidroxilo. Ellos se sintetizan principalmente a partir ácido cinámico, que se forma a partir de fenilalanina por la acción fenilalanina amonio liasa. Los compuestos fenólicos son divididos

en varios grupos, que se distinguen por el número de átomos de carbono constitutivos en conjunto con la estructura del esqueleto básico fenólico (fenoles simples, ácidos benzoicos y flavonoides). (Michalack, 2006, pp. 523-530)

Estas moléculas presentan actividad antioxidante, antimutagénica, antiviral, antibacterial (bactericida, bacteriostática), antifúngica, insecticida, estrogénica y queratolítica; actividades que sirven para proteger al organismo de factores ambientales. (Castellano et al., 2012, pp. 231-250)

En condiciones de estrés se observa un incremento en el metabolismo fenilpropanoide y por tanto un incremento de la cantidad de compuestos fenólicos sintetizados. La síntesis de las isoflavonas y algunos otros flavonoides se induce cuando las plantas se infectan o lesionan, o en bajas temperaturas y condiciones de baja de nutrientes. La mayoría de ellos tienen actividad antimicrobiana.

Algunas especies vegetales acumulan flavonoides y otros compuestos fenólicos que absorben radiación UV principalmente en vacuolas de las células epidérmicas, con el fin de evitar la penetración de la radiación UV-B en los tejidos más profundos de la planta. (Michalack, 2006, pp. 523-530)

La inducción de la biosíntesis de los compuestos fenólicos fue observado en el trigo en respuesta a la toxicidad de níquel y en el maíz en respuesta al aluminio. La especie *Phaseolus vulgaris* expuesta a Cd^{2+} acumuló compuestos fenólicos solubles e insolubles y hojas de *Phyllanthus tenellus* presentó mayor contenido fenólico después de ser rociadas con sulfato de cobre. (Michalack, 2006, pp. 523-530)

Un aumento de compuestos fenólicos solubles tales como compuestos intermedios en la biosíntesis de la lignina pueden reflejar un cambio anatómico inducido por factores de estrés: aumento en la resistencia de la pared celular y la creación de barreras físicas que impiden la acción nociva de los metales pesados. (Michalack, 2006, pp. 523-530)

- FLAVONOIDES

Los flavonoides se componen de un gran grupo de compuestos polifenólicos que tiene una estructura benzo- γ -pirona. Son sintetizados por vía fenilpropanoide. Algunos estudios muestran que metabolitos secundarios de naturaleza fenólica incluyendo flavonoides son responsables de la variedad de actividades farmacológicas. (Kumar & Pandei, 2013, pp. 1—11)

Los flavonoides son un grupo de compuestos naturales con diversas estructuras fenólicas. En 1930 una nueva sustancia fue aislada de naranjas. En ese momento se creía que se trataba de una vitamina y se designó como vitamina P. Más tarde se hizo evidente que esta sustancia era un flavonoide (rutina) y hasta ahora más de 4.000 variedades de flavonoides se han identificado. (Kumar & Pandei, 2013, pp. 1—11)

La estructura química de los flavonoides se basa en un esqueleto de quince carbonos que consta de dos anillos bencénicos (A y B) unidos a través de un anillo heterocíclico de pirano (C). Se pueden dividir en una variedad de clases, tales como flavonas (por ejemplo, apigenina y luteolina), flavonoles (por ejemplo, quercetina, kaempferol, miricetina y fisetina), flavanonas (por ejemplo, flavanona, hesperetina, y naringenina), y otros. (Kumar & Pandei, 2013, pp. 1—11)

Las diversas clases de flavonoides difieren en el nivel de oxidación y el patrón de sustitución del anillo C, mientras que los compuestos individuales dentro de una clase diferir en el patrón de sustitución de los anillos A y B. (Kumar & Pandei, 2013, pp. 1—11)

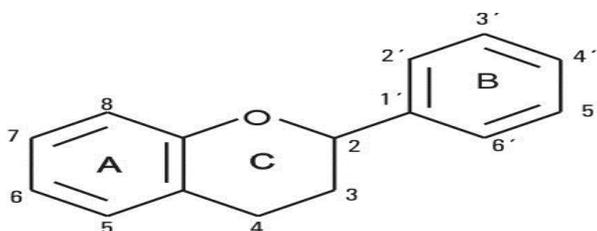
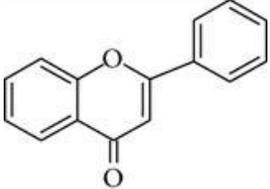
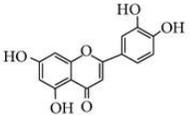
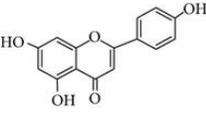
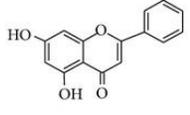
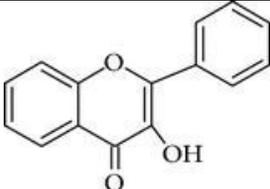
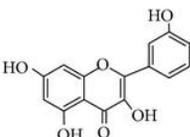
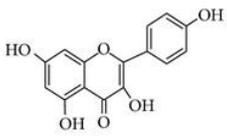
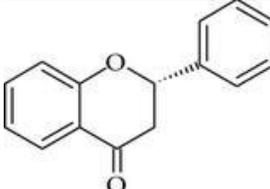
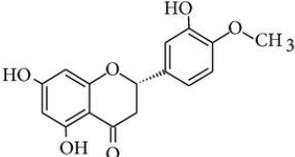
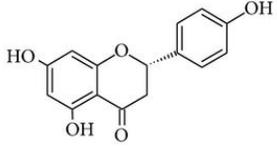
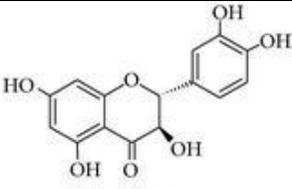
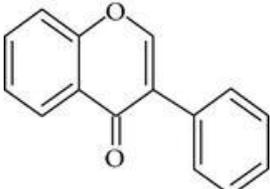
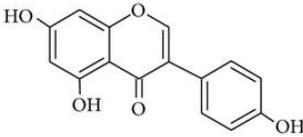
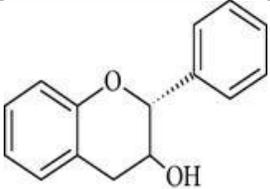
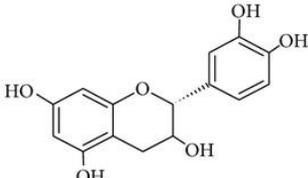


Figura 2-1 Estructura básica de un flavonoide

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

Los flavonoides se presentan como agliconas, glucósidos, y derivados metilados. La estructura básica de un flavonoide es la aglicona. Cuando se forman los glucósidos, el enlace glicosídico normalmente se encuentra en las posiciones 3 o 7 y el hidrato de carbono puede ser L-ramnosa, D-glucosa, glucorhamnose, galactosa, o arabinosa. (Kumar & Pandei, 2013, pp. 1—11)

Tabla 2-1: Grupos de flavonoides

GRUPO	ESTRUCTURA BÁSICA	EJEMPLOS
Flavonas		   Luteolina Apigenina Crisina
Flavonol		  Quercetina Kaempferol
Flavanonas		  Hesperidina Naringenina
Flavanonol		 Taxifolin
Isoflavonas		 Genisteína
Flavan-3-ol		 Catequina

Fuente: (Kumar & Shashank, 2013)

ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

Farmacológicamente, los flavonoides destacan por su baja toxicidad, presentando en general, actividad sobre el sistema vascular con efecto protector de la pared vascular, (debido a la disminución de la permeabilidad y al aumento de la resistencia de los capilares). Asimismo, tienen efecto antioxidante, pueden inhibir la peroxidación lipídica, poseen efectos antimutagénicos y tienen la capacidad de inhibir diversas enzimas. La acción antioxidante de los flavonoides depende principalmente de su capacidad de reducir radicales libres y quelar metales, impidiendo las reacciones catalizadoras de los radicales libres. También actúan inhibiendo sistemas enzimáticos relacionados con la funcionalidad vascular como: la catecol O-metil transferasa (COMT), con lo que aumentan la duración de la acción de las catecolaminas, incidiendo por tanto en la resistencia vascular; la histidina decarboxilasa, afectando por tanto a la acción de la histamina; las fosfodiesterasas, por lo que inhiben la agregación y adhesividad plaquetaria, etc. Por otro lado, los flavonoides ejercen otras acciones: diurética, antiespasmódica, antiulcerosa gástrica y antiinflamatoria. En fitoterapia los flavonoides se emplean principalmente en casos de fragilidad capilar como venotónicos. (Lopez, 2002, pp. 108-113)

Además, se ha demostrado la actividad de ciertos flavonoides sobre el sistema nervioso central. Tanto las agliconas y sus conjugados pueden pasar la barrera hematoencefálica. En el SNC varias flavonas, entre ellas la apigenina, se unen al sitio de las benzodiazepinas en el receptor GABA_A lo que resulta en la sedación, efectos ansiolíticos o anticonvulsivos. (Jager & Saabi, 2011, pp. 1471-1485)

- **TANINOS**

Son un grupo de sustancias compuestas por complejas cadenas oligoméricas caracterizadas por la presencia de compuestos polifenólicos. Tienen peso molecular mayor que 500 kDa, alcanzando valores superiores a 20.000 kDa. Una de las principales características de taninos es su capacidad para formar complejos fuertes con proteínas y en menor medida con otras macromoléculas tales como almidón, celulosa y minerales. Los taninos se pueden dividir en taninos hidrolizables y taninos condensados en función de su estructura y propiedades. (Hassanpour & Maheri-sis, 2011, p. 154)

- **CHALCONAS Y CUMARINAS**

Las chalconas son compuestos intermediarios en la biosíntesis de flavonoides. En algunas especies vegetales, los principales pigmentos de flores amarillas son chalconas. Al igual que otros fenilpropanoides, las cumarinas constituyen una clase de metabolitos secundarios de plantas, derivados de ácido cinámico por ciclación de la cadena lateral del ácido cumárico. Estas sustancias

son más comunes en la naturaleza en forma de glucósidos, tales como umbeliferona, esculetina y escopoletina. (Reis, 2013, pp.87-106)

- **ÁCIDOS FENÓLICOS**

El término "ácidos fenólicos" se designa a fenoles que poseen un ácido carboxílico. Además, la razón para incluir ácidos fenólicos en la familia de polifenoles de las plantas radica en el hecho de que son bioprecusores de polifenoles. Los ácidos fenólicos de origen natural, según su estructura pueden ser hidroxicinámicos o hidroxibenzoico. (Saxena et al., 2012, pp. 130-134)

1.1.2.3 Compuestos nitrogenados

Una gran variedad de metabolitos secundarios de plantas tienen nitrógeno en su estructura. Se incluyen en esta categoría alcaloides y glucósidos cianogénicos, que son de considerable interés por su toxicidad para los seres humanos, así como sus propiedades medicinales. La mayoría de metabolitos nitrogenados secundarios se sintetizan a partir de aminoácidos comunes. (Taiz et al., 2015, 75)

- **ALCALOIDES**

Definir el término 'alcaloide' (álcalis similares) es algo difícil porque no existe una diferencia clara entre alcaloides y aminas complejas de origen natural. Los alcaloides típicos se derivan de fuentes vegetales, que contienen uno o más de nitrógeno átomos (generalmente en un anillo heterocíclico) y por lo general tienen una marcada acción fisiológica en el hombre u otros animales. La mayoría de los alcaloides son sustancias cristalinas bien definidas, unidas con ácidos forman sales. En la planta pueden existir en estado libre, como sales o como N -óxidos. Además de los elementos carbono, hidrógeno y nitrógeno, la mayoría de los alcaloides contienen oxígeno. Alcaloides muestran una gran variedad en su origen botánico y bioquímico, en estructura química y en la acción farmacológica. En consecuencia, son posibles muchos sistemas diferentes de clasificación. (Evans, 2009, pp. 391-402)

- **GLUCÓSIDOS CIANOGENÍCOS**

Los glucósidos cianogénicos pueden ser definidos químicamente como glucósidos de a-hidroxinitrilos y pertenecen a los metabolitos secundarios de las plantas. Son derivados de aminoácidos, presentes en más de 2500 especies de plantas. En la hidrólisis enzimática los glucósidos cianogénicos producen la aglicona (A-hidroxinitrilo) y un azúcar. Las agliconas pueden

ser agrupados en alifáticos y compuestos aromáticos; el azúcar es principalmente D-glucosa, pero puede haber otros azúcares también. (Vetter, 2000, pp. 11-36)

1.2 Género *Passiflora*

1.2.1 Introducción

El género *Passiflora* comprende aproximadamente unas 500 especies. Las especies de este género están distribuidas en regiones templadas y tropicales de América. Aunque también habitan con menor frecuencia en Asia, Australia y África. Varias especies son cultivadas ya que sus frutos son comestibles, la especie más cultivada es *Passiflora edulis*. (Hickey & King, 1988)

1.2.2 Etnofarmacología

Varias especies de *Passiflora* se han usado en la medicina tradicional en muchos países. (Dhawan et al., 2004, pp.1-23) La especie *Passiflora edulis* se ha utilizado en Sudamérica como sedante, diurética, antihelmíntica, antidiarreica, y también en el tratamiento de la hipertensión, síntomas menopáusicos, cólicos en niños. (Chopa et al. 1956)

Passiflora incarnata es un remedio tradicional europeo, ha sido utilizado en medicina homeopática para el insomnio, la ansiedad, y se ha utilizado como un té sedante en América del Norte. (Begner, 1995)

La especie *Passiflora quadrangularis*, (Badea) es usada en poblaciones del Caribe como sedante y para los dolores de cabeza. El té de hoja se toma para la presión arterial alta y la diabetes. (Dhawan et al., 2004, pp.1-23)

1.2.3 Fitoconstituyentes

Los metabolitos secundarios generalmente encontrados en este género son: alcaloides, fenoles, flavonoides glicosilados y glicósidos cianogénicos. La información bibliográfica indica que están disponibles una serie de investigaciones sobre *Passiflora incarnata* y *Passiflora edulis*, mientras que la información acerca de otras especies es esporádica. (Dhawan et al., 2004, pp.1-23)

1.2.4 Acción farmacológica

La mayoría de la investigación del área farmacológica ha sido llevada a cabo sobre el efecto depresor del Sistema Nervioso Central de diversas especies del género *Passiflora*. (Dhawan et al., 2004, pp.1-23)

El extracto acuoso de *Passiflora edulis* ha presentado efectos no específicos sobre el SNC en ratones, ratas y voluntarios humanos sanos. (Maluf et al., 2006, pp. 262-266.

Tabla 3-1: Fitoconstituyentes de varias especies de *Passiflora*

Especie	Fitoconstituyente
<i>Passiflora alata</i>	C-glicosil flavonoides, 2 ^o -xilosilvitexina y una pequeña cantidad de vitexina, isovitexina y orientina.
<i>Passiflora foetida</i>	Flavonoides, 7,4'-dimetoxiapigenina, ermanin, 4',7-O-dimetil-naringenina, 3,5-dihidroxi-4,7-dimetoxi flavanona C-glicosil flavonoides, apigenina, isovitexina, vitexina, 2 ^o -xilosilvitexin, luteolina-7-β-δ-glucosido, kaempferol. Glicósidos cianhídricos, tetrafillina B , tetrafilin B sulfato, ácido linoleico y ácido linolénico; alfa-pironas llamadas passifloricinas
<i>Passiflora quadrangularis</i>	Passiflorina; Triterpenos glicosidos. Monoterpenoides: (2E)-2,6-dimetil-2,5 ácido heptadienoico,
<i>Passiflora serratifolia</i>	C-glicosil flavonoides vitexina, isovitexina, orientina, 2 ^o -xilosil vitexina y 2 ^o -xilosil isovitexina.

Fuente: (Dhawan S., Dhawan K., Sharma A., 2004)

Un estudio *P. edulis* y *P. incarnata* comparó la actividad ansiolítica de estas dos plantas. El extracto de metanol de *P. incarnata* exhibió actividad ansiolítica significativa a una dosis oral de 125 mg/ kg, mientras que *P. edulis* estaba desprovista de cualquier actividad significativa. (Dhawan, 2001, pp. 698-702) El extracto metanólico de *P. incarnata* se sometió adicionalmente a métodos de fraccionamiento, cromatográficos y de partición para llegar a una fracción casi pura, la cual exhibió mayor actividad ansiolítica a una dosis de 10 mg / kg en ratones. (Dhawan, 2001, pp. 165-170) Los estudios de caracterización mediante UV, LC-MS, GC-MS, IR, ¹H, ¹³C NMR confirmaron la presencia de una benzoflavona (BZF), compuesto al cual se atribuyó su actividad en el SNC. (Dhawan, 2001, pp. 165-170)

1.3. *Passiflora manicata*

1.3.1 *Características botánicas*

Presentan las siguientes características: Son plantas pubescentes. Presentan tallos angulares. Sus hojas son ovadas, trilobuladas, de 4.2 a 10.0 cm de largo y 5.0 a 12.0 cm de ancho, de ángulos de 45 grados entre lóbulos medios y laterales, con sus lóbulos oblongos u ovados, agudos o acuminados en el ápice, redondeadas o ligeramente acorazonadas en la base, glandular-aserradas en las márgenes, pubescentes en la superficie abaxial, glabras en la superficie adaxial, pecíolos de 1.4 a 4.1 cm de largo. (Escobar, 1988)

Presenta pedúnculo grueso, de 4.6 a 7.5 cm de largo; brácteas ovadas, libres hasta la base o unidas cerca de la base, de 2.0 a 4.0 cm de largo y 1.0 a 2.0 cm de ancho, acuminadas o agudas en el ápice, cuneadas o redondeadas en la base. (Escobar, 1988)

Flores erectas de 5.0 a 5.6 cm de largo; hipantios cilíndricos, de aproximadamente 2 cm de largo; sépalos lanceolados de 3.0 a 3.6 cm de largo, de aproximadamente 6 mm de ancho, verdosos abaxialmente, rojos adaxialmente; pétalos sub-iguales a los sépalos, rojos; corona en 3 o 4 series, con filamentos de hasta 4 mm de largo, (Escobar, 1988)

Presenta frutos obovados u oblongos, su tamaño varía de 3.5 a 5.5 cm de largo y 2.0 a 3.7 cm de ancho, con su pericarpio coriáceo, verde cuando madura; semillas obovadas a acorazonadas, de 3.5 a 5.1 mm de largo y 2.0 a 3.0 mm de ancho, de color café oscuro; arilo anaranjado poco succulento. (Escobar, 1988)



Figura 2-1: *Passiflora manicata*

Realizado por: Anahi Bonilla, 2015

1.3.2 Distribución geográfica

Es nativa de países como: Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú. Posiblemente es originaria de los Andes de Perú y Chile, entre 1400m -2800 m de altitud. Crece como una enredadera de forma silvestre. (Escobar, 1988)

1.3.3 Usos

El fruto de *P. manicata* no es comestible, su color verde impide diferenciar entre el estado maduro e inmaduro. El consumo del fruto en estado inmaduro puede desencadenar efectos tóxicos y sicótrpos, de lo cual deriva su nombre común: diablito. Esta especie es utilizada en el mejoramiento genético de la planta de taxo, ya que pertenecen al mismo género. *P. manicata* es resistente a enfermedades fúngicas y nematodos. (Torres, 2007)

1.3.4 Fitoconstituyentes

El extracto acuoso presenta isovitexina, un C-glicosil flavonoide, como el compuesto principal. Otros C-glicosil flavonoides como isoorientina y vitexina también fueron identificados. (33)

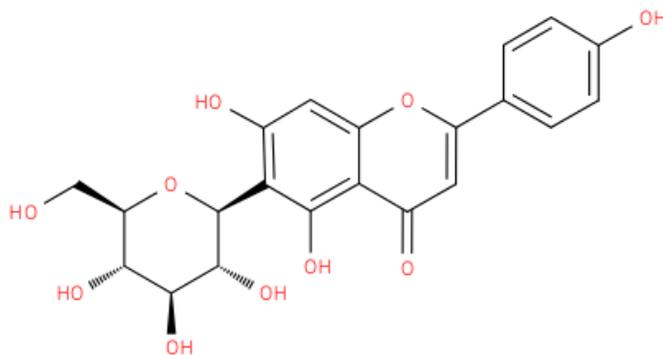


Figura 3-1: Estructura de Isovitexina

Fuente: (Da Silva, 2013)

1.4 Actividad antioxidante

1.4.1 Radical libre

Los radicales libres son especies moleculares muy reactivas con un electrón no apareado; sólo persisten durante un tiempo muy breve antes de colisionar con otra molécula y sustraer o donar un electrón para alcanzar estabilidad. Al hacerlo, generan un nuevo radical a partir de la molécula con la cual colisionaron. Los radicales más perjudiciales en sistemas biológicos son los radicales de oxígeno (a veces denominados especies de oxígeno reactivas), en especial el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\bullet OH$) y $| O_2$ Oxígeno singulete. (Murray et al., 2009, p.482)

1.4.2 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es una condición causada por un desequilibrio entre la producción de especies de oxígeno reactivo y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos

intermedios o reparar el daño resultante. Todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células. Este entorno reductor es preservado por las enzimas que mantienen el estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica. Desbalances en este estado normal redox pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ácido desoxirribonucleico. (Schafer & Buettner, 2001,1191-1212).

En el ser humano, el estrés oxidativo está involucrado en muchas enfermedades, como la aterosclerosis, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer y también puede ser importante en el envejecimiento. Sin embargo, las especies reactivas de oxígeno pueden resultar beneficiosas ya que son utilizadas por el sistema inmunitario como un medio para atacar a patógenos. Las ROS son también utilizadas en la señalización celular (Lennon et al., 1991, 203-214).

1.4.3 Antioxidante

Un antioxidante es una molécula suficientemente estable como para donar un electrón a un radical libre y neutralizarlo, reduciendo así su capacidad de daño. Estos antioxidantes retrasan o inhiben el daño celular principalmente a través de su propiedad captadora de radicales libres. Estos antioxidantes de bajo peso molecular pueden interactuar de manera segura con los radicales libres y terminar la reacción en cadena antes de que moléculas vitales sean dañados. Algunos de estos antioxidantes, incluyendo el glutatión, ubiquinol, y ácido úrico, se producen durante el metabolismo normal del cuerpo. Otros antioxidantes se encuentran en la dieta. (Lobo et al., 2010, pp. 118-126)

1.4.3.1 Antioxidantes sintéticos

Se han desarrollado antioxidantes sintéticos con el fin de tener un sistema estándar de medida de la actividad antioxidante para comparar con compuestos naturales y para ser incorporados en alimentos. Estos compuestos puros se añaden a los alimentos para que puedan soportar varios tratamientos y condiciones, así como para prolongar la vida útil. Hoy en día, casi todos los alimentos procesados tienen antioxidantes sintéticos incorporados, que se reportan como ser seguros, aunque algunos estudios indican lo contrario. BHT (hidroxitolueno butilado) y BHA (hidroxianisol butilado) son los antioxidantes químicos más ampliamente utilizados. (Carocho & Ferreira, 2013, 15-25)

1.4.3.2 Antioxidantes naturales

En condiciones fisiológicas, el sistema de defensa antioxidante humano que incluye, la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión (GSH) y otros, permite la

eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en exceso. Sin embargo, nuestros sistemas de defensa endógenos están incompletos sin compuestos antioxidantes exógenos tales como la vitamina C, la vitamina E, carotenoides y polifenoles, que juegan un papel esencial en muchos mecanismos antioxidantes en organismos vivos. (Bouayed & Bohn, 2010, pp. 228-237)

1.4.4 Actividad antioxidante de flavonoides y ácidos fenólicos

La capacidad de captación de radicales libres se atribuye principalmente a las altas reactividades de sustituyentes hidroxilo que participan en la reacción de la siguiente reacción de la Figura 4-1. (Heim et al., 2002, pp.572-584)

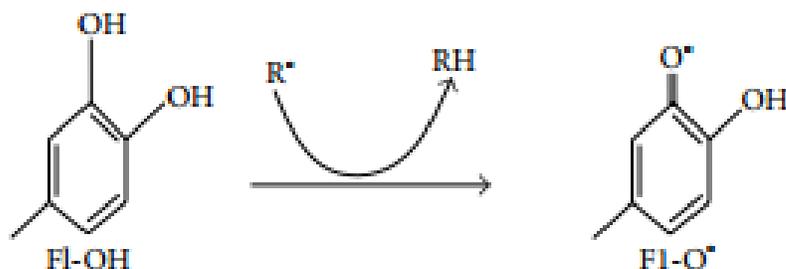


Figura 4-1: Reacción de los flavonoides con radicales libres

Fuente: (Reis, 2003)

La configuración de los grupos hidroxilo del anillo B es la más importante en la captación de ROS. Grupos hidroxilo en el anillo B donan hidrógeno y un electrón a radicales hidroxilo, peroxilo, y peroxinitrito, estabilizándolos y dando lugar a un radical flavonoide relativamente estable. (Heim et al., 2002, pp.572-584)

Los ácidos fenólicos se componen de ácidos hidroxicinámico e hidroxibenzoico. Están presentes en todas las partes del material vegetal y, a veces en forma de ésteres y glucósidos. Poseen actividad antioxidante como quelantes y captadores de radicales libres con especial incidencia sobre los radicales hidroxilo y peroxilo, aniones superóxido y peroxinitritos. Uno de los compuestos más estudiados y prometedores en el grupo hidroxibenzoico es ácido gálico, que es también el precursor de muchos taninos, mientras que el ácido cinámico es el precursor de todos los ácidos hidroxicinámicos. (Carocho & Ferreira, 2013, 15-25)

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de investigación

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

2.2 Recolección del material vegetal

La materia vegetal fue recogida en el Cantón Pallatanga, Provincia de Chimborazo, a una altitud de 2377 msnm, ubicación correspondiente a las siguientes coordenadas geográficas:

- Latitud: 2° 3' 50.232" S
- Longitud: 78° 52' 59.862" W

2.3 Equipos y Reactivos

2.3.1 Equipos

- Molino Arthur Thomas
- Estufa Memmert SNB400
- Rotavapor
- Vortex
- Balanza analítica Radwag
- Espectrofotómetro Cole Parmer S-2150

2.3.2 Reactivos

- Ácido fórmico
- Ácido clorhídrico 37°
- Metanol 99.83°
- Etanol 96°
- Metanol 98°
- Hexano
- Acetonitrilo grado HPLC

- Cloroformo
- Acetato de etilo
- Agua bidestilada

2.4 Técnicas y métodos

La metodología seguida en la investigación se nombra en la Figura 1-2, en donde se resumen los procedimientos de control de calidad, identificación cualitativa de metabolitos, análisis cuantitativo mediante espectrofotometría de fenoles y flavonoides, cuantificación de agliconas mediante HPLC y evaluación de la actividad antioxidante *in vitro*.

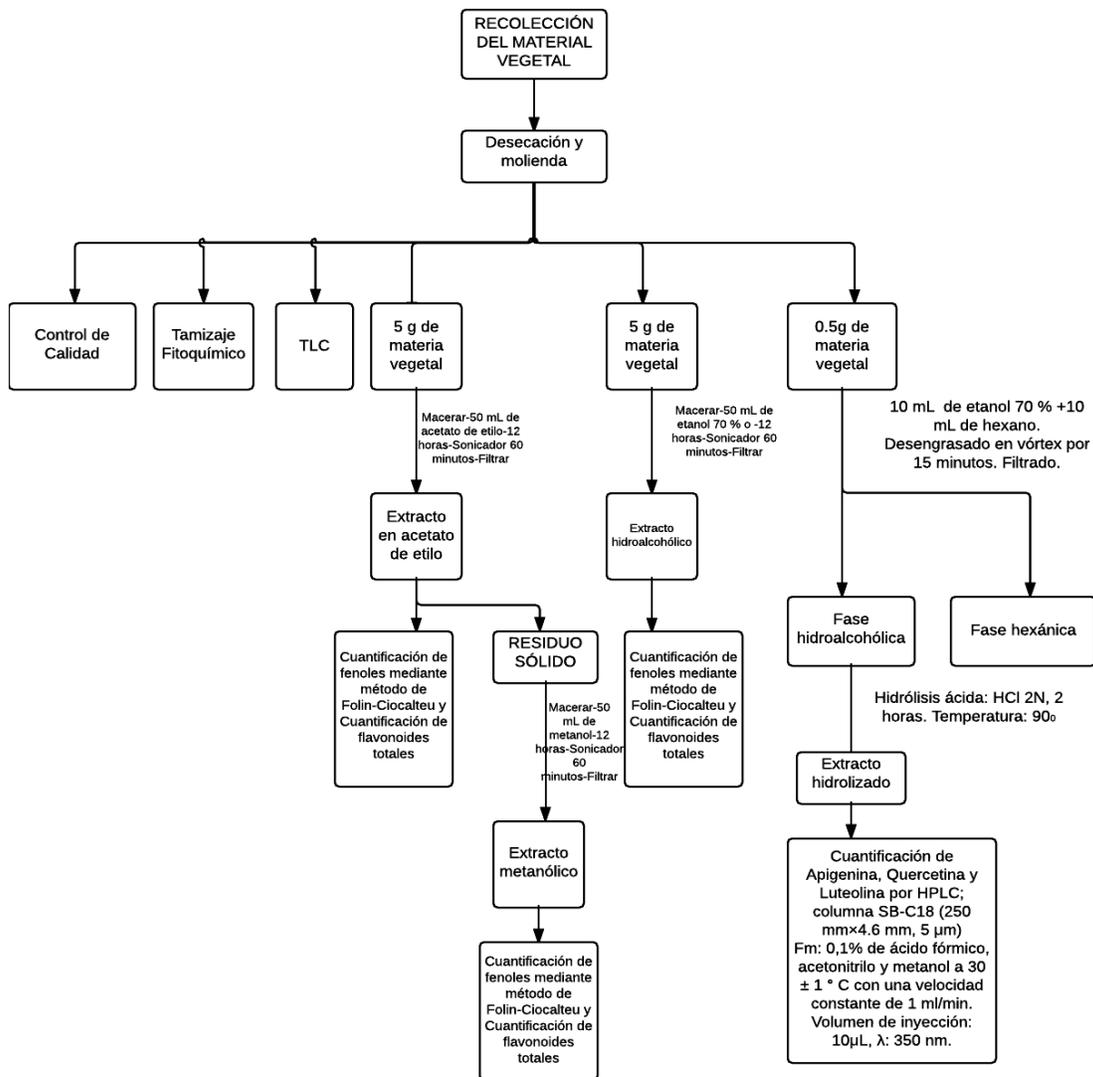


Figura 1-2: Protocolo de la investigación

Realizado por: Anahí Bonilla, 2016

2.4.1 Acondicionamiento de material vegetal

2.4.1.1 Secado

Hojas y flores fueron separadas, se lavaron y se secaron en una estufa de aire caliente Memmert a una temperatura de 40 °C.

2.4.1.2 Molienda

Después del secado, el material vegetal se molió en un molino cuchilla giratoria marca Arthur H. Thomas CO para obtener partículas de 2.0-3.0 mm.

2.4.2 Control de calidad

2.4.2.1 Determinación del contenido de humedad

Se realizó mediante método gravimétrico, en base a la pérdida en masa de la muestra tras desecación en estufa, como lo indican las Normas Ramales para drogas crudas y extractos y tinturas, 1992. La metodología se describe brevemente a continuación. Se pesaron 2 ± 0.5 mg de materia vegetal seca y se colocaron en una cápsula de porcelana tarada. Se desecó por 3 horas a 105 °C en la estufa. Transcurrido el tiempo, la cápsula se colocó en la desecadora, donde se dejó enfriar y posteriormente se pesó. El proceso se repitió, pesando cada hora hasta obtener una masa constante. (Normas Ramales para Drogas crudas y extractos y tinturas, 1992)

Cálculo

$$\%H = \frac{M2 - M1}{M2 - M} \times 100$$

%H= pérdida en peso por desecación (%)

M2= masa de la cápsula con la muestra de ensayos (g)

M1= masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g)

M= masa de la cápsula vacía (g)

100= factor matemático

2.4.2.2 Determinación de cenizas totales

Se realizó mediante determinación gravimétrica del residuo de la incineración de la muestra. Se pesó una cantidad de muestra pulverizada entre 2.0 g y 3.0 g en un crisol. La muestra fue calentada hasta ser totalmente carbonizada, posteriormente la muestra se incineró en horno mufla a una temperatura de 700-750 °C durante un tiempo no menor a 2 horas. Transcurrido el tiempo, el crisol se retiró de la mufla y se enfrió en una desecadora, se pesó. El proceso se repitió hasta alcanzar masa constante. (Normas Ramales para Drogas crudas y extractos y tinturas, 1992)

Cálculo

$$\% C = \frac{(m2 - m)}{(m1 - m)} * 100$$

Donde:

%C: porcentaje de cenizas totales

m2: masa en gramos de la cápsula con las cenizas

m1: masa en gramos de la cápsula con la muestra seca

m: masa en gramos de la cápsula vacía

100= factor matemático

2.4.2.3 Determinación de cenizas solubles en agua

Se realizó mediante determinación gravimétrica. A las cenizas obtenidas en la determinación de cenizas totales, se le añadió de 15 a 20 ml de agua, se hirvió durante 5 min. La solución se filtró a través del papel de filtro libre de cenizas. El filtro con el residuo se transfirió al crisol inicial, en donde fue carbonizado en un y luego incinerado en un horno mufla de 700-750 °C, por 2 horas. Transcurrido el tiempo, el crisol se retiró de la mufla y se enfrió en una desecadora, se pesó. El proceso se repitió hasta alcanzar masa constante. (Normas Ramales para Drogas crudas y extractos y tinturas, 1992)

Cálculo

$$Ca = \frac{(M2 - Ma)}{(M1 - M)} * 100$$

Ca = porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada.

M2 = masa del crisol con las cenizas totales (g).

Ma = masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g)

M1 = masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M = masa del crisol vacío.

100 = factor matemático.

2.4.2.5 Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

Mediante determinación gravimétrica. A las cenizas obtenidas en la determinación de cenizas totales se añadió de 2-3 ml de ácido clorhídrico al 10%, el crisol tapado con un vidrio reloj se hirvió por diez minutos. El vidrio reloj se lavó con 5 ml de agua caliente y se unió al contenido del crisol. La solución se filtró a través de un papel de filtro; se lavó el residuo con agua caliente hasta que el filtrado acidulado con ácido nítrico; sobre el filtrado se añadió una o dos gotas de solución de nitrato de plata 0.1 M, no muestre presencia de cloruros. El filtrado con el residuo se desecó de 100 a 105 °C, se transfirió al crisol inicial y se incineró en un horno mufla a una temperatura de 700-750 °C durante 2 horas. Transcurrido el tiempo, el crisol se retiró de la mufla y se enfrió en una desecadora, se pesó. El proceso se repitió hasta alcanzar masa constante. (Normas Ramales para Drogas crudas y extractos y tinturas, 1992)

Cálculo

$$B = \frac{(M2 - M)}{(M1 - M)} * 100$$

B= porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada.

M = masa del crisol con la porción de ensayos (g)

M1 = masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M2= masa del crisol con la ceniza (g)

100= factor matemático

2.4.3 Tamizaje fitoquímico

Para obtener extractos con solventes de diferente polaridad se realizaron extracciones sucesivas con éter etílico, etanol y agua como lo indica la Figura 2-2.

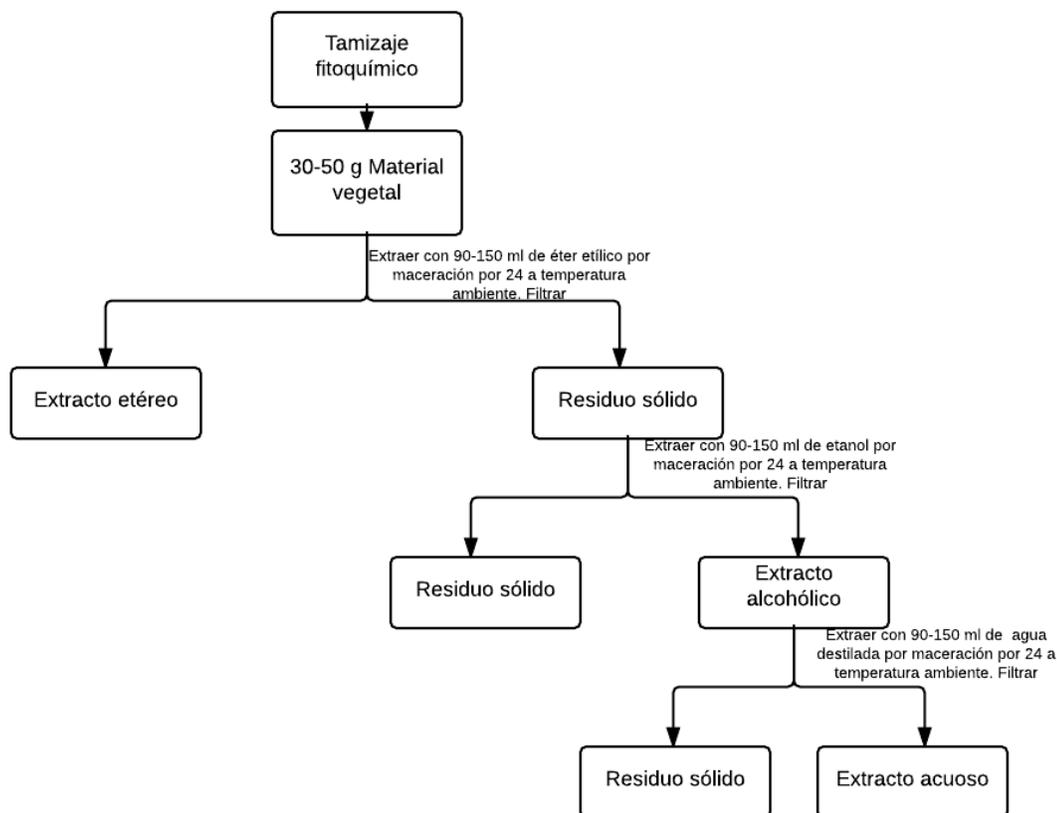


Figura 2-2: Obtención de metabolitos secundarios para realizar el tamizaje fitoquímico.

Fuente: (Normas Ramales para Drogas crudas y extractos y tinturas, 1992)

El tamizaje fitoquímico realizado a través de pruebas preliminares sencillas y rápidas permite detectar cualitativamente la presencia de determinados grupos de compuestos. Estas reacciones son selectivas para los grupos de compuestos investigados, y mediante la formación de precipitados o coloraciones nos indican la presencia o ausencia de grupos de compuestos. Las reacciones llevadas a cabo sobre cada extracto se indican en la Figura 3-2.

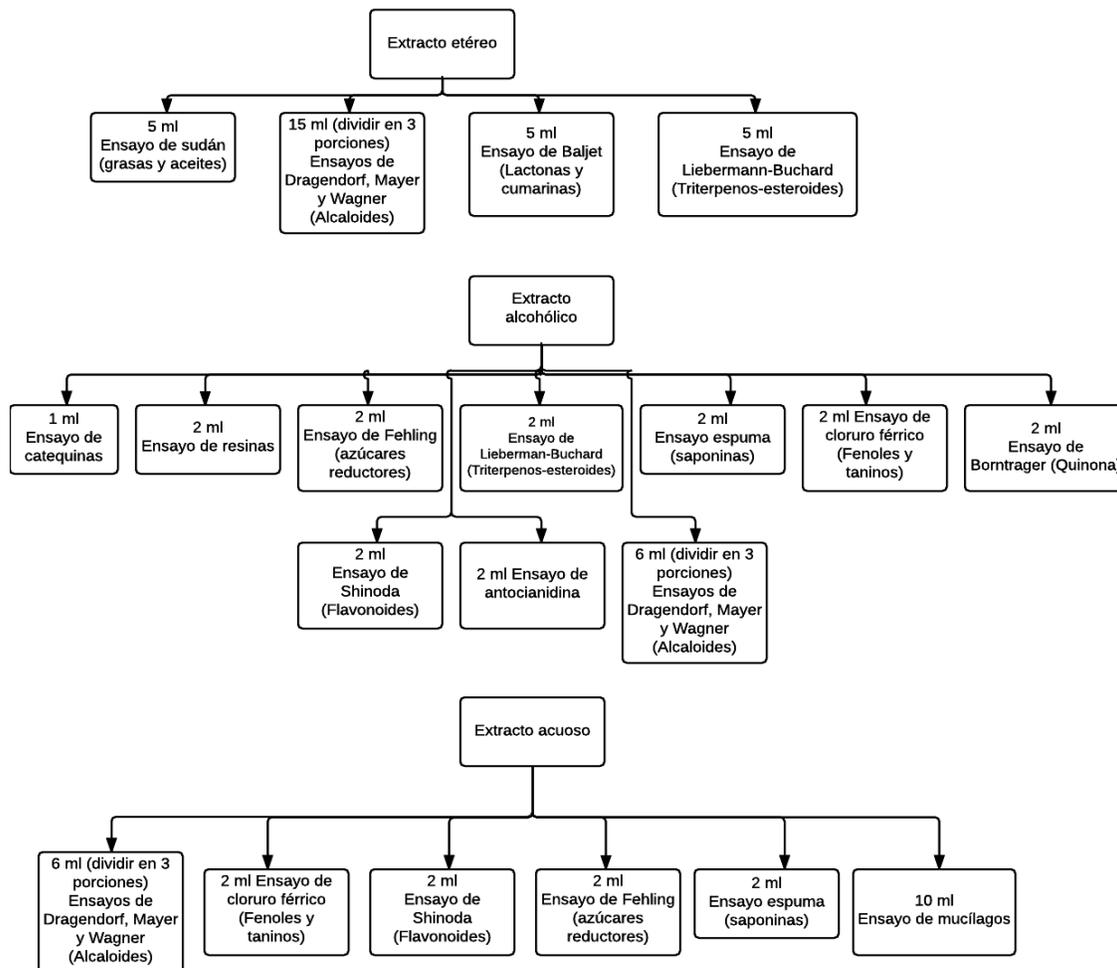


Figura 3-2: Esquema del tamizaje fitoquímico correspondiente a los extractos etéreo, acuoso y alcohólico

Fuente: (Normas Ramales para Drogas crudas y extractos y tinturas, 1992)

2.4.4 Cromatografía en capa fina

Se extrajo el material vegetal (1 g) con 10 ml de metanol por cinco minutos en un baño de agua a temperatura de 60 °C y se filtró. Al extracto obtenido se añadió igual volumen de acetato de plomo al

4 % en ácido acético al 0.5 % para precipitar clorofilas. La mitad del volumen obtenido del filtrado es hidrolizado con HCl 2N, a una temperatura de 80 °C, por dos horas, en este extracto hidrolizado se realizan tres extracciones, cada una con 20 ml acetato de etilo con el fin de extraer las agliconas hidrolizadas. Entre 20 a 30 µL de cada extracto fueron aplicados sobre la placa de Silica gel con indicador fluorescente 254nm. Se usaron las siguientes fases móviles para el extracto no hidrolizado:

- Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, agua (100:11:11:26), constante dieléctrica del sistema: 23.23 (Wagner & Bladt, 2001, pp. 230)
- Tolueno, metil isobutil cetona, acetato de etilo, agua (5: 3:1:1), constante dieléctrica del sistema: 13.93
- Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético, agua, metil isobutil cetona (6:0.5:0.5:1:4), Constante dieléctrica del sistema: 16.87
- Acetato de etilo, acetona, ácido acético, agua (6:2:1:1), Constante dieléctrica del sistema: 16.62
- Agua, ácido fórmico, metil isobutil cetona, acetato de etilo (1:1:3:5), Constante dieléctrica del sistema: 20.93

La fase móvil usada para el extracto hidrolizado fue cloroformo: metanol: agua (40:9:1).

2.4.5 Cuantificación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se realizó según el procedimiento descrito por Huang y Lean-Teik, 2012. 2 ml de la muestra o solución patrón se mezclaron con 0,5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu 20 %. Después de 5 min, se añadió 0,5 ml de solución de Na₂CO₃ saturada y 5 ml de agua bidestilada. La mezcla se hizo reaccionar durante 1 hora, después de la cual se leyó la absorbancia a 765 nm. Se preparó una curva de calibración con un estándar ácido gálico con soluciones patrón de concentraciones entre 20 y 100 mg/L. Todos los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 gramos de muestra seca. (Shao-hua & Lean-teik, 2012, pp. 122-127)

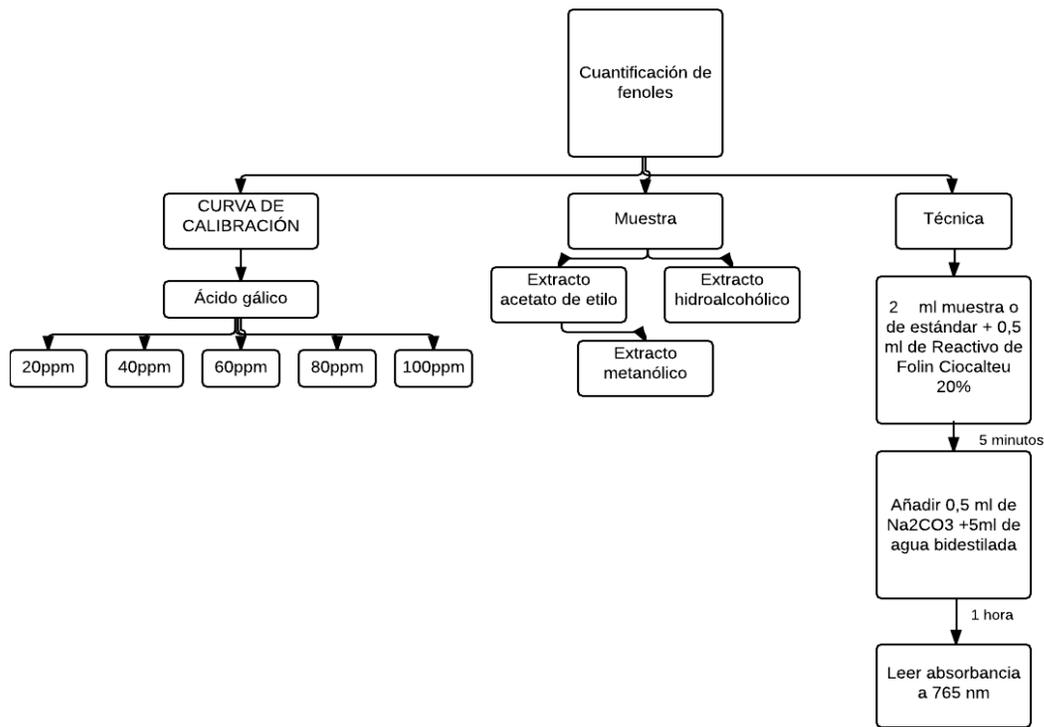


Figura 4-2: Esquema de la cuantificación de fenoles totales

Realizado por: Anahí Bonilla, 2016

4.4.6 Cuantificación de flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides totales de hojas y flores de *P. manicata* se realizó mediante el método colorimétrico con cloruro de aluminio como es descrito por (Boukhris, Simmonds, Sayadi, & Bouaziz, 2012). A 1 ml de la muestra o solución patrón se añadió 4 ml de agua bidestilada y 0.3 ml de NaNO_2 al 5 %. Después de 5 minutos se añadió 0.3 ml de AlCl_3 al 10 %, 6 minutos después se añadió 2 ml de NaOH 1 M. Se mezcló y se dejó en reposo durante 5 minutos a temperatura ambiente bajo sombra. La absorbancia de la mezcla se leyó a 510 nm.

Se preparó una curva de calibración usando como estándar quercetina con soluciones patrón de concentraciones entre 20 y 100 mg/L. Todos los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de quercetina por 100 gramos de muestra seca. (Boukhris, Simmonds, Sayadi, & Bouaziz, 2012)

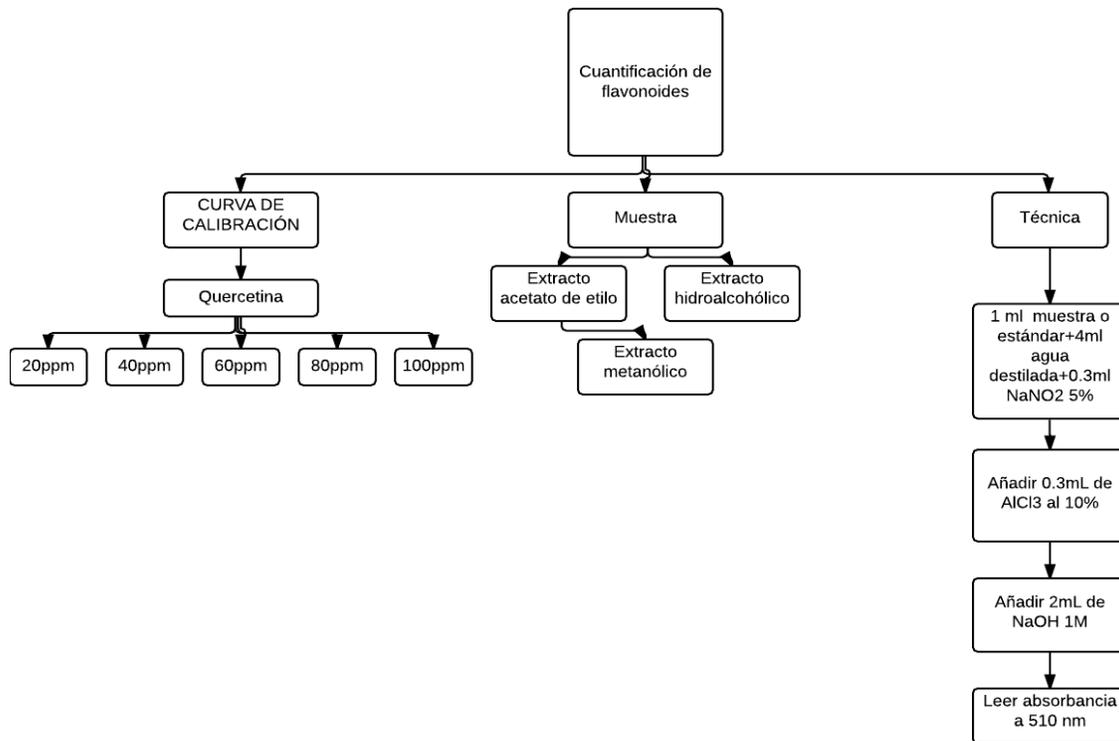


Figura 5-2: Esquema de la cuantificación de flavonoides totales

Realizado por: Anahí Bonilla, 2016

4.4.7 Análisis HPLC

La determinación cuantitativa de glucósidos flavonoides individuales en materiales vegetales es difícil, debido a su gran número. Por lo tanto, los glicósidos son normalmente hidrolizados y las agliconas resultante se identifican y cuantifican. La cuantificación de agliconas de los extractos hidroalcohólicos hidrolizados de hojas y flores mediante 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 1ml/min. (Chen, et al., 2012, pp. 1616-1622) El volumen de inyección utilizado es 10 μL, a una longitud de onda de 350 nm para el análisis cuantitativo. Todas las muestras fueron inyectadas por triplicado.

4.4.7.1 Preparación de la muestra

El material vegetal seco y triturado (0.5 g) se extrajo con 10 ml de etanol: agua 70 % (v / v) y 10 ml de hexano, mediante agitación en vortex por 15 minutos. El extracto hidroalcohólico obtenido fue hidrolizado mediante reflujo con HCl 2 N por dos horas, a una temperatura de 80 °C. El extracto hidrolizado se hizo pasar a través de un cartucho de extracción en fase sólida, previamente activado con metanol. Los compuestos adsorbidos fueron eluidos con metanol (20 ml). El volumen obtenido de eluido se ajustó a 25 ml con metanol. Todas las soluciones patrón y muestras fueron filtradas en un filtro para jeringa previo a la inyección.

4.4.7.2 Preparación de las soluciones patrón

Se usaron como estándares externos apigenina, luteolina y quercetina. A partir de una solución madre de concentración 0.5mg/ml, se elaboraron soluciones patrón con concentraciones entre 0.1 y 10 µg/ml, las cuales sirvieron para obtener una curva de calibración.

4.4.8. Capacidad captadora de radicales libres in vitro. Método DPPH*

2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH*) es un radical estable en solución y presenta una coloración púrpura que absorbe a 515 nm en metanol. Este ensayo se basa en la reacción redox entre la molécula DPPH* y el donador de electrones. Un átomo de hidrógeno proveniente del antioxidante es aceptado por parte de la molécula de DPPH*, lo que resulta en una reducción del DPPH* a DPPH₂ produciéndose un cambio de color de púrpura a amarillo con disminución concomitante en la absorbancia a 515 nm. El cambio de color se controla por espectrofotometría. (Mishra et al., 2012, 1036-1043)

El ensayo del DPPH* se basó en el método propuesto por (Brand-Williams et al., 1995, pp. 15-25). Cinco concentraciones diferentes (seleccionados con el fin de tener porcentajes de inhibición, distribuidos por igual entre 0 y 100 %,) de cada muestra metanólica de la planta y estándar fueron ensayadas. Una alícuota de 0.1 ml de muestra se mezcló con 3.9 ml DPPH* en metanol (60 µm). La mezcla fue vigorosamente mezclada y entonces la absorbancia se midió a 515 nm. El intervalo de tiempo necesario para alcanzar el final de la reacción con DPPH* se determinó para todas las muestras y el estándar, para lo cual, 100 µl muestra o compuesto puro se dejaron reaccionar con 3.9 ml de una

solución metanólica de DPPH* 60 µM. La mezcla se agitó y se transfirió a una cubeta de cuarzo. La disminución de la absorbancia a 515 nm se registró después de 3 minutos de la adición de DPPH* y a intervalos regulares de 3 minutos durante los primeros 30 minutos y, posteriormente, cada 5 min hasta que el estado de equilibrio de la reacción. El tiempo de reacción es el tiempo final en el que dos lecturas de absorbancia son constantes.

La inhibición de los radicales libres DPPH* en porcentaje (% I) se calculó de la siguiente manera:

$$\%I = \frac{A \text{ control} - A \text{ muestra}}{A \text{ control}}$$

En donde

% I = porcentaje de inhibición

A control= la absorbancia de la reacción control (que contiene todos los reactivos, excepto el extracto de prueba), y

A muestra= absorbancia del extracto de ensayo.

Los resultados se expresan como IC50, la concentración de extracto necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH* en un 50 %. El IC50 fue calculado a partir de la interpolación de una regresión lineal. Los valores más bajos de IC50 indican una mayor actividad antioxidante. Se calculó el IC50 de ácido gálico, antioxidante puro, que fue utilizado como control positivo.

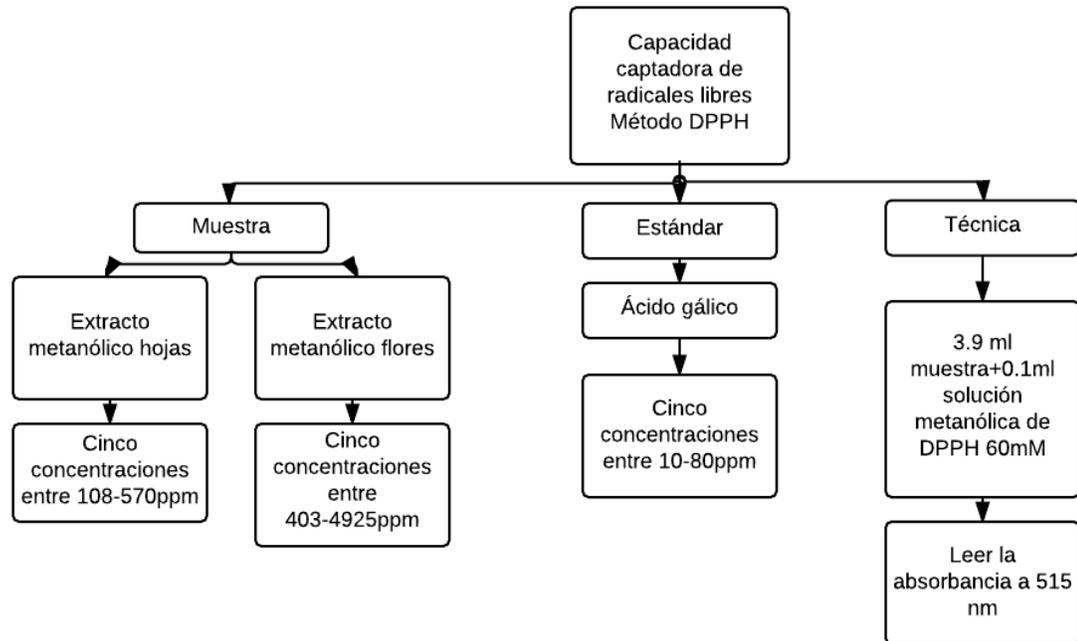


Figura 6-2: Esquema de la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* mediante DPPH*

Realizado por: Anahí Bonilla, 2016

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Control de calidad

Tabla 1-3: Resultados del control de calidad de hojas y flores de *P. manicata*

PARÁMETRO	HOJAS	FLORES	LÍMITE DE REFERENCIA	NORMATIVA REFERENCIAL
HUMEDAD	8.6114 ± 0.0122	6.2426 ± 0.012	7-14 %	USP 28
CENIZAS TOTALES	4.8752 ± 0.0054	4.8746 ± 0.0041	Hasta 12 %	USP 28
CENIZAS SOLUBLES EN AGUA	1.6129 ± 0.0124	1.9635 ± 0.0144	7 %	USP 28
CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO	0.9766 ± 0.0057	0.5867 ± 0.0086	5 %	USP 28

Realizado por: Anahí Bonilla, 2016

La determinación del contenido de humedad de una droga vegetal es importante para evitar el crecimiento microbiano, la presencia de hongos o insectos y el deterioro de principios activos, lo cual pudiera afectar al estudio. El contenido de cenizas totales implica determinar tanto la ceniza fisiológica y la ceniza de origen no fisiológico. El contenido de cenizas insolubles en ácido determina el nivel de sílice, especialmente arena presente en la droga. Los resultados obtenidos del control de calidad de la droga cruda se encuentran dentro de los rangos establecidos por la USP 28, lo cual garantiza la calidad del material vegetal.

3.2 Análisis cualitativo

3.2.1 Hojas

Se calculó el porcentaje de sólidos totales para cada uno de los extractos de diferente polaridad obtenidos. Los resultados se muestran en la Tabla 2-3.

Tabla 2-3: Porcentaje de sólidos totales de los extractos de hojas

EXTRACTO	% DE SÓLIDOS TOTALES
ETÉREO	0.7033 ± 0.568
ALCOHÓLICO	1.51 ± 0.173
ACUOSO	0.7 ± 0.052

Realizado por: Anahí Bonilla, 2016

Los resultados obtenidos en el tamizaje se muestran en la Tabla 3-3.

Tabla 3-3: Resultados del tamizaje fitoquímico de hojas de *P. manicata*

ENSAYO/METABOLITO ENSAYADO	EXTRACTO		
	ETÉREO	ALCOHÓLICO	ACUOSO
Sudán/compuestos grasos	++		
Dragendorff/alcaloides	-	-	-
Mayer/alcaloides	-	-	-
Wagner/alcaloides	-	-	-
Liebermann-Buchard/ Triperpenos y/ esteroides	++ (coloración azul)	+(coloración azul)	
Catequinas		-	
Resinas		-	
Fehling/azúcares reductores		+++	+++
Baljet/ agrupamiento lactónico	++	+++	++
Espuma/saponinas		-	+
Cloruro férrico/compuestos fenólicos o taninos		Coloración verde intensa +++	Coloración verde intensa +++
Bortrager/quinonas		-	
Shinoda/flavonoides		Coloración roja +++	Coloración amarilla +
Antocianidina/antocianidinas		+++	
Mucílagos			-
Glicósidos cianogenéticos		+	

Realizado por: Anahí Bonilla, 2016

3.2.2 Flores

Se calculó el porcentaje de sólidos totales para cada uno de los extractos de diferente polaridad obtenidos. Los resultados se muestran en la Tabla 4-3

Tabla 4-3: Porcentaje de sólidos totales de los extractos de flores

EXTRACTO	% DE SÓLIDOS TOTALES
ETÉREO	0.33 ± 0.046
ALCOHÓLICO	1.697 ± 0.089
ACUOSO	1.15 ± 0.078

Realizado por: Anahí Bonilla, 2016

Los resultados obtenidos en el tamizaje se muestran en la Tabla 5-3.

Tabla 5-3: Resultados del tamizaje fitoquímico de flores de *P. manicata*

ENSAYO	EXTRACTO		
	ETÉREO	ALCOHÓLICO	ACUOSO
Sudán/compuestos grasos	++		
Dragendorff/alcaloides	-	-	-
Mayer/alcaloides	-	-	-
Wagner/alcaloides	-	-	-
Liebermann-buchard/triperpenos y/ esteroides	++ (coloración azul)	+++ (coloración azul)	
Catequinas		+++	
Resinas		+	
Fehling/azúcares reductores		++	+++
Baljet/ agrupamiento lactónico	++	+++	++
Espuma/saponinas		+++	++
Cloruro férrico/compuestos fenólicos o taninos		Coloración verde intensa +++	Coloración verde intensa +++
Borntrager/quinonas		-	
Shinoda/flavonoides		+++	+++
Antocianidina/antocianidinas		+++	
Mucílagos			-
Glicósidos cianogénicos		+	

Realizado por: Anahí Bonilla, 2016

El reactivo de Sudán al ser de naturaleza lipófila identifica compuestos grasos. La coloración roja obtenida en la prueba de Sudán para los extractos etéreos de hojas y flores de *P. manicata* se interpreta como un resultado positivo. Se ha reportado la presencia de los ácidos grasos linoleico y linolénico en *P. foetida*, una especie de género *Passiflora*. (Hasan et al., 1980, pp.204-205) Sin embargo, no existen estudios previos acerca de la presencia de ácidos grasos en *P. manicata*.

El resultado para los pruebas de Dragendorff, Mayer y Wagner fue negativo, lo que indica ausencia de alcaloides en los extractos etéreos, alcohólicos y acuosos de hojas y flores de *P. manicata*. Varias especies del género *Passiflora* han reportado la presencia de alcaloides, una de ellas es *P. incarnata*, en la cual se ha encontrado la alcaloides indólicos como harmano, harmina (Lutomski, 1960, pp. 209-219), harmalina y harmalol. (Lutomski & Malek. 1975, pp. 381-384) .Contrario a esto, en un estudio de Santos y colaboradores los alcaloides harmano, harmina, harmalina, harmol y harmalol no pudieron ser detectados en el extracto metanólico de hojas de *P. actinia*. (Dos santos & Monteiro, 2006, pp. 565-573) Según estos datos, se puede decir que la presencia de alcaloides no es común en las diferentes especies vegetales de este género. Sin embargo, al tratarse de un análisis cualitativo el resultado negativo puede deberse a la presencia de sustancias extrañas que interfirieran en la reacción, o a una concentración en el orden de trazas de alcaloides.

La prueba de Baljet confirma la presencia de estructuras con un grupo funcional lactona en los extractos etéreos, alcohólicos y acuosos de hojas y flores de *P. manicata*. Se reporta la presencia de alfa lactonas en *P. edulis*. (Nitz, et al., 1990)

El resultado positivo para la prueba de Liebermann Burchard indica la presencia de triterpenos y esteroides. Wang y colaboradores, en el año 2003 demostraron la presencia de triterpenoides del cicloartano en *P. edulis*. (Wang et al., 2013, pp. 812-817) La presencia de dichos compuestos tiene relevancia ya que en dicho estudio se demostró la actividad antidepresiva de dichos compuestos.

La presencia de fenoles queda confirmada, según la prueba del cloruro férrico realizada a los extractos alcohólico y acuoso de hojas y flores de *P. manicata*. Se encuentran varios tipos de compuestos fenólicos reportados en *P. edulis*, como 4-Hydroxy-beta-ionol, 4-oxo-beta-ionol. (Dhawan et al., 2004, pp.1-23)

El resultado positivo para la prueba de Shinoda indica la presencia de flavonoides, resultado que coincide con la información bibliográfica disponible acerca de *P. manicata*, en donde además se especifica como principales flavonoides presentes a isovitexina, vitexina e isoorientina. (Da Silva, et al., 2013, pp. 45-54).

La prueba de Fehling confirmó la presencia de azúcares. Los principales flavonoides presentes en esta especie son glicósidos de la luteolina y apigenina (33). En otras especies del género *Passiflora*, se reporta presencia de glicósidos, como en *P. edulis*. (Dhawan et al., 2004, pp.1-23)

Según los resultados de este tamizaje fitoquímico, quinonas y mucílagos no están presentes en los extractos analizados de *P. manicata*.

3.3 Cromatografía en capa fina (TLC)

3.1.1 Extracto no hidrolizado

La fase móvil con la que se obtuvo una mejor resolución fue: acetato de etilo, ácido acético, ácido fórmico, agua (100:11:11:26). Se reveló al UV lejano.

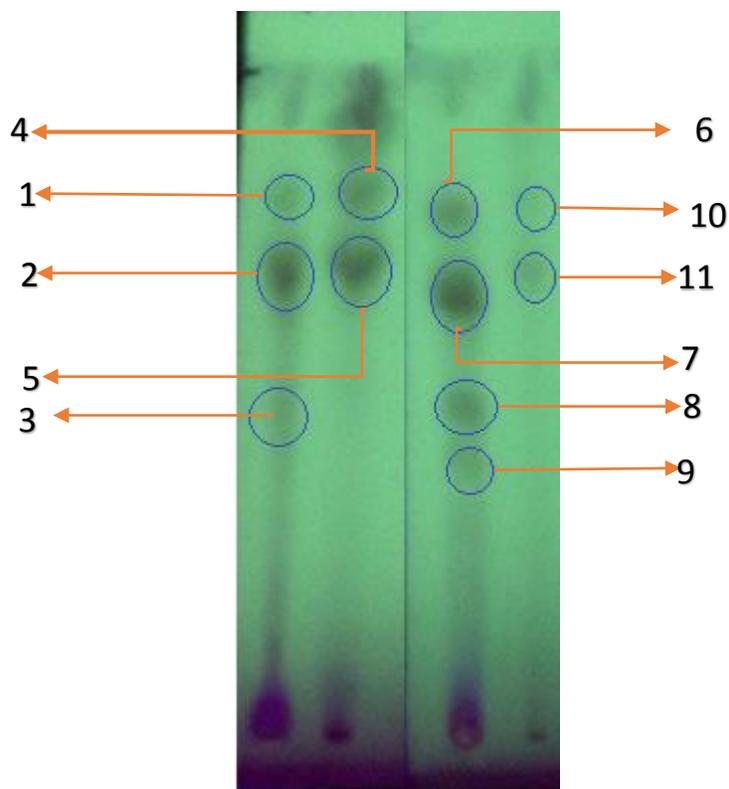


Figura 1-3: Cromatografía en capa fina de hojas y flores de *P. manicata*

Realizado por: Anahí Bonilla, 2016

Mediante CCF del extracto metanólico de flores fueron separados tres compuestos, con los siguientes Rf: 0.73, 0.65 y 0.45. Del extracto hidrolizado de flores se separaron dos compuestos, cuyos Rf fueron: 0.73 y 0.65. Del extracto metanólico de hojas se separaron tres compuestos, sus Rf son: 0.74, 0.62, 0.48 y 0.38; del extracto hidrolizado de hojas se separaron dos compuestos con Rf de 0.76 y 0.64.

Tabla 6-3: Posibles compuestos identificados mediante TLC de *P. manicata*

EXTRACTO	COMPUESTO	Rf	POSIBLE COMPUESTO IDENTIFICADO
FLORES NO HIDROLIZADO	1	0.73	-
	2	0.65	Vitexina
	3	0.45	vitexina-2''-O-ramnósido, isovitexina-2''-O-ramnósido
FLORES HIDROLIZADO	4	0.73	-
	5	0.65	Vitexina
HOJAS NO HIDROLIZADO	6	0.74	-
	7	0.62	Vitexina
	8	0.48	Isoorientina
	9	0.38	vitexina-2''-O-ramnósido, isovitexina-2''-O-ramnósido
HOJAS HIDROLIZADO	10	0.76	-
	11	0.64	Vitexina

Realizado por: Anahí Bonilla, 2015

Mediante TLC del extracto metanólico de flores fueron separados tres compuestos, con los siguientes Rf: 0.73, 0.65 y 0.45. Del extracto hidrolizado de flores se separaron dos compuestos, cuyos Rf fueron: 0.73 y 0.65. Del extracto metanólico de hojas se separaron tres compuestos, sus Rf son: 0.74, 0.62, 0.48 y 0.38; del extracto hidrolizado de hojas se separaron dos compuestos con Rf de 0.76 y 0.64. Según datos bibliográficos reportados por (Wagner y Bladt, 1996) los estándares puros de vitexina, orientina y compuestos relacionados presentan los siguientes Rf indicados en la Tabla 7-3

Tabla 7-3: Posibles compuestos identificados mediante TLC de *P. manicata*

COMPUESTO	Rf
Orientina	0.57
Isoorientina	0.46
Vitexina-2''-O-glucósido	0.28
Vitexina-2''-O-ramnósido	0.41
Isovitexina-2''-O-ramnósido	0.41
Isovitexina	0.54
Vitexina	0.62

Fuente: (Wagner & Bladt, 2001)

Realizado por: Anahí Bonilla, 2015

Según estos datos, los compuestos separados en el extracto metanólico de flores corresponderían a vitexina y vitexina-2''-O-ramnósido o vitexina -2''-O-glucósido. El compuesto con Rf 0.65 separado en el extracto hidrolizado de flores correspondería a vitexina. Los compuestos separados en el extracto metanólico de flores corresponderían a vitexina, isoorientina y vitexina-2''-O-ramnósido o isovitexina-2''-O-ramnósido. El compuesto con Rf 0.64, separado en el extracto hidrolizado de flores, correspondería a vitexina. Es destacable la presencia de vitexina tanto en los extractos no hidrolizados como en los hidrolizados. Contrario a esto, los posibles compuestos: vitexina-2''-O-ramnósido e isovitexina-2''-O-ramnósido, están presentes en los extractos no hidrolizados, pero dichos compuestos no fueron identificados en los extractos hidrolizados, lo que indicaría que son estos los compuestos que fueron hidrolizados.

3.1.2 Extracto hidrolizado

Se realizó una TLC para los extractos hidrolizados. Con la fase móvil: Cloroformo, metanol, agua (40:9:1). Se reveló al UV lejano. Se usó como estándares las agliconas: apigenina, luteolina, debido a que se esperaba su presencia tras el proceso de hidrólisis, al ser los glicósidos identificados, derivados de dichas agliconas.

- ESTÁNDARES

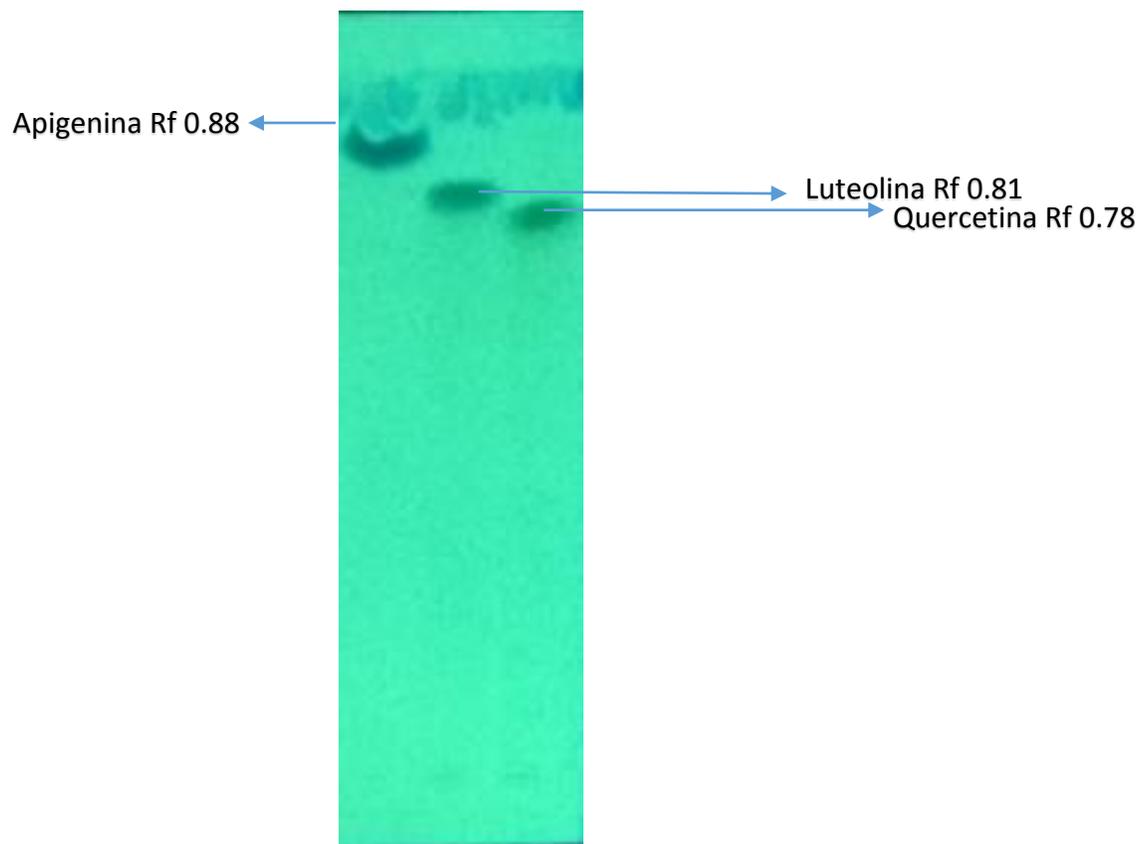


Figura 2-3: Cromatografía en capa fina de estándares apigenina, luteolina y quercetina

Realizado por: Anahí Bonilla, 2016

- MUESTRAS

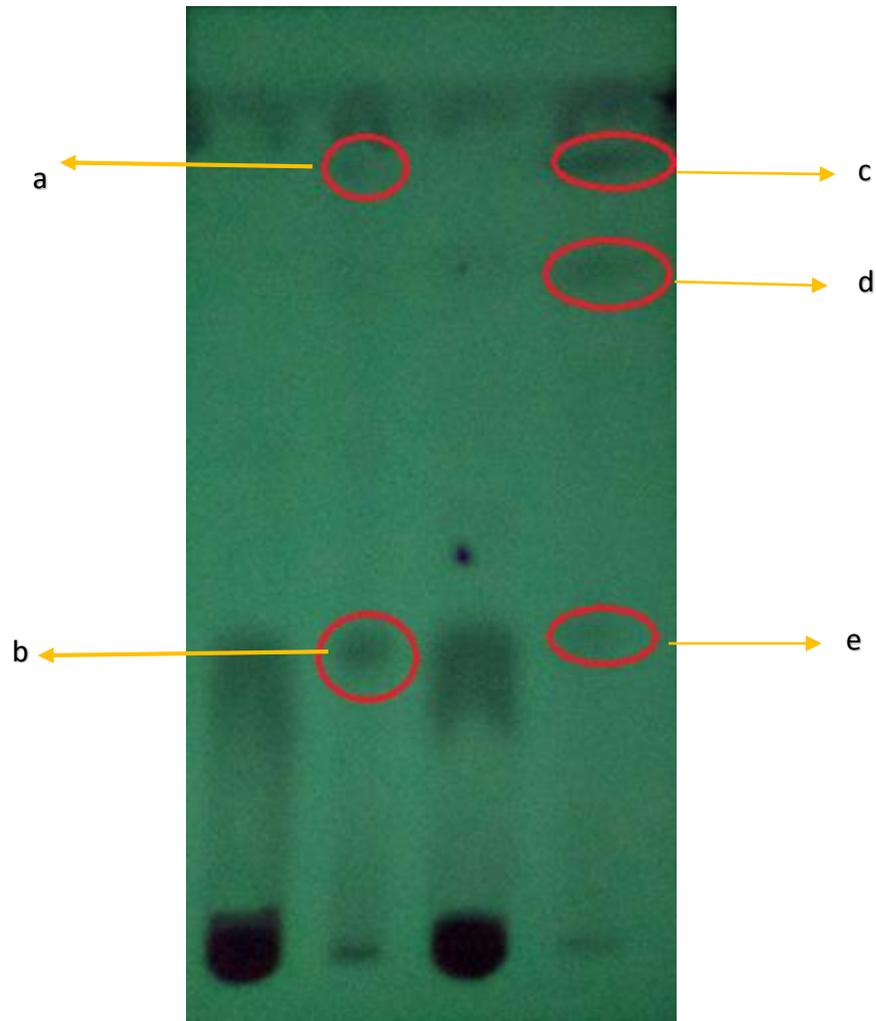


Figura 3-3: Cromatografía en capa fina de los extractos hidrolizados de hojas y flores de *P. manicata*

Realizado por: Anahí Bonilla, 2016

Mediante TLC del extracto hidrolizado de flores fueron separados dos compuestos con Rf de: 0.9 y 0.36. Del extracto hidrolizado de hojas fueron separados tres compuestos cuyos Rf son: 0.9, 0.76 y 0.36. Al comparar entre los Rf de las bandas de los extractos y estándares, se podría relacionar el compuesto con Rf 0.9, presente tanto en hojas como en flores, con la apigenina. Al identificar esta aglicona se puede confirmar que el proceso de hidrólisis se dio en vitexina-2''-O-ramnósido e isovitexina-2''-O-ramnósido, al ser éstos o-glicósidos hidrolizables derivados de la apigenina.

Tabla 8-3: Posibles compuestos identificados en los extractos hidrolizados de *P. manicata* mediante TLC

EXTRACTO	COMPUESTO	Rf	POSIBLECOMPUESTO IDENTIFICADO
Extracto hidrolizado flores	a	0.9	Apigenina
	b	0.36	
Extracto hidrolizado hojas	c	0.9	Apigenina
	d	0.76	
	e	0.36	

Realizado por: Anahí Bonilla, 2016

3.4 Cuantificación de Fenoles Método de Folin-Ciocalteu

Se cuantificó los fenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu, para lo cual fue elaborada una curva de calibración del estándar (ácido gálico) cuya ecuación de la recta es $y=0.00062x+0.061$, cuyo coeficiente de correlación $R^2 = 0,9992$.

Para la cuantificación fueron realizadas diluciones de los extractos, con el fin de que la absorbancia obtenida se encuentre dentro de la curva de calibración. Las interpolaciones en la curva de calibración para las diluciones se encuentran representadas en el ANEXO H. En la Tabla 9-3 se reportan los resultados expresados en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de planta y en porcentaje.

Tabla 9-3: Resultados de la cuantificación de fenoles mediante el método de Folin-Cicalteau

Extracto	HOJAS		FLORES	
	mg equivalentes de ácido gálico/100 g planta	Porcentaje	mg equivalentes de ácido gálico/100 g planta	Porcentaje
Acetato de etilo	5053.7634 ± 492.75	5.0538 ± 0.4928	956.9892 ± 81.181	0.957 ± 0.0812
Metanol	9892.4731 ± 492.75	9.8925 ± 0.4928	1247.3118 ± 93.121	1.2471 ± 0.0931
Hidroalcohólico (Etanol 70°)	13870.9677 ± 645.1612	13.8909 ± 0.6452	5913.978598 ± 985.5	5.914 ± 0.9855

Realizado por: Anahí Bonilla, 2016

El contenido de fenoles totales varía con la parte de la planta analizada y el solvente utilizado para la extracción. El contenido fenólico para las hojas y los flores extraídos varió desde 5.0538 a 13.8909 g GAE / 100 g y 0.957 a 5.914 g GAE / 100 g, respectivamente.

Entre los tres extractos, el extracto hidroalcohólico presentó mayor contenido fenólico tanto en hojas como en flores, seguido por el extracto metanólico. Es importante destacar, que al comparar el contenido fenólico en hojas y en flores, en todos los extractos, el contenido fenólico es mayor en hojas.

No existen datos bibliográficos del contenido de fenoles totales en *Passiflora manicata*. Ramaiya, Bujang & Zakaria, 2015 reportan un $2.37 \% \pm 0.11$ de fenoles totales en el extracto metanólico de hojas de *P. edulis* y $2.17 \% \pm 0.43$ para el extracto metanólico de hojas de *P. quadrangularis*. De acuerdo con esto, el contenido de fenoles sería mayor en *P. manicata*. Además, en dicho resultado se cuantifica fenoles totales en extractos en acetona y éter de petróleo, presentando mayor contenido fenólico el extracto metanólico. (Ramaiya, 2014, pp. 1-8)

Rudnicki et al. (2007), cuantificaron fenoles totales en los extractos hidroalcohólicos de dos especies del género *Passiflora*, el extracto de *P. alata* presentó mayor contenido fenólico ($171 \pm 1.6 \mu\text{g}/\text{mg}$ extracto) que el extracto hidroalcohólico de *P. edulis* ($92.5 \pm 2.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ extracto). (Rudnicki, 2005, pp. 719-724)

3.5 Cuantificación de flavonoides totales

Se cuantificó los flavonoides totales mediante un método espectrofotométrico con cloruro de aluminio, para lo cual fue elaborada una curva de calibración del estándar (quercetina) cuya ecuación de la recta fue $y=0.0012x+0.0218$, y el coeficiente de correlación $R^2 = 0,9991$.

Para la cuantificación fueron realizadas diluciones de los extractos, con el fin de que la absorbancia obtenida se encuentre dentro de la curva de calibración. Las interpolaciones de las absorbancias obtenidas para las diluciones se encuentran representada en ANEXO I. En la Tabla 10-3 se reportan los resultados expresados en mg equivalentes de quercetina por gramo de planta y en porcentaje.

Tabla 10-3: Resultados de la cuantificación de flavonoides totales

Extracto	HOJAS		FLORES	
	mg equivalentes de quercetina/100g planta	Porcentaje	mg equivalentes de quercetina/100g planta	Porcentaje
Acetato de etilo	285.7971 ± 21.8835	0.2858 ± 0.0219	61.7971 ± 4.0163	0.0618 ± 0.004
Metanol	5234.7826 ± 230.0653	5.2348 ± 0.2301	716.5217 ± 60.2452	0.7165 ± 0.0602
Etanol 70°	5310.1487 ± 100.4087	5.3101 ± 0.1004	1493.3333 ± 43.7672	1.4933 ± 0.0438

Realizado por: Anahí Bonilla, 2016

No existen datos bibliográficos del contenido de flavonoides totales en *Passiflora manicata* mediante este método.

Entre los tres extractos, el extracto hidroalcohólico presentó mayor contenido de flavonoides tanto en hojas como en flores, seguido por el extracto metanólico. Al igual que los resultados obtenidos para fenoles, el contenido de flavonoides es mayor en todos los extractos de hojas.

Jiang et al. (2015), evaluaron cinco extractos de *Passiflora wilsonii*, con los solventes: metanol, etanol-agua, (70:30, v/v), acetona, acetato de etilo y agua; concluyendo que el extracto hidroalcohólico presenta mayor contenido de flavonoides totales (Jiang et al., 2015, pp. 139-145) lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio, en donde, el extracto hidroalcohólico presentó un mayor contenido de flavonoides totales.

Jiang et al. (2015) cuantificó 37.6 ± 1.2 por gramo en el extracto hidroalcohólico 70 % de *Passiflora wilsonii*. El extracto hidroalcohólico de hojas de *P. manicata* presentó 53.1014 ± 1.0041 mg equivalentes de quercetina por gramo de planta, valor superior al reportado para *P. wilsonii*.

La importancia de la presencia de fenoles y flavonoides radica en su actividad como antioxidantes. Estudios recientes han demostrado que muchos constituyentes polifenólicos derivados de plantas son antioxidantes más eficaces *in vitro* que las vitaminas E o C, y por tanto, podrían contribuir significativamente a los efectos de protección *in vivo*. (Rice-evans et al., 1997, pp. 152-159)

3.6 Análisis HPLC

Con el fin de seleccionar las condiciones de HPLC apropiados para analizar las muestras fueron consultadas varias fuentes bibliográficas, siendo seleccionado el método propuesto por (Chen, et al 2012), el cual es mínimamente modificado para el presente estudio; T= 35±1 °C con un flujo de 1. ml/min. Tres agliconas (apigenina, luteolina y quercetina) fueron usadas como estándares y sus tiempos de retención fueron: apigenina $t_R = 16.1$, luteolina $t_R = 9.783$ y quercetina $t_R = 8.85$. Se prepararon curvas de calibración para cada uno de los estándares, en la Tabla 11-3 se muestran las ecuaciones de la recta y su respectivo coeficiente de relación.

Tabla 11-3: Ecuación de la recta y r^2 para estándares en la cuantificación mediante HPLC

ESTÁNDAR	ECUACIÓN DE LA RECTA	R ²
Quercetina	$y = 6.1754x + 2.5719$	0.9977
Luteolina	$y = 27.635x + 3.1617$	0.9989
Apigenina	$y = 10.233x + 3.5717$	0.9977

Realizado por: Anahí Bonilla, 2016

Los cromatogramas de estándares y muestra de ensayo se muestran en la Figura 4.3

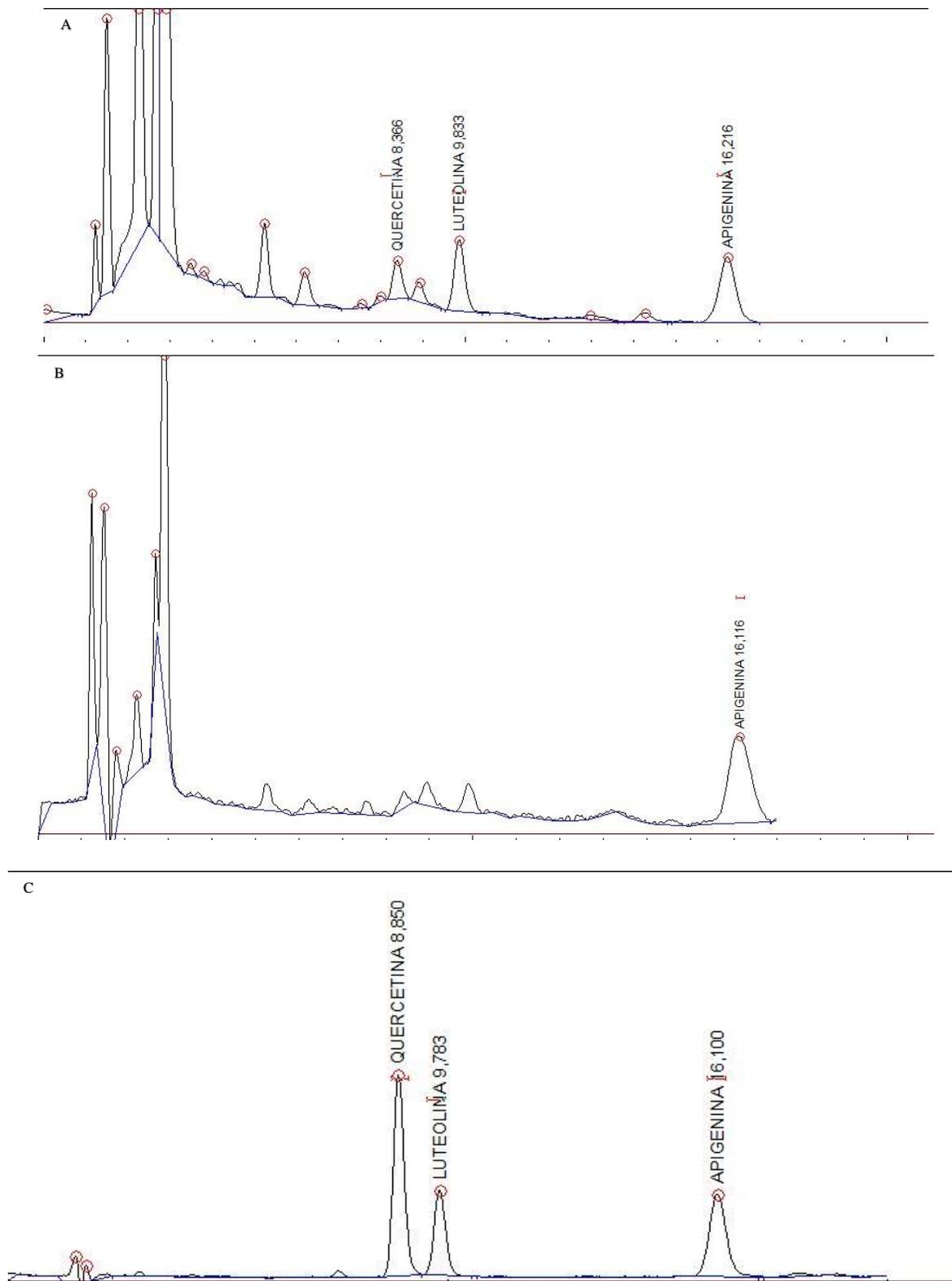


Figura 4-3: Cromatogramas HPLC (A) Muestra extracto hidrolizado hojas, (B) Muestra extracto hidrolizado flores, (C) Estándares de apigenina, quercetina y luteolina.
Realizado por: Anahí Bonilla, 2016

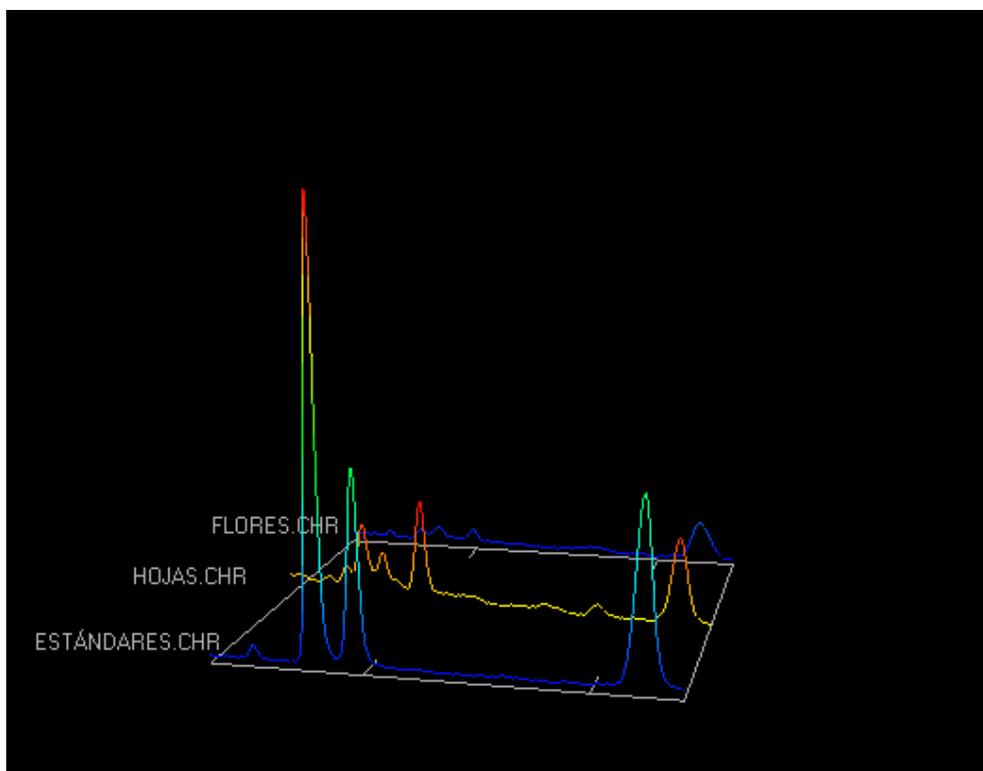


Figura 5-3. Cromatograma 3D, en donde se representa los estándares y las muestras hidrolizadas de hojas y flores de *P. manicata*
Realizado por: Anahí Bonilla, 2015

Los picos obtenidos para el extracto de hojas coinciden con los tiempos de retención de los tres estándares, confirmando en el mismo la presencia de los tres estándares. Mientras que en el extracto de flores, solamente apigenina pudo ser identificada. Los resultados de la cuantificación se muestran en la Tabla 12-3.

Tabla 12-3: Resultados de la cuantificación de agliconas mediante HPLC

COMPUESTO	HOJAS		FLORES	
	mg /100 g planta	Porcentaje	mg /100 g planta	Porcentaje
QUERCETINA	4.7328 ± 0.3599	0.0047 ± 0.0004	-	-
LUTEOLINA	2.8441 ± 0.08	0.002 ± 8.0E-05	-	-
APIGENINA	11.4617 ± 0.2433	0.0115 ± 0.0002	6.0096 ± 0.4292	0.006 ± 0.0004

Realizado por: Anahí Bonilla, 2016

Estudios previos sobre la composición de flavonoides de las hojas de *P. manicata* reportaron la presencia los C-glicosil flavonoides isovitexina, vitexina, orientina y isoorientina. (Abourashed et al., 2002). Adicionalmente, (Zucolotto et al., 2011) demostraron la presencia de un o-glicosil flavonoide, la vitexina-2"-O-ramnósido, cuyos enlaces glicosídicos son inestables y por lo tanto es un glicósido fácilmente hidrolizable. En contraste, los C-glicosil flavonoides tienden a ser estables frente a la hidrólisis química o enzimática. (Buqui et al., 2015, pp. 212-218) En base a esto, la apigenina identificada en hojas y flores mediante HPLC, provendría de la hidrólisis de la vitexina-2"-O-ramnósido, compuesto identificado también en la cromatografía en capa fina. En el extracto de hojas, además se identificó la presencia de luteolina y quercetina, agliconas que provendrían de derivados glicosilados de las mismas.

Es importante la cuantificación de agliconas en el extracto hidrolizado, debido a que los flavonoides presentan una mejor biodisponibilidad cuando la parte glicosídica ha sido removida. (Jing-Yuan, 2013, pp. 684-689). Es destacable la presencia de apigenina en los extractos hidrolizados, ya que estudios in vivo revelaron que la apigenina presenta propiedades ansiolíticos y sedantes (Salgueiro et al., 1997) y actividad antidepresiva. (Nakazawa et al., 2003, pp. 474-480)

3.7 Capacidad captadora de radicales libres

La capacidad antioxidante de *P. manicata* se midió por el método DPPH*. El tiempo de reacción fue calculado, siendo 60 minutos el tiempo necesario para que la medición de la absorbancia sea estable.

Los resultados se expresaron como IC50, obteniéndose para el extracto de hojas un IC50 de $331.9234 \pm 3.097 \mu\text{g/ml}$, mientras que para flores el IC50 calculado fue de $3338.6306 \pm 4.3089 \mu\text{g/ml}$. Con el fin de evaluar el potencial antioxidante de *P. manicata*, ácido gálico fue usado como referencia y presentó un IC50 de $43.7894 \pm 0.1567 \mu\text{g/ml}$ en el ensayo de DPPH*.

Tabla 13-3: IC50 calculado para hojas, flores y el estándar de ácido gálico.

	IC50
HOJAS	$331.9234 \pm 3.097 \mu\text{g/ml}$
FLORES	$3338.6306 \pm 4.3089 \mu\text{g/ml}$
ÁCIDO GÁLICO	$43.7894 \pm 0.1567 \mu\text{g/ml}$

Realizado por: Anahí Bonilla, 2015

La mejor capacidad antioxidante demostrada para el ácido gálico puede estar relacionada a su estructura. En el caso de ácidos fenólicos, la capacidad antioxidante depende del número de grupos hidroxilo presentes en la estructura, monofenoles poseen menor capacidad antioxidante que polifenoles. (Shahidi, 1997) El ácido gálico es un trifenol, posee tres grupos hidroxilo pueden actuar como donadores de electrones. Yen et al. describen un IC50 de 54.5 mM para glicósidos de luteolina, mientras que el IC50 para glicósidos de apigenina es >500 mM. Luteolina posee dos grupos hidroxilo en el anillo B de su estructura, mientras que apigenina posee tan solo un grupo hidroxilo en el anillo B. Se puede evidenciar que un grupo hidroxilo adicional en el anillo B otorga mejor capacidad antioxidante a la luteolina. (Agati, et al., 2012)

En la parte fitoquímica de esta investigación se evidenció mediante HPLC que apigenina es más abundante que luteolina en el extracto hidroalcohólico de hojas, lo cual justificaría la menor capacidad captadora de radicales libres presentada para el extracto de hojas en comparación al ácido gálico.

De igual forma, el extracto de flores presentaría una menor capacidad captadora de radicales libres debido a la estructura de los flavonoides presentes en dicho extracto. Apigenina y sus derivados glicosilados (los cuales presentan actividad antioxidante menor que luteolina) fueron identificados en esta investigación.

En estudios anteriores se ha evaluado el potencial antioxidante de otras especies del género *Passiflora*, (Wasicky et al., 2015) reportaron para hojas de *P. alata* un IC50 de 1061.2 ± 8.5 µg/ml, mientras que el antioxidante puro, rutina, presentó un IC50 de 18.3 ± 0.9 µg/ml. De acuerdo a esto, el extracto de hojas de *P. manicata*, presenta mejor capacidad antioxidante que el extracto de hojas de *P. alata*. Sin embargo, los antioxidantes puros presentan valores de IC50 menores, por tanto, poseen mayor capacidad antioxidante.

Cabe mencionar que las hojas presentaron un IC50 menor que las flores, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la cuantificación de fenoles totales y flavonoides, en donde, las flores presentaron un menor de fenoles y flavonoides. La menor capacidad antioxidante de flores puede ser justificada por el bajo contenido de fenoles y flavonoides, (Rice –Evans, et al., 1997) mencionan a los constituyentes fenólicos derivados de plantas como potentes agentes antioxidantes.

CONCLUSIONES

1. El tamizaje fitoquímico de hojas de *Passiflora manicata* demostró la presencia de varios metabolitos secundarios de tipo lactonónico, triterpenico, compuestos grasos, azúcares reductores, compuestos fenólicos y flavonoides; mientras que en flores se demostró la presencia de compuestos de tipo lactónico, triterpénico, resinas, azúcares reductores, fenoles y flavonoides.
2. Mediante cromatografía en capa fina se identificó presuntivamente en hojas vitexina, isoorientina, vitexina-2-o-ramnósido y isovitexina-2-o-ramnósido; mientras vitexina, vitexina-2-o-ramnósido. En los extractos hidrolizados se identificó apigenina.
3. Mediante métodos espectrofotométricos se cuantificó el contenido total de flavonoides y fenoles de los extractos en acetato de etilo, metanol y alcohol 70 %, siendo el extracto hidroalcohólico el que mayor contenido fenólico y de flavonoides presentó, tanto en hojas como en flores. Mediante cromatografía líquida de alta eficiencia se cuantificó 11.4615 ± 0.2433 mg/100g planta de apigenina; 2.7524 ± 0.08 mg/100g planta de luteolina y 4.7328 ± 0.3599 mg/100g planta de quercetina en hojas y 6.0096 ± 0.0043 mg/100g planta de apigenina en flores.
4. Mediante el ensayo de actividad captadora de radicales libres *in vitro* DPPH*, se calculó el IC50, siendo éste para hojas de 331.9234 ± 3.097 µg/ml y para flores de 3338.6306 ± 4.3089 µg/ml, lo cual indica una mayor capacidad antioxidante del extracto de hojas debido a su mayor contenido de flavonoides y fenoles.

RECOMENDACIONES

1. Estudiar la influencia del tiempo de recolección y zona geográfica en la composición química de la materia vegetal.
2. Profundizar los estudios farmacológicos, sobre actividades cicatrizante, antiinflamatoria y citotóxica de *Passiflora manicata*, con el fin de aprovechar su contenido de flavonoides.
3. Cuantificar mediante HPLC el contenido de flavonoides glicósidos como isovitexina, orientina, isoorientina y vitexina.
4. Promover el estudio de la actividad antioxidante de otras especies vegetales, con el uso de estándares de referencia sintéticos y siguiendo una metodología similar, con el fin de obtener resultados comparables

BIBLIOGRAFÍA

1. **ABOURASHED, Ehab, VANDERPLANK, Jhon. & KHAN, Ikhlas.** “High-Speed Extraction and HPLC Fingerprinting of Medicinal Plants – I Application to Passiflora Flavonoids”. *Pharmaceutical Biology*. vol.40, nº2 (2002), pp. 81-89
2. **AGATI, G.** “Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance”. *Plant Science*. nº. 167 (2012), pp. 67-76
3. **AGOSTINI-COSTA Tania, et al.** “Chromatography and Its Applications”. *Intech*, vol. 4 (2012), p. 131.
4. **AKERELE, Olayiwola.** *Foro mundial de la salud* [en línea]. Organización Mundial de la Salud, 1993. [Consulta: 6 septiembre 2015]. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/47707/1/WHF_1993_14_4_p390-395_spa.pdf?ua=1
5. **BANO, Sameena.** *Chemistry of natural products: Terpenoids*. [en línea]. New Delhi: 2007. [Consulta: 20 Septiembre 2015]. Disponible en: <http://nsdl.niscair.res.in/jspui/bitstream/123456789/700/1/revised%20terpenoids.pdf>
6. **BEGNER, Paul.** *Passionflower* [en línea]. *Medical Herbalism*. [Consulta: 26 agosto 2015]. Disponible en: http://medherb.com/Materia_Medica/Passiflora_-_Passionflower_.htm
7. **BOUKHRIS, M.; SAYAD, S. & BOUAZIZ M.** “Chemical Composition and Biological Activities of Polar Extracts and Essential Oil of Rose-scented Geranium, *Pelargonium graveolens*“. *Phytotherapy Research*, vol. 8, nº 27 (2013), pp.1206-1213

8. **BOUAYED, J. & BOHN, T.** “Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 3, n°4 (2010), pp. 228-237
9. **BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. & BERSET C.** “Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity”. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol*, vol. 28 (1995), pp. 25-30
10. **BUQUI, G.; MERINO-SANJUÁN, M.; GOUVEA, D.; NIXDORF, S.; KIMURA, E. & DERENDORF, H.** “Characterization of intestinal absorption of C-glycoside flavonoid vicianin-2 from *Lychnophora ericoides* leaves in rats by nonlinear mixed effects modeling”. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 25, n° 3 (2015), pp. 212-218
11. **CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M., & CORKE H.** “Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional”. *Life Sciences*, vol.74, n°17 (2004), pp. 2157–2184.
12. **CAROCHO, M. & FERREIRA, I.** “A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives”. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 51 (2013), pp. 15-25.
13. **CASTELLANO, G.; TENA, J.; TORRENS, F.** “Classification of Phenolic Compounds by Chemical Structural Indicators and Its Relation to Antioxidant Properties of *Posidonia Oceanica* (L.) Delile”. *Communications in Mathematical and in Computer Chemistry*, vol. 67 (2012), pp. 231-250
14. **CHEN, Z.; et al.** Pharmacokinetic study of luteolin, apigenin, chrysoeriol and diosmetin after oral administration of Flos *Chrysanthemi* extract in rats. *Fitoterapia*, vol. 83 (2012), pp. 1616-1622
15. **CHOPRA, R.; NAYAR, S. & CHOPRA I.** *Glossary of Indian Medicinal Plants New Delhi: CSIR, 1980.*

16. **Da SILVA, M.; et al.** “*Passiflora manicata* (Juss.) aqueous leaf extract protects against reactive oxygen species and protein glycation in vitro and ex vivo models”. *Food and Chemical Toxicology*, vol.60, nº1 (2013), pp. 45-54.
17. **DHAWAN, S.; DHAWAN, K. & SHARMA A.** “*Passiflora*: a review update”. *Journal of ethnopharmacology*, vol. 94, nº1 (2004), pp.1-23.
18. **DHAWAN, K.; KUMAR, S. & SHARMA A.** “Anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus”. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 78, nº 2 (2001), pp. 165-170
19. **DHAWAN, K., KUMAR, S. & SHARMA, A.** “Comparative biological activity study on *Passiflora incarnata* and *Passiflora edulis*”. *Fitoterapia*, vol. 73, nº6 (2001), p. 698-702.
20. **DOS SANTOS & MONTEIRO RM.** “Sedative and anxiolytic effects of methanolic extract from the leaves of *Passiflora actinia*”. *Brazilian archives of biology y technology*, vol. 49, nº4 (2006), pp. 565-573
21. **ESCOBAR, L.** *Passifloraceae. Passiflora, Subgéneros: Tacsonia, Rathea, Manicata y Distephana*. Medellín-Colombia: Universidad de Antioquia Dep. Biología, 1988.
22. **EVANS, CH.** *Pharmacopoeial and related drugs of biological origin*. Elsevier, 2009 pp. 391-402
23. **HASAN, S.; AHMAD, I.; SHERWANI, M; ANSARI, A. & OSMAN, S.** “Studies on herbaceous seed oils: Fette Seifen Anstrichm”. *Lipid Science*, vol. 82, nº5 (1980), pp.204-205
24. **HASSANPOUR, S. & MAHERI-SIS, N.** “Eshratkhah B, Baghbani F. Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review”. *Int. J. Forest*: vol.1, nº1 (2011), pp. 154

25. **HEIM, K.; TAGLIAFERRO, A & BOBILYA, D.** “Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships”. *Journal of nutritional biochemistry*. vol.13, nº10 (2002), pp. 572-584
26. **HICKEY, M. & KING, C.** *100 Families of Flowering Plants Cambridge*. New York- Estados Unidos: Cambridge University Press, 1988, pp. 180
27. **JÄGER, A. & SAABY, L.** “Flavonoids and the CNS”. *Molecules*, vol.16 (2011), pp. 1471-1485
28. **JING-YUAN, L.; HE-SHUI, Y.; BING, F.; LI-PING, K.; XU, P. & HENG-QI, X.** “Selective hydrolysis of flavonoid glycosides by *Curvularia lunata*”. *Chinese Journal of Natural Medicines*, vol. 11, nº 6 (2013), pp. 684-689
29. **JIANG X, MENG Y, LIANG Y, XIAO Z.** “Evaluation of the Antioxidant and Antibacterial Activities of Various Solvent Extracts from *Passiflora wilsonii* Hemsl”. *Biotechnology*, vol.14 (2015), pp. 139-135
30. **LENNON, S.; COTTER, T. & MARTIN, S.** “Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli”. *Cell Prolif.* Vol.24, nº2 (1991), pp. 203-214
31. **LIZCAINO, RAMÓN A., & VERGARA GONZÁLEZ J.** *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatóge. [En línea]*, (Tesis pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Escuela de Microbiología Industrial. Bogotá, Colombia. 2008. pp.117. . [Consulta: 2015-07-23]. Disponible en : <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis151.pdf>

- 32. LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A. & CHANDRA, N.** “Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health.”. *Pharmacogn Review*, vol. 4, n°8 (2010), pp. 118-26
- 33. LOCK DE UGAZ, OLGA.** *Investigación fitoquímica*. Lima-Perú: PUCP Fondo editorial, 1994, pp. 2-5
- 34. LÓPEZ, T.** “Flavonoides”. *Fitoterapia*: vol. 21, n°4 (2002), pp.108-113
- 35. LUTOMSKI, J.** “Isolation der Wichtigsten Alkaloide aus dem Kranz der Passionsblume (P. incarnata)”. *Biuletyn Instytut Roslin Leczniczych*. (1960), p. 209-219.
- 36. LUTOMSKI J & MALEK B.** “Pharmacological investigations on raw materials of the genus Passiflora”. *Planta Medica*. (1975), p. 381-384.
- 37. KUMAR, S. & PANDEY A.** “Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview”. *The Scientific World Journal*: (2013) pp. 1-11
- 38. MAMTA, S.; SAXENA, J.; RAJEEV, N. , SINGH, D. & GUPTA A.** “Phytochemistry of Medicinal Plants”. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, vol. 1, n°6 (2013), pp. 168-182
- 39. MALUF, E.; BARROS, H.; FROCHTENGARTEN, M.; BENTI, R. & LEITE JR.** “Assesment of the hypnotic/sedative effects and toxicity of Passiflora edulis aqueous extract in rodents and humans”. *Phytotherapy research*, vol. 5, n°6 (1991), pp. 262-266.
- 40. MICHALAK, A.** “Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress”. *Polish Journal of Environmental Studies*. vol. 15, n°4 (2006), pp. 523-530
- 41. NRSP 309.** Normas Ramales para Drogas crudas y extractos y tinturas, MINSAP. (1992)

42. **MURRAY, R.; BENDER, D.; BOTHAN, K.; KENNELLY, P. & RODWEL V.** *Harper Bioquímica Ilustrada*. 28^{va} ed. China: Mc Graw Hill, 2009. p. 482.
43. **NAKAZAWA, T.; YASUDA, T.; UEDA, J. & OHSAWA, K.** “Antidepressant-Like Effects of Apigenin and 2,4,5-Trimethoxycinnamic Acid from *Perilla frutescens* in the Forced Swimming Test”. *Biol. Pharm. Bull*, vol. 26, n°4 (2003), pp. 474-480
44. **NITZ, S.; KOLLMANNBERGER, H. & DRAWERT, F.** “Determination of nonnatural natural flavors in sparkling fruit wines. Part 2. Enantiomeric gamma lactones in passion fruit and passion fruit products”. *Chemical and Microbial Technology Lebensm.* vol. 12 (1990)
45. **RAMAIYA, S.; BUJANG, J. & ZAKARIA, M.** “Assessment of Total Phenolic, Antioxidant, and Antibacterial Activities of *Passiflora* Species”. *The Scientific World Journal*. 2014 Enero.
46. **REIS, M.** “Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power”. *Intech*:(2013), pp. 87-106
47. **RICE-EVANS C, MILLER N, PAGANGA G.** “Antioxidant properties of phenolic compounds”. *Trends in Plant science*, vol.2, n°4 (1997), pp.152-159
48. **RUDNICKI M, DE OLIVEIRA M, PEREIRA , REGINATTO F, DAL-PIZZOL F, FONSECA J.** “Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts”, *Food Chemistry*, vol.100, n°2 (2005), pp. 719-724
49. **SHAIJI, F.** *Natural antioxidants*. Illinois-Estados Unidos:AOCPress, 1997, p. 102
50. **SALGUEIRO, J.; ARDENGHI, P.; DIAS, M.; FERREIRA, C.; IZQUIERDO, I. & MEDINA, H.** “Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central

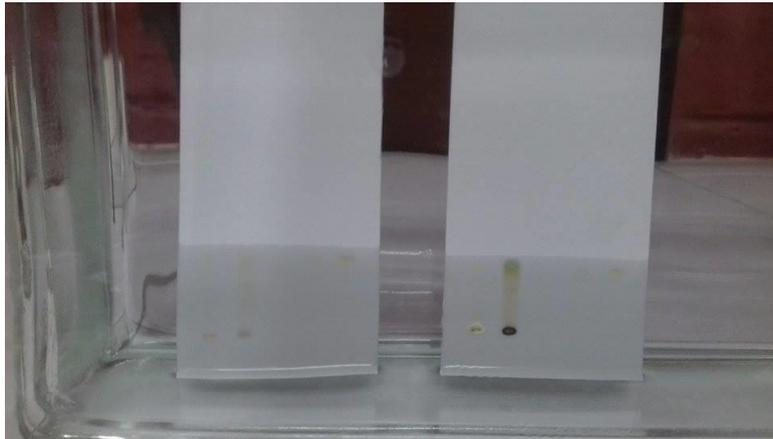
benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats”. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol 58. N°4 (1997), pp. 887-891

51. **SAXENA, M.; SAXENA, J. & PRADHAN, A.** “Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health”. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences*: vol. 16, n°2 (2012), pp.130-134
52. **SCHAFER, F. & BUETTNERA, G.** “Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple”. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 30, n°11 (2001), p. 1191–1212.
53. **SHAO-HUA H, LEAN-TEIK N.** “Quantification of polyphenolic content and bioactive constituents of some commercial rice varieties in Taiwan”. *Journal of Food Composition and Analysis*. Vol. 26, n° 1 (2012), pp. 122-127
54. **SILVA, G. & BOTTOLI, C.** “Analyses of Passiflora compounds by chromatographic and electrophoretic techniques”. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol.45, n°1 (2014), pp. 76-95
55. **TAIZ, L.; ZEIGER, E. & MURPHY A.** *Plant Physiology and Development*. Los Angeles-Estados Unidos, 6^{ta} ed: Sinauer, 2015, pp. 75
56. **TORRES, C.** *Investigación en procesos de transformación de sustancias de interés presentes en hojas, tubérculos, semillas y frutos de especies andinas, para generar productos agroindustriales que pueden ser destinados a nivel industrial, medicinal o alimenticio*. Bogotá-Colombia: Jardín Botánico José Celestino Mutis – Subdirección Científica, 2007.
57. **VILLAR, MARTHA; & VILLAVICENCIO, OSCAR.** *Manual de Fitoterapia [en línea]*. Lima-Perú: OPS, 2001, pp.9, . [Consulta: 30 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/fitoterapia.html>

58. **VETTER, J.** "Plant cyanogenic glycosides". *Toxicon*: vol 29. (2000), pp.11-36
59. **WAGNER, H. & BLADT, S.** *Plant Drug Analysis: A thin layer Chromatography Atlas*. 2^a ed. Springer, 2001, pp. 230
60. **WASICKY, A.; HERNANDES, L.; VETORE-NETO, A.; MORENO, P.; BACCHI, E. & MYIAKE, E.** "Evaluation of gastroprotective activity of *Passiflora alata*". *Revista Brasileira de Farmacognosia.*, vol. 25, n^o4. (2015) pp. 407-412
61. **WAIZE, JOSE.** "Plantas y compuestos importantes para medicina". *Revista de fitoterapia*, vol. 11, n^o1 (2011), (México) pp. 61-75.
62. **WANG C, XU FQ, SHANG JH.** "Cycloartane triterpenoid saponins from water soluble of *Passiflora edulis* Sims and their antidepressant-like effects". *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 148, n^o3 (2013), pp. 812-817
63. **WINK, M.** *Encyclopedia of Plant and crop Science*. New York-Estados Unidos: In Goodman , 2004, p. 915 <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis151.pdf>
64. **ZUCOLOTTO S, FAGUNDES C, REGINATTO F, RAMOS , CASTELLANOS L, DUQUE C, ET AL.** "Analysis of C-glycosyl Flavonoids from SouthAmericanPassifloraSpecies by HPLC-DAD and HPLC-MS". *Phytochemical Analysis*, vol.23, n^o3 (2011), pp.232-239

ANEXOS

ANEXO A: Cromatografía en capa fina de los extractos de hojas y flores de *P. Manicata*



Realizado por: Anahí Bonilla, 2015

ANEXO B: Hidrólisis de los extractos de hojas y flores de *P. manicata*



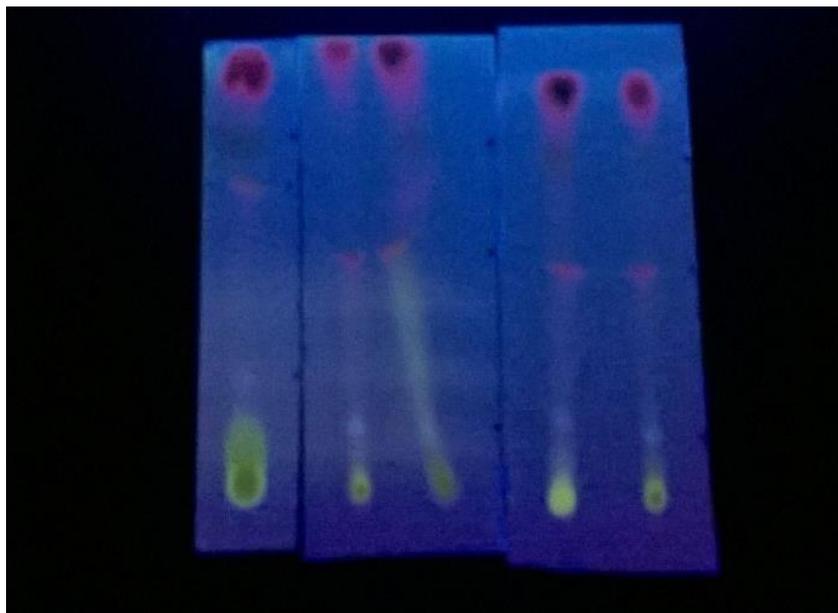
Realizado por: Anahí Bonilla, 2015

ANEXO C: TLC con fase móvil: Tolueno, metil isobutil cetona, acetato de etilo, agua (5:3:1:1)



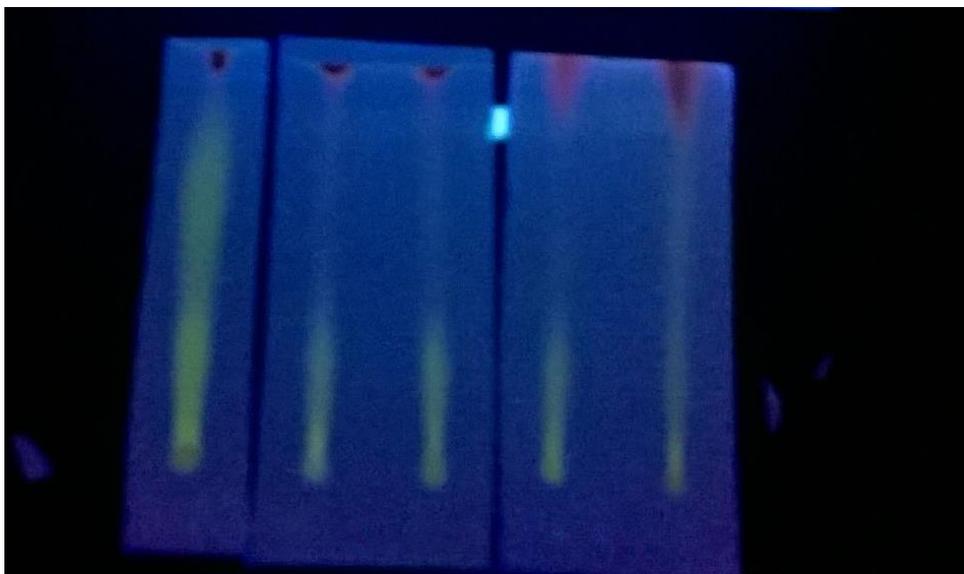
Realizado por: Anahí Bonilla, 2015

ANEXO D: TLC con fase móvil: Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético, agua, metil isobutil cetona (6:0.5:0.5:1:4)



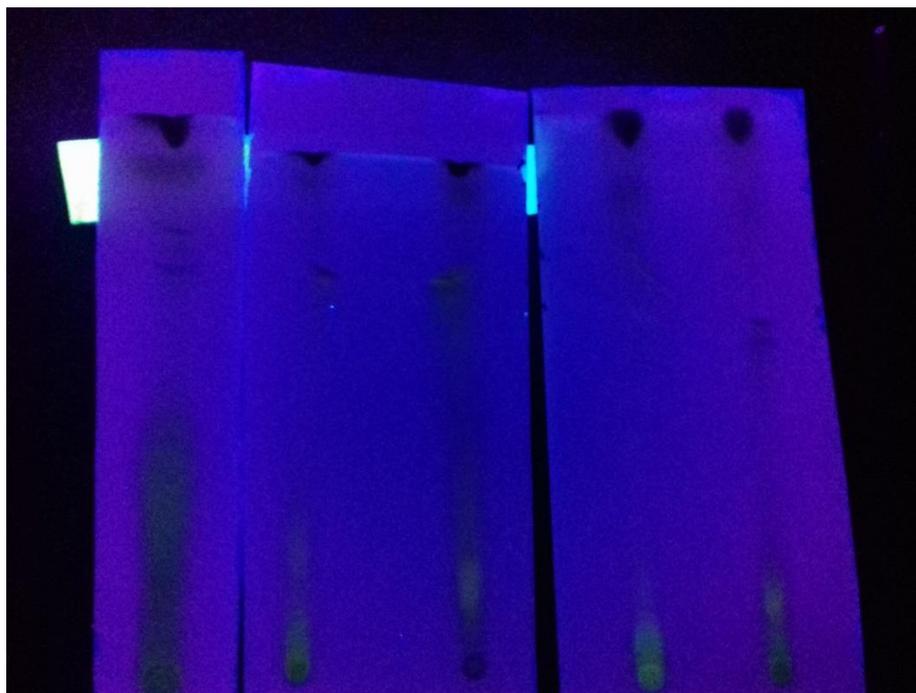
Realizado por: Anahí Bonilla, 2015

ANEXO E: TLC con fase móvil: Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético, agua, metil isobutil cetona (6:0.5:0.5:1:4)



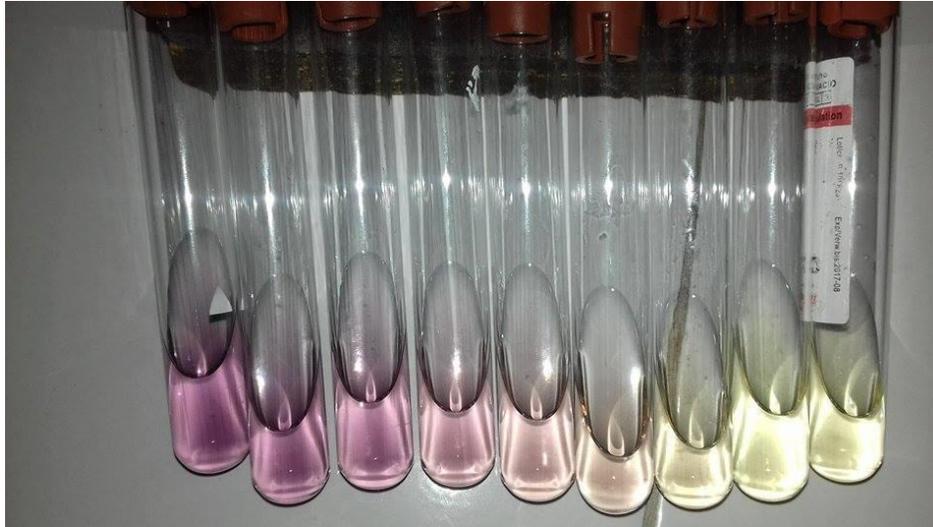
Realizado por: Anahí Bonilla, 2015

ANEXO F: TLC con fase móvil: Agua, ácido fórmico, metil isobutil cetona, acetato de etilo (1:1:3:5)



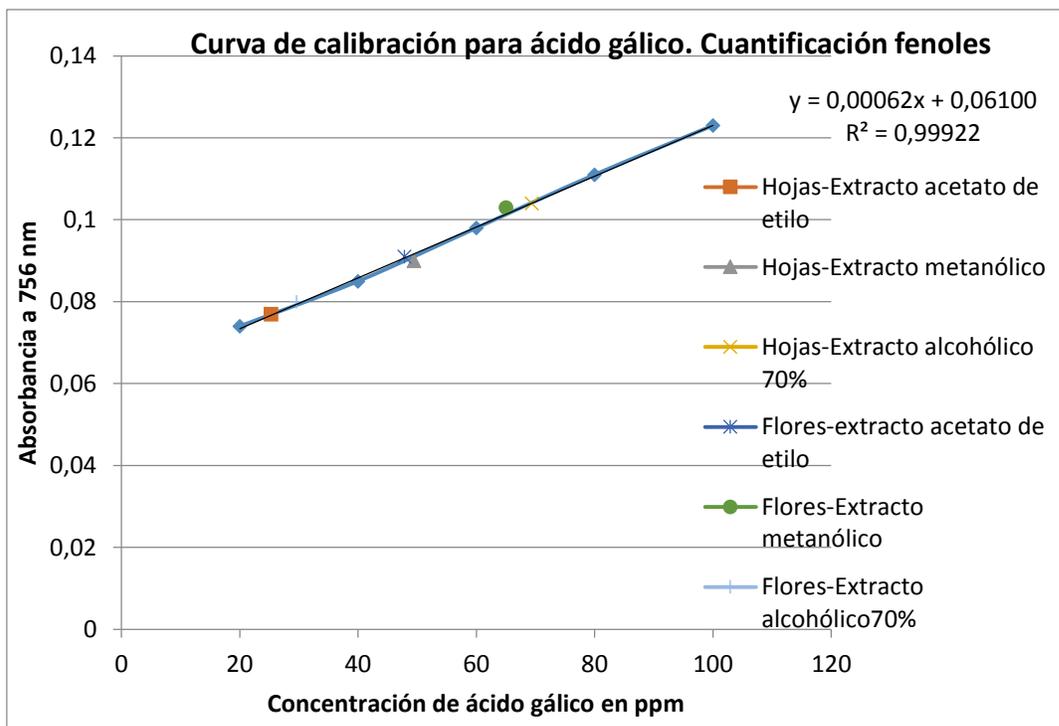
Realizado por: Anahí Bonilla, 2015

G: Método DPPH* para evaluación de la capacidad antioxidante.



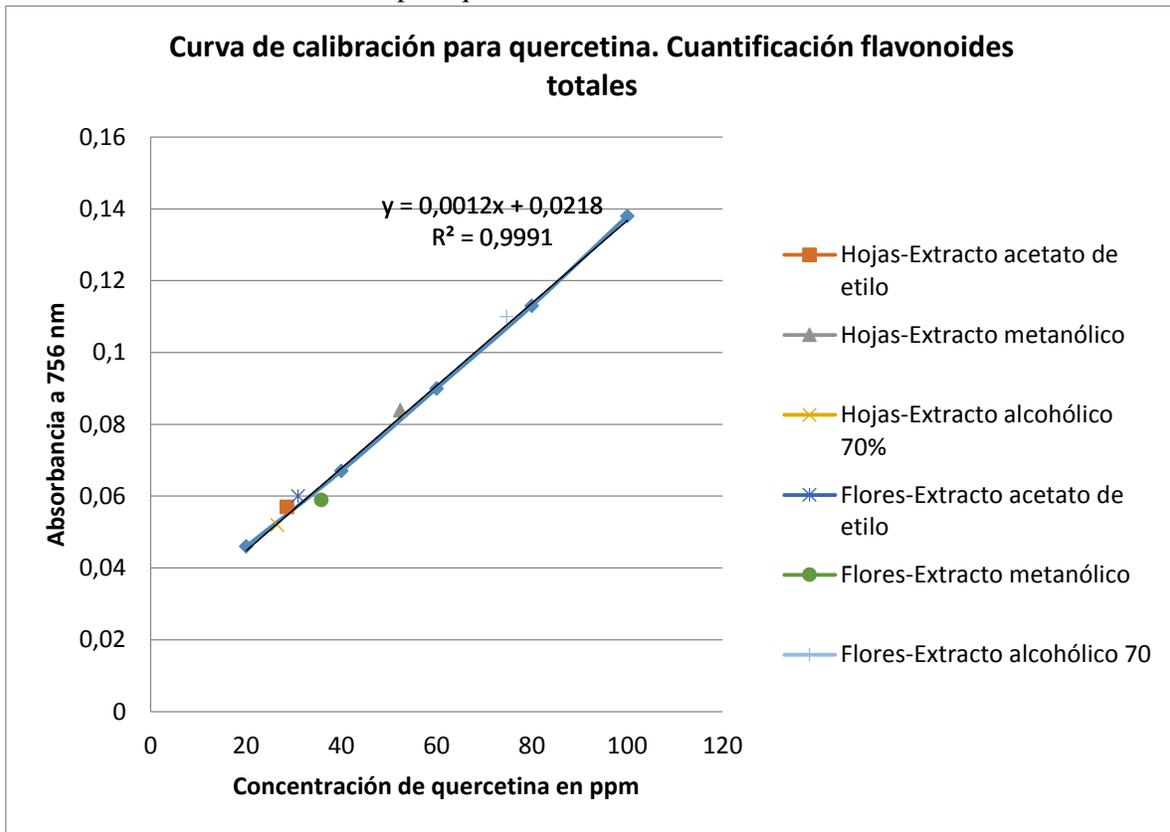
Realizado por: Anahí Bonilla, 2015

ANEXO H: Curva de calibración para ácido gálico usada en la cuantificación de fenoles.



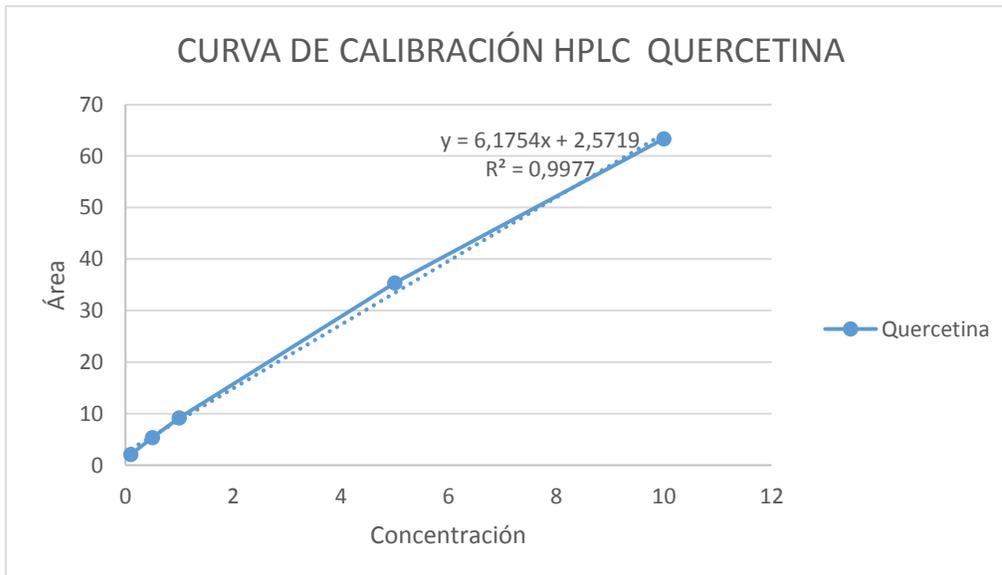
Realizado por: Anahí Bonilla, 2016

ANEXO I: Curva de calibración para quercetina usada en la cuantificación de flavonoides.



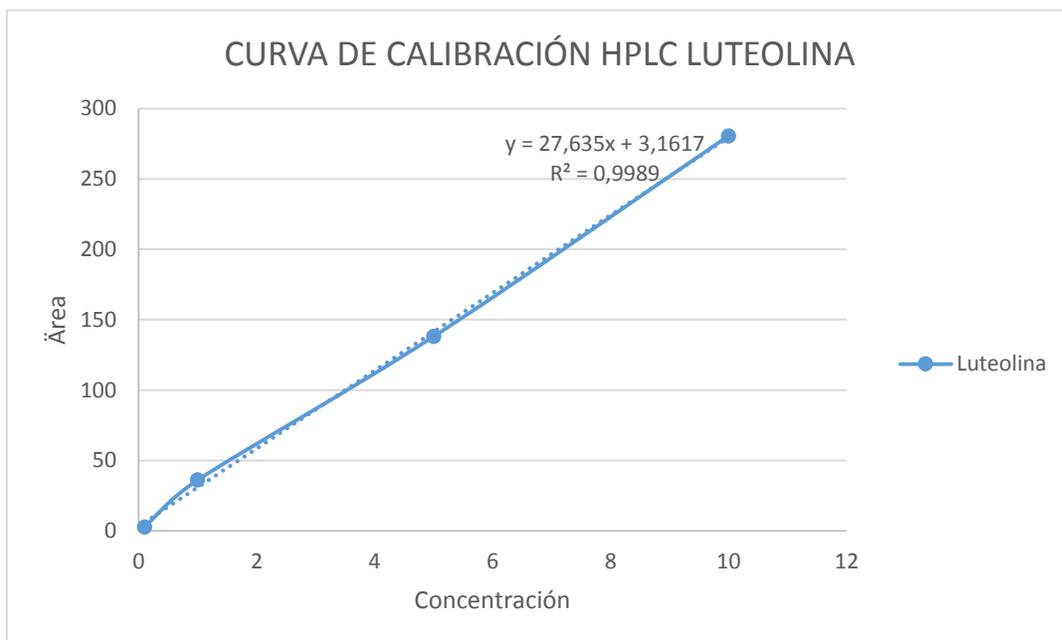
Realizado por: Anahí Bonilla, 2016

ANEXO J: Curva de calibración para quercetina usada en la cuantificación HPLC.



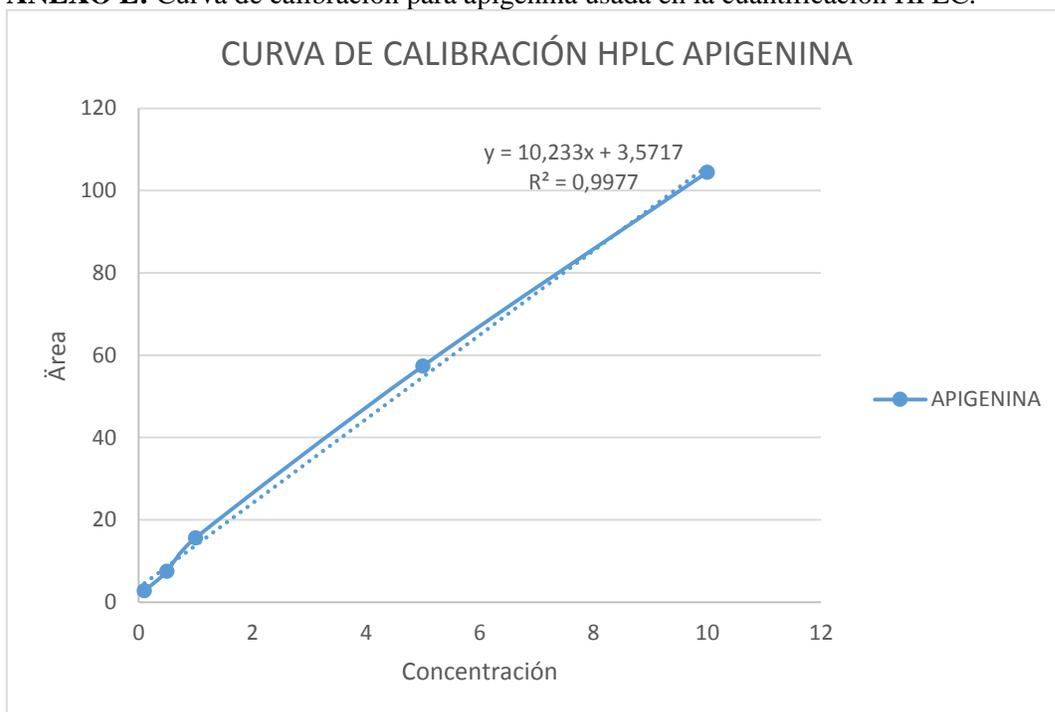
Realizado por: Anahí Bonilla, 2015

ANEXO K: Curva de calibración para luteolina usada en la cuantificación HPLC.



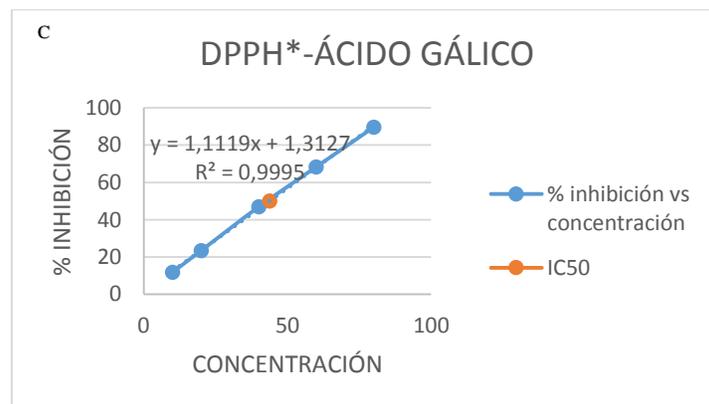
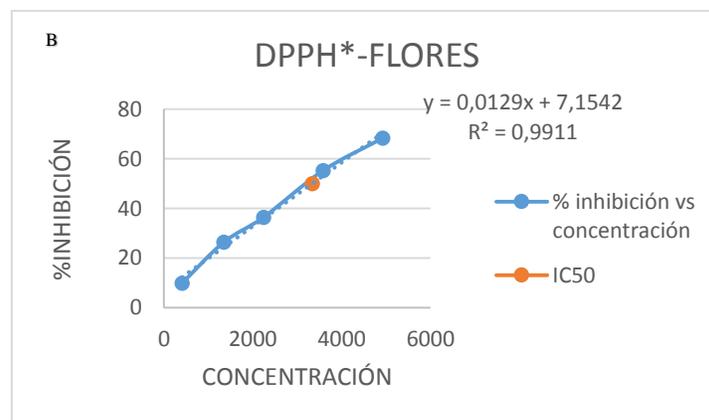
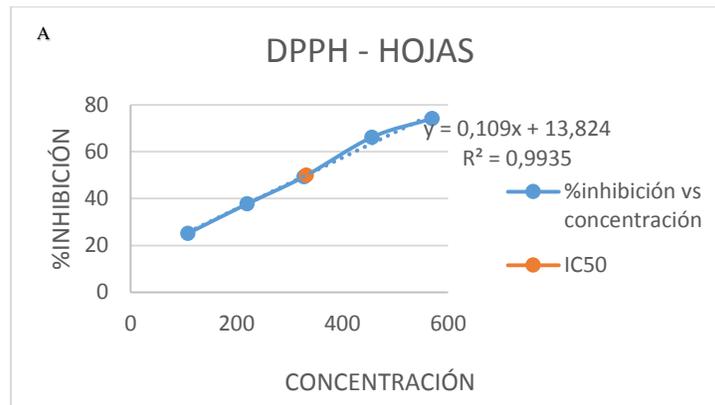
Realizado por: Anahí Bonilla, 2015

ANEXO L: Curva de calibración para apigenina usada en la cuantificación HPLC.



Realizado por: Anahí Bonilla, 2015

ANEXO M: Representación del % de inhibición vs la concentración para el cálculo del IC (A)Hojas, (B)Flores, (C) Ácido gálico



Realizado por: Anahí Bonilla, 2015