



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 mixta*”

Trabajo de titulación presentado para optar por el grado de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: DIANA CAROLINA PAREDES ALVAREZ

TUTOR: BQF. FAUSTO CONTERO

Riobamba - Ecuador

2016

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

El tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “ESTUDIO FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO DE FLORES Y HOJAS DE *Passiflora mixta*”, de responsabilidad de la señorita **Diana Carolina Paredes Alvarez**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. Fausto Contero

DIRECTOR DE TESIS

Lcda. Karen Acosta

PRESIDENTE TRIBUNAL

DOCUMENTALISTA

SISBIB ESPOCH

NOTA DE TRABAJO DE TITULACIÓN

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Diana Carolina Paredes Alvarez, 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, 04 de febrero de 2016

Diana Carolina Paredes Alvarez

060325913-6

Yo, **Diana Carolina Paredes Alvarez**, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados, expuestos en este Trabajo de titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece exclusivamente a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

DIANA CAROLINA PAREDES ALVAREZ

DEDICATORIA

A Dios por ser la fuente inagotable de amor en mi vida, el que ha guiado mis pasos desde que me permitió ver la luz y que sé que continuará junto a mí hasta el fin de mis días. Por la sabiduría que supo entregarme y las bendiciones incontables que me ha dado. A mis padres por ser un ejemplo de trabajo y esfuerzo, por su presencia incondicional en los buenos y malos momentos. A mi madre Nelly que es la mujer a quien más admiro, por ser más que mi madre, mi amiga y mi compañera de vida. A mi padre Alonso por haberme educado de la mejor forma posible. A mis hermanos Matías y Shianny por ser la fuente de mis alegrías, porque siempre tienen una sonrisa para entregarme en todo momento.

Diana

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por ser mi guía en el camino y mi lámpara en momentos de oscuridad ya que sin Él este logro no hubiera sido posible.

A mis padres porque siempre han estado de manera incondicional en mi vida. A toda mi familia por las palabras de aliento y la motivación que siempre me han brindado.

A mis amigos y compañeros por todos los momentos compartidos y por la amistad sincera que hemos construido.

Un agradecimiento especial a mis maestros y tutores de este proyecto de titulación, Karen Acosta, Fausto Contero, Susana Abdo y Diego Vinueza por los conocimientos impartidos a lo largo de este período y sus enseñanzas y consejos no sólo a nivel académico sino también para la vida.

Diana

GLOSARIO

DPPH:	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.
ERO:	Especie Reactiva de Oxígeno
IC50:	Concentración inhibitoria media (CI50)
HPLC:	Cromatografía Líquida de Alta eficiencia (High performance liquid chromatography)
TLC	Thin Layer Chromatography
T	Temperatura
UV	Ultravioleta
mg	Miligramo
ml	Mililitro
nm	Nanómetro
ppm	Parte por millón ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Rf	Ratio of Front (posición de un compuesto en la placa de cromatografía en capa fina)
λ	Longitud de onda
A	Absorbancia
%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
%I	Porcentaje de inhibición
Eq	Equivalente
HCl	Ácido clorhídrico

CONTENIDO

RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO	4
1.1. Fundamentación teórica	4
<i>1.1.1. Fitofarmacia.....</i>	<i>4</i>
<i>1.1.2. Metabolitos secundarios.....</i>	<i>4</i>
<i>1.1.2.1. Fenoles.....</i>	<i>4</i>
<i>1.1.2.2. Flavonoides.....</i>	<i>5</i>
<i>1.1.3. Actividad antioxidante.....</i>	<i>6</i>
<i>1.1.3.1 Antioxidantes.....</i>	<i>6</i>
<i>1.1.3.2 Especie reactiva de oxígeno (ERO)</i>	<i>6</i>
<i>1.1.3.3 Radicales libres.....</i>	<i>7</i>
<i>1.1.3.4 Estrés oxidativo.....</i>	<i>8</i>
<i>1.1.4 Actividad ansiolítica</i>	<i>9</i>
<i>1.1.4.1 Ansiedad.....</i>	<i>9</i>
<i>1.1.4.1.1 Tratamiento.....</i>	<i>9</i>
<i>1.1.5 Efectos adversos</i>	<i>11</i>
<i>1.1.6 Género Passiflora.....</i>	<i>11</i>
<i>1.1.6.1 Constitución química de la Familia Passifloraceae</i>	<i>11</i>
<i>1.1.6.2 Flavonoides más importantes encontrados en Passiflora.....</i>	<i>12</i>
<i>1.1.6.3 Propiedades farmacológicas.....</i>	<i>14</i>
<i>1.1.7 Passiflora mixta.....</i>	<i>14</i>
<i>1.1.7.1 Distribución geográfica</i>	<i>14</i>
1.2 Antecedentes de la investigación.....	15

CAPÍTULO II

2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
------------------------------------	-----------

2.1.	Lugar de investigación.....	16
2.2.	Recolección del material vegetal.....	17
2.3.	Materiales y reactivos.....	17
2.4.	Acondicionamiento de la droga vegetal.....	17
2.5.	Control de calidad de la droga vegetal.....	17
2.5.1.	<i>Determinación del contenido de humedad.....</i>	18
2.5.1.1.	<i>Fundamento.....</i>	18
2.5.1.2.	<i>Procedimiento.....</i>	18
2.5.1.3.	<i>Cálculos.....</i>	18
2.5.2.	<i>Determinación de cenizas totales.....</i>	19
2.5.2.1.	<i>Fundamento.....</i>	19
2.5.2.2.	<i>Procedimiento.....</i>	19
2.5.2.3.	<i>Cálculos.....</i>	19
2.5.3.	<i>Determinación de cenizas solubles en agua.....</i>	20
2.5.3.1.	<i>Fundamento.....</i>	20
2.5.3.2.	<i>Procedimiento.....</i>	20
2.5.3.3.	<i>Cálculos.....</i>	20
2.5.4.	<i>Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.....</i>	21
2.5.4.1.	<i>Fundamento.....</i>	21
2.5.4.2.	<i>Procedimiento.....</i>	21
2.5.4.3.	<i>Cálculos.....</i>	21
2.6.	Análisis cualitativo.....	22
2.7.	Cromatografía en capa fina. (TLC).....	25
2.8.	Cuantificación de metabolitos secundarios.....	27
2.8.1.	<i>Preparación de extracto.....</i>	27
2.8.2.	<i>Cuantificación de fenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu.....</i>	28
2.8.3.	<i>Cuantificación de flavonoides totales.....</i>	28
2.9	Análisis de flavonoides por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....	29
2.9.1.	Preparación de estándares.....	29
2.9.2.	Preparación de la muestra.....	30
2.10.	Análisis de capacidad captadora de radicales libres.....	31
2.10.1.	<i>Preparación del extracto.....</i>	31
2.10.2.	<i>Procedimiento.....</i>	31
2.10.3.	<i>Cálculos.....</i>	32

CAPÍTULO III

3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
3.1.	Control de calidad	33
3.2.	Análisis cualitativo	34
3.3.	Análisis de cromatografía en capa fina TLC	37
3.3.1	<i>Determinación de glicósidos</i>	37
3.3.2	<i>Determinación de agliconas.....</i>	39
3.4	Cuantificación de metabolitos secundarios.....	40
3.4.1	<i>Cuantificación de fenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu.....</i>	40
3.4.2	<i>Cuantificación de flavonoides totales.....</i>	41
3.5	Análisis y cuantificación de flavonoides por HPLC	41
3.6	Determinación de la actividad antioxidante	43
3.6.1	<i>Determinación de la cinética de reacción</i>	43
3.6.2	<i>Determinación del IC₅₀</i>	43
	CONCLUSIONES.....	44
	RECOMENDACIONES.....	45
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1- 1.	Estrés oxidativo y enfermedades.....	8
Tabla 2- 1.	Clasificación de los trastornos de ansiedad.....	9
Tabla 3- 1.	Clasificación de Fármacos Usados en el Tratamiento de la Ansiedad.....	10
Tabla 4- 1	Efectos Adversos de las Benzodiazepinas.....	10
Tabla 5- 1.	Clasificación de reacciones adversas a medicaciones.....	11
Tabla 6- 1	Fitoconstituyentes de diferentes especies de <i>Passifloras</i>	12
Tabla 7- 1.	Actividades farmacológicas de diferentes tipos de <i>Passifloras</i>	14
Tabla 8- 1.	Principales caracteres cualitativos polimórficos de <i>Passiflora mixta</i>	15
Tabla 1- 2.	Descripción de los equipos usados.....	17
Tabla 1- 3.	Control de calidad de hojas y flores de <i>P. mixta</i>	33
Tabla 2- 3.	Tamizaje fitoquímico de hojas de <i>P. mixta</i>	34
Tabla 3- 3.	Tamizaje fitoquímico de flores de <i>P. mixta</i>	35
Tabla 4- 3.	Determinación del % de extracción de hojas y flores de <i>P. mixta</i>	36
Tabla 5- 3.	Determinación de sólidos solubles de hojas y flores de <i>P. mixta</i>	36
Tabla 6- 3.	Medición de los Rf de TLC para glicósidos y sus referencias bibliográficas.....	38
Tabla 7- 3.	Medición de los Rf de TLC para agliconas y sus estándares.....	39
Tabla 8- 3.	Cuantificación de fenoles totales en hojas y flores de <i>P. mixta</i>	40
Tabla 9- 3.	Cuantificación de flavonoides totales en hojas y flores de <i>P. mixta</i>	41
Tabla 10-3.	Tiempos de retención (tR) de compuestos encontrados en flores y hojas, y sus estándares.....	42
Tabla 11- 3.	Cuantificación de flavonoides en hojas y en flores de <i>P. mixta</i> por HPLC.....	42
Tabla 12- 3.	Determinación del % de Inhibición y el IC ₅₀	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- 1.	Estructura químicas de algunos núcleos básicos de flavonoides.....	5
Figura 2- 1.	Esquema de formación de especies reactivas de oxígeno.....	7
Figura 3- 1.	Patogénesis de los radicales libres en el humano.....	7
Figura 4- 1.	Estructuras de flavonoides más importantes de la familia <i>Passifloraceae</i>	13
Figura 1- 2.	Elaboración de extractos para tamizaje fitoquímico.....	23
Figura 2- 2.	Tamizaje fitoquímico con el extracto etéreo.....	24
Figura 3- 2.	Tamizaje fitoquímico con el extracto alcohólico.....	24
Figura 4- 2.	Tamizaje fitoquímico con el extracto acuoso.....	24
Figura 5- 2.	Procedimiento para análisis por TLC.....	26
Figura 6- 2.	Procedimiento para preparación de extractos para cuantificación de fenoles y flavonoides.....	27
Figura 7- 2.	Elaboración de extracto para análisis de HPLC.....	30
Figura 1- 3.	Cromatografía del extracto metanólico para flavonoides de tipo glicósidos de <i>P. mixta</i> de hojas (A) y flores (B) vista a la lámpara UV cercano.....	37
Figura 2- 3.	Cromatografía en capa fina del compuesto etanólico hidrolizado de hojas (A) y flores (B) de <i>P. mixta</i> y estándares vista a la lámpara UV λ corta.....	39

RESUMEN

El objetivo de la investigación se centró en estudiar la composición fitoquímica y evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de hojas y flores de curuba de monte (*Passiflora mixta*). Como un estudio previo se realizó un control de calidad de la materia vegetal y un tamizaje fitoquímico para la identificación cualitativa. Se identificó metabolitos secundarios tipo flavónico mediante Cromatografía en capa fina (TLC). Se cuantificó fenoles y flavonoides mediante espectroscopía UV en tres diferentes extractos: acetato de etilo, metanol y etanol al 70%. Para la cuantificación de fenoles se usó el método de Folin-Ciocalteu, con ácido gálico como estándar de referencia, mientras que para el análisis de flavonoides se usó quercetina. La cuantificación de flavonoides no glicosilados se realizó mediante Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en extractos hidrolizados, y se usó apigenina, quercetina y luteolina como estándares de referencia. El análisis de la actividad captadora de radicales libres se realizó en extractos metanólicos mediante pruebas *in vitro* con 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). En el estudio se identificó compuestos propios del género *Passiflora* como isovitexina, vitexina 1-ramnósido, isovitexina 2-O-ramnósido y orientina. La máxima cantidad de fenoles totales se cuantificó en extractos hidroalcohólicos de hojas 3777,8mg Eq de ácido gálico/100g de materia vegetal y de flavonoides 2605,6mg Eq de quercetina/100g de materia vegetal en el mismo extracto. El análisis por HPLC indica que apigenina fue el componente mayoritario en flores con 6,8mg/100g de materia vegetal y quercetina en hojas con 1,3mg/100g de materia vegetal. El extracto metanólico de hojas presentó mejor actividad antioxidante con un IC₅₀ de 361,167 µg/mL en comparación con flores que presenta un IC₅₀ de 479,445µg/mL. Se concluye que *Passiflora mixta* tiene mejor actividad captadora de radicales libres en hojas en comparación con flores. Se recomienda que se usen hojas para estudios fitoquímicos posteriores.

PALABRAS CLAVE: <CURUBA DE MONTE (*Passiflora mixta*)> <ANÁLISIS FITOQUÍMICO>
<ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE> <PORCENTAJE DE INHIBICIÓN>
<CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MEDIA> <2,2-DIPHENYL-1-PICRYLHYDRAZYL (DPPH)> <FITOQUÍMICA>

ABSTRACT

The objective of this research is to study the photochemical composition and evaluate the *in vitro* antioxidant activity of leaves and flowers of wild curuba (*Passiflora mixta*). As a previous study a quality control of plant matter and a phytochemical screening for qualitative identification was performed. Secondary metabolites Flavonic type was identified by means of thin layer chromatography (TLC). Phenols and flavonoids were quantified throughout UV spectroscopy at three different extracts: ethyl acetate, methanol and ethanol 70 %. To quantify the phenols the Folin-Ciocalteu method was used, with Gallic acid as standard reference, whereas for analysis of flavonoids quercetin was used. Quantification of non-glycosylated flavonoids was performed using high performance liquid chromatography (HPLC) in hydrolyzed extracts and apigenin, quercetin and luteolin were used as reference standards. Analysis of scavenging activity of the free radical was performed in methanolic extract by *in vivo* tests with 2,2-diphenyl -1- picrylhydrazyl (DPPH). In the study we identified composite typical of *Passiflora* genus such as isovitexin, vitexin one-rhamnoside, isovitexin 2-O-rhamnoside and orientin. The maximum amount of total phenols is identified in hydroalcoholic extracts of leaves 3777,8 mg Eq Gallic acid /100 g plant material and flavonoids 2605,6 mg Eq quercetin /100 g plant matter in the same extract. HPLC analysis indicates that the major component was apigenin in flowers with 6,8 mg/100 g of vegetable matter and quercetin leaves with 1,3 mg / 100 g of vegetable matter. The ethanol extract of leaves present best antioxidant activity with an IC₅₀ of 361,167 µg/mL compared with flowers having an IC₅₀ of 479,44 µg/mL. In conclusion *Passiflora mixta* has better free radical scavenging activity in leaves compared with flowers. It is recommended that leaves for further phytochemical studies are used.

KEY WORDS: <WILD CURUBA (*Passiflora mixta*)> <PHYTOCHEMICAL ANALYSIS >
<ANTIOXIDANT ACTIVITY> <INHIBITION PERCENTAGE> <INHIBITING
CONCENTRATION> <2,2-DIPHENYL- 1- PICRYLHYDRAZYL (DPPH)>

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la presencia de efectos no deseados o secundarios de algunos medicamentos especialmente aquellos que se han obtenido por vía sintética se han visto en aumento. Los efectos secundarios pueden ser leves, otros severos e inclusive algunos mortales; mientras unos pueden durar pocos días o semanas, otros permanecen durante todo el tratamiento e inclusive luego de finalizado. (Prieto, Garrido & González, 2004, pp 19-36)

Un ejemplo de éstos, son los medicamentos ansiolíticos. El uso de barbitúricos tiende a crear dependencias además de que es fácil llegar a niveles tóxicos. El uso de benzodiazepinas ocasiona presencia de efectos secundarios que si bien no amenazan la vida del paciente, tienen ligeras complicaciones como somnolencia, ataxia, o disfunción psicomotriz. (Zaforteza, 2007)

La ansiedad ha llegado a ocupar uno de los primeros lugares en relación a problemas de salud mental. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, el 25% de la población mundial en algún momento de su vida va a padecer de alguna especie de trastorno de ansiedad, 450 millones de personas en el mundo durante el año 2011 presentaron algún tipo de trastorno mental. (Puchol, 2003)

Otro problema de gran importancia en la actualidad es la oxidación celular, causante de complicaciones como envejecimiento, aterosclerosis, cáncer, cataratas, cuadros inflamatorios crónicos, problemas cardiovasculares, diabetes, pero de todos estos el más alarmante en la actualidad es el cáncer. (Navarro, 2015)

Se dice que para el 2030 existirán alrededor de 22 millones de casos de cáncer en comparación con los 14 millones que hubo en 2012, por lo cual durante este periodo las muertes a casusa de cáncer pasarán de 8,2 millones a 13 millones por año. Existen datos además de que un 53% de los casos que se diagnosticaron cáncer y un 57% de muertes causadas por éste afectan a los hombres. Entre los hombres, se diagnosticó cáncer más a menudo en los pulmones 16,7% de todos los casos, mientras que en las mujeres, el más frecuente es el cáncer de mamas con un 25,2%. (OMS, 2015)

La fitoterapia se ha convertido en una buena alternativa para poder reemplazar a los medicamentos sintéticos que, debido a sus efectos secundarios, en lugar de ser una solución puede volverse un problema. La utilidad de fitomedicamentos se encuentra respaldada por estudios científicos y clínicos, el índice de toxicidad es menor al de los medicamentos comercializados, y su uso a largo plazo es

recomendado debido a que su impacto negativo en la salud es mucho menor que un medicamento convencional. (Artricerter, 2013)

La búsqueda de productos naturales que sean beneficiosos a la salud se ha visto incrementada en los últimos años, los antioxidantes son moléculas presentes en estos productos, capaces de disminuir el estrés oxidativo ya que neutralizan los radicales libres, por esta razón se les atribuye varios beneficios entre los cuales se destaca su actividad antiinflamatoria, anticancerígena, neuroprotectora entre otras. Entre los compuestos más representativos con actividad antioxidante tenemos a los polifenoles y dentro de los cuales se encuentran los flavonoides. (Reyes, 2013)

Varias especies de *Passiflora* son conocidas por sus usos etnobotánicos y se han sugerido como fuentes potenciales de moléculas naturales de relevancia farmacológica. Los efectos de los flavonoides en el sistema nervioso central se han considerado sólo en estos últimos 10 años, compuestos naturales tales como crisina y apigenina exhiben un efecto ansiolítico, que afectan apenas la relajación muscular, sedación y la locomoción cuando se administra en ratones. Por lo cual en el género *Passiflora* se conoce que farmacológicamente tiene gran potencial para el desarrollo de fármacos tanto ansiolíticos como sedantes; y han sido en muchos países usadas para tratamiento de ansiedad, insomnio, histeria, epilepsia, espasmos y dolor. (Zanoli, Avallone, & Barald, 2000, pp 117-123)

Diversas investigaciones han demostrado que varias especies del género *Passiflora* presentan actividad antioxidante in vitro y ex vivo por lo cual están siendo considerados como nuevas fuentes de recursos naturales antioxidantes. (Da Silva, Betim, Colomeu & col, 2013, pp 882-890)

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general

Estudiar la composición fitoquímica y evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de hojas y flores de *P. mixta*.

Objetivos específicos

Determinar la calidad y composición fitoquímica de la droga vegetal seca proveniente de hojas y flores de *P. mixta* mediante control de calidad y screening fitoquímico.

Identificar cualitativamente la presencia de compuestos de tipo flavónico en extractos de flores y hojas de *P. mixta* mediante cromatografía en capa fina.

Cuantificar el contenido de fenoles y flavonoides totales en hojas y flores de *P. mixta* mediante espectrofotometría y cromatografía líquida de alta eficiencia.

Evaluar la capacidad captadora de radicales libres *in vitro* de extractos de hojas y flores de *P. mixta* mediante DPPH

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Fundamentación teórica

1.1.1. *Fitofarmacia*

La fitoterapia es la ciencia que estudia el uso de plantas medicinales y las incorpora en formas farmacéuticas (fitofármacos), cuya calidad, seguridad y eficacia están garantizadas, teniendo en cuenta las características de las drogas vegetales y extractos. (Cea, 2013).

1.1.2. *Metabolitos secundarios*

Las plantas producen una cantidad de compuestos orgánicos que no tienen una relación directa con su crecimiento y desarrollo. Estas sustancias se los conoce como metabolitos secundarios; poseen importantes funciones ecológicas en las plantas como:

- Protegen a las plantas de la ingestión por herbívoros y de la infección por patógenos microbianos
- Sirven como atrayentes de polinizadores y dispersadores de semillas y como agentes en la competencia planta-planta.

Los metabolitos secundarios vegetales pueden dividirse en tres grupos químicamente diferentes: terpenos, fenoles y compuestos que tienen nitrógeno. (Taiz & Zeiger, 2006, pp 533-534)

1.1.2.1. *Fenoles*

Las plantas producen gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol, un grupo funcional hidroxilo en un anillo aromático, estos se denominan compuestos fenólicos. Forman un grupo químicamente heterogéneo de unos 10000 compuestos. Muchos tienen papeles de defensa en las plantas contra herbívoros y patógenos, otros participan en la absorción de la radiación ultravioleta dañina o en la reducción del crecimiento de las plantas competidoras próximas. (Taiz & Zeiger, 2006 pp 542-543)

1.1.2.1.1 Propiedades farmacológicas.

Existe un interés creciente en los compuestos fenólicos debido a su efecto contra algunas enfermedades como ciertos cánceres y desordenes cardíacos derivados de su poderosa actividad antioxidante. Los compuestos fenólicos poseen una estructura química especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante actuando como captore de radicales libres neutralizando peligrosas especies reactivas de oxígeno e iones metálicos quelantes. (García, 2007)

1.1.2.2. Flavonoides

Los flavonoides son los pigmentos amarillos derivados de la fenil-benzo y pirona o fenil cromona. Se dan mucho en el reino vegetal, normalmente en forma de heterósidos. Son una estructura molecular del tipo C6 – C3 – C6. Son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua. Existen 6 clases principales, las chalconas, las flavonas, los flavonoles, los flavanoles, las antocianidinas, y los taninos condensados, y otras dos más, las xantonas y las auronas (Arraiza, 2010)

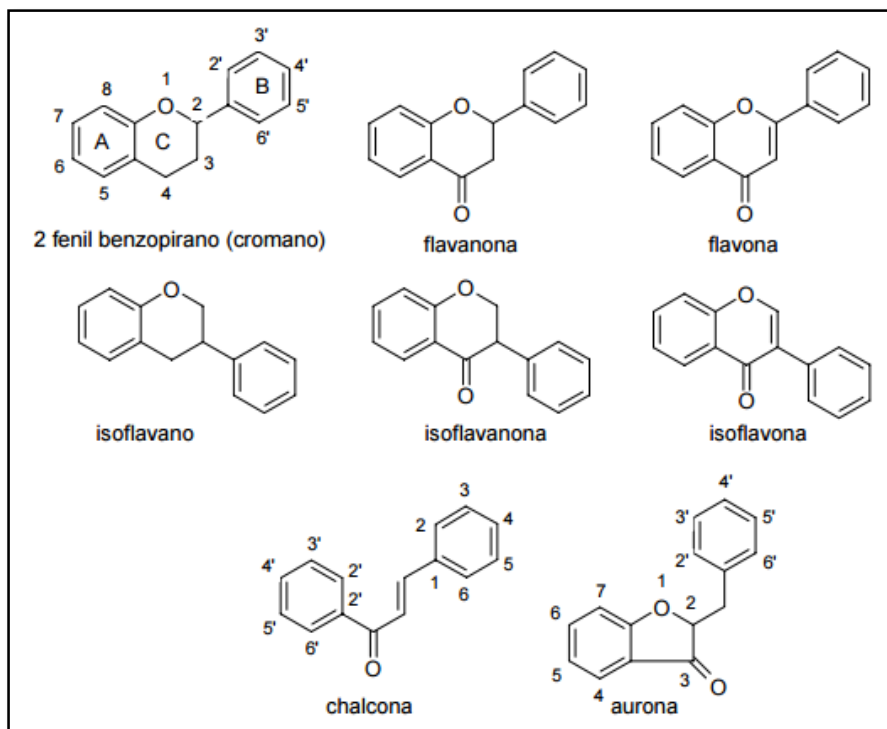


Figura 1- 4 Estructura químicas de algunos núcleos básicos de flavonoides
Fuente: (Provensi, 2007, pp 38-44)

1.1.2.2.1. Propiedades farmacológicas

Algunas propiedades que poseen los flavonoides son: antioxidantes, antitrombóticas, antiinflamatorias, ansiolíticas, antialérgicas, antiasmáticas, antimicrobianas e inhibidoras de varias enzimas como transcriptasa reversa, tirosina quinasa C, proteína quinasa C. Siendo de todas éstas la actividad antioxidante y ansiolítica las más importantes. (Arraiza, 2010)

1.1.3. Actividad antioxidante

1.1.3.1 Antioxidantes

Es una molécula que puede ser natural o sintética, que previene la formación de especies reactivas de oxígeno en cantidades que perjudiquen el organismo, estimula mecanismos de reparación de tejidos e incrementa la capacidad antioxidante del mismo organismo. (Núñez, 2011, pp 644-660)

1.1.3.1.1 Antioxidantes naturales

Los antioxidantes naturales que provienen de plantas han sido usados en la industria en los últimos años como conservantes de alimentos y también en medicamentos. Compuestos como tocoferol, quercetina y caroteno cuya actividad es comparable al de antioxidantes sintéticos como 2-terbutilhidroxitolueno (BHT) y el 2-terbutilhidroxianisol (BHA) los cuales pueden presentar toxicidad. Entre los antioxidantes que sobresalen son los polifenoles y especialmente flavonoides y taninos. (Núñez, 2011, pp 644-660)

1.1.3.2 Especie reactiva de oxígeno (ERO)

Son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. A este grupo pertenecen las especies derivadas del oxígeno que presentan gran actividad y que son capaces de producir radicales libres en el organismo humano. Un exceso de estos pueden ocasionarse por diversos factores como por ejemplo la acción de sustancias exógenas que causan estrés al organismo por ejemplo contaminación ambiental, radiaciones, tabaquismo, alcoholismo, drogadicción, alimentación inadecuada entre otras. (Nuñez, 2011). Los más importantes son el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^-) y el peroxinitrito ($ONOO^-$). Se generan durante la reducción completa del oxígeno molecular a agua, en el cual se incorporan cuatro electrones al oxígeno en diversas etapas, generándose los radicales libres como moléculas intermedias. (Garrido, 2007, pp 14)

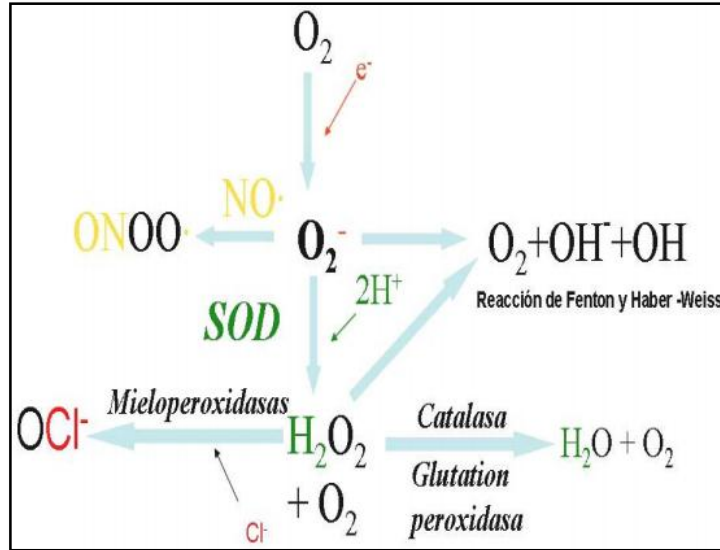


Figura 2- 4 Esquema de formación de especies reactivas de oxígeno
Fuente: (Garrido, 2007, pp14)

1.1.3.3 Radicales libres

Es una especie química cuya estructura presenta uno o más electrones desapareados y se caracteriza por su elevada reactividad y facilidad para crear otros radicales libres (Nuñez, 2011, pp 644-660)

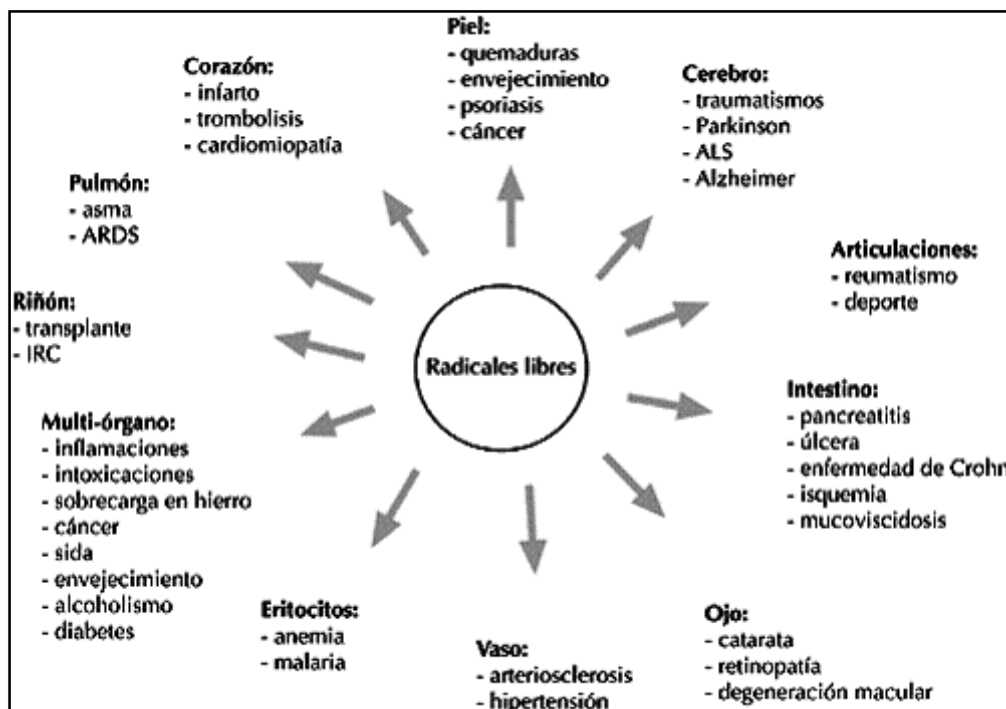


Figura 3- 3 Patogénesis de los radicales libres en el humano
Fuente: (Acosta, Quintana, & Mancías, 2006)

1.1.3.4 Estrés oxidativo

Cuando el contenido intracelular presenta un aumento de ERO y este sobrepasa el de las defensas antioxidantes de la célula conduce a un estrés oxidativo mediante el cual se produce daño a diversas moléculas como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos. También produce alteraciones celulares conduciendo al desarrollo de enfermedades como cardiomiopatías, aterosclerosis, cáncer. (Avello & Suwalsky, 2006, pp 161-172)

Tabla 1-1. Estrés oxidativo y enfermedades

ENFERMEDADES	ACCIÓN OXIDATIVA
ENVEJECIMIENTO	Disminución de las concentraciones de antioxidantes e inactivación de las enzimas detoxificadoras de radicales libres y acumulación de proteínas oxidadas no degradadas
ATEROESCLEROSIS	La oxidación de proteínas de baja densidad (LDL) causa su fragmentación por lo cual se originan residuos de aminoácidos de la misma. Por esta razón van a tener mayor poder aterogénico siendo citotóxicas para el endotelio, iniciando o extendiendo la lesión aterosclerótica.
CANCER	Se ha sugerido la implicación de radicales libres en el desarrollo tumoral. El humo del tabaco es el causante del cáncer de pulmón, el cual contiene sustancias como alquitán, nicotina, y radicales libres en abundancia. Existe también óxidos radicalarios de nitrógeno que junto con las proteínas forman carcinógenos como la nitrosamina.
CATARATA SENIL	Las EROs presentes en el cristalino debido al constante bombardeo de radiaciones diversas, son causantes de desnaturalización y degradación de sus proteínas causando las conocidas cataratas
INSUFICIENCIA RENAL	Las EROs van a jugar un importante papel en el desarrollo del daño renal y en la formación de la proteinuria. La pérdida de nefronas conduce a una mayor producción de radicales libres. El aumento de la peroxidación de lípidos en la membrana de glóbulos rojos se ha documentado en pacientes con IR lo cual es un aumento del estrés oxidativo. Los pacientes con hemodiálisis tienen un aumento del estrés oxidativo debido a la disminución en la eliminación de radicales libres

Elaborado por: Diana Paredes, 2016

Fuente: (Camps, 2010, pp 51-56)

1.1.4 Actividad ansiolítica

1.1.4.1 Ansiedad

La ansiedad es un estado que se caracteriza por síntomas psicológicos (sensación desagradable vaga difusa y aprensión) que suele ir acompañada de síntomas autonómicos (cefalea, palpitaciones, sudoración, sensación peculiar en epigastrio, intranquilidad). Algunos autores consideran que hay un tipo de ansiedad normal que permiten a los individuos responder de forma adecuada a estímulos intensos sin embargo, es probable que la ansiedad se refiera a un estado de malestar que refleja condición de enfermedad, a diferencia de las respuestas emocionales normales que un individuo presenta en situaciones de excepción. (Mendoza, 2008, pp 356-359)

Tabla 2- 1. Clasificación de los trastornos de ansiedad

CLASIFICACIÓN DE LOS TRASTORNOS DE ANSIEDAD
Síndrome de ansiedad generalizada
Crisis de angustia (ataques de pánico)
Síndrome de estrés postraumático
Fobia social
Fobias específicas (agorafobia, claustrofobia, hemofobia, herpetofobia, acrofobia, nasofobia)
Trastorno obsesivo compulsivo
Trastorno por estrés agudo
Trastorno de ansiedad debido a enfermedad médica: endocrinopatías (feocromocitoma, hipertiroidismo, hipotiroidismo) crónica degenerativa, enfermedad terminal
Trastorno de ansiedad inducido por sustancias
Trastorno de ansiedad no especificado

Fuente: (Mendoza, 2008, pp 356-359)

1.1.4.1.1 Tratamiento

Los principales fármacos para el tratamiento de ansiedad son las benzodiacepinas y los barbitúricos.

Tabla 3- 1. Clasificación de Fármacos Usados en el Tratamiento de la Ansiedad

CLASIFICACIÓN DE FÁRMACOS USADOS EN EL TRATAMIENTO DE LA ANSIEDAD
Benzodiacepinas. En la actualidad constituye el grupo de fármacos de más amplio uso (fármaco de fármacos)
Bloqueadores β -adrenérgicos. Propanolol
Barbitúricos. En la actualidad, en desuso por la introducción de las benzodiacepinas. Se reservan en anestesiología para la inducción de la, y en el tratamiento de la epilepsia.
Otros. Buspirona. Hidrato de coral, meprobamato, metacualona, hidroxisina (antagonistas histaminérgicos de los receptores centrales de tipo uno (H); hidroxicina, difenhidramina)

Fuente: (Mendoza, 2008, pp 356-359)

Los fármacos del grupo de las benzodiacepinas actúan incrementando el nivel de la actividad inhibitoria del ácido γ aminobutírico (GABA) al acoplarse a un sitio específico en el receptor GABA tipo A, incrementando el flujo de iones Cl^- . La mayoría de las benzodiacepinas son compuestos altamente liposolubles, por lo que en el paciente anciano se acumula en tejido graso y tras la administración prolongada, incrementa los niveles séricos y produce delirio, desorientación en tiempo y persona, confusión y alteraciones de la conducta. Un efecto adverso de importancia es el desarrollo de tolerancia y dependencia después del uso prolongado. (Mendoza, 2008, pp 356-359)

Tabla 4- 1. Efectos Adversos de las Benzodiacepinas

EFFECTOS ADVERSOS DE LAS BENZODIACEPINAS
Somnolencia
Mareo
Retardo psicomotriz (que puede interferir en el manejo de maquinaria o automóviles)
Debilidad muscular
Inhibición del centro de la respiración
Depresión
Disminución de la memoria anterógrada

Fuente: (Mendoza, 2008, pp 356-359)

Los barbitúricos son fármacos en desuso para efectos ansiolíticos e hipnóticos debido a su alta toxicidad. Sin embargo se emplean en anestesiología y en el tratamiento de epilepsia. (Mendoza, 2008, pp 356-359)

1.1.5 Efectos adversos

Según la Organización Mundial de la Salud un efecto adverso se considera a cualquier respuesta nociva o no intencionada del cuerpo a un fármaco que se produce a dosis normales para el tratamiento diagnóstico o profilaxis. Unas reacciones de medicamento se presentan en todos los pacientes mientras que otras solo en ciertas poblaciones. (OMS, 2004)

Tabla 5- 1. Clasificación de reacciones adversas a medicaciones

Tabla I Clasificación de reacciones adversas a medicaciones		
Reacciones que se observan en todos los pacientes expuestos	sobredosis	Reacción tóxica debida a un exceso de dosis, una alteración de la excreción o ambas
	Efecto secundario	Efecto farmacológico indeseable a las dosis recomendadas
	Interacción medicamentosa	Acción de una medicación en la eficacia o toxicidad de otra medicación
Reacciones que solo se observan en pacientes susceptibles	Intolerancia a la medicación	Un nivel de tolerancia bajo a la acción farmacológica de la medicación
	Idiosincrasia	Una reacción cualitativamente anormal determinada genéticamente frente a una medicación relacionada con un déficit metabólico o enzimático
	Alergia	Reacción mediada inmunológicamente caracterizada por la especificidad, transferencia de anticuerpos o linfocitos y recurrente
	Pseudoalergia	Reacción con las manifestaciones clínicas de reacción alérgica (por ejemplo tras la liberación de histamina), pero sin especificidad inmunológica

Fuente: (De Miguel, 2013)

1.1.6 Género *Passiflora*

Passiflora es el género más importante de la familia *Passifloraceae*. Son lianas o enredaderas que trepan por medio de zarcillos, aunque existen especies arbóreas o arbustivas. Las pasifloráceas tienen distribución tropical y comprenden 17 géneros y 660 especies. (Hernández & Bernal, 2000, pp 320-335)

1.1.6.1 Constitución química de la Familia *Passifloraceae*

El análisis químico del género pasiflora indica que contiene como productos químicos activos principales: alcaloides, fenoles, flavonoides glicosilados y compuestos cianogénicos. Entre los principales flavonoides se encuentra: apigenina, luteolina, quercetina, kaempferol, vitexin, isovitexin, orientin. Contiene también polifenoles como rutina, Además contiene alcaloides indólicos simples que se encuentran basados en un sistema de anillos β -carbolínicos como: harmano, harmol, harmina, harmalol y harmalina. (Kamaldeep, Sanju, & Anupam, 2004, pp 1-23)

Tabla 6- 1. Fitoconstituyentes de diferentes especies de Passifloras

ESPECIE	FITOCONSTITUYENTE
<i>Passiflora incarnata</i>	Los mayores fitoconstituyentes son flavonoids, entre los que se incluyen: Apigenina, luteolina, quercetina, kaempferol; además de C-glicosil flavonoides como vitexina, isovitexina, orientina, isoorientina, schaftosido, isoschaftosido, isovitexina- 2-O-glucopiranosido, isoorientina-2-O-gluco-piranosido. Contiene además alcaloides indólicos simples basados en un sistema de anillos carbolínicos como harmano, harmol, harmina, harmalol y harmalina
<i>Passiflora edulis</i>	Glicósidos flavónicos como: luteolina-6-C-chinovosido, luteolina-6-C-fucoside, ciclopentanoid cianohidrin glicosidos passicapsina y passibiflorina. Fenoles como 4-Hydroxy-β-ionol, 4-oxo- β-ionol, 4-hydroxy-7,8- dihydro-α-ionol, 4-oxo-7,8-dihydro-α-ionol. Alcaloides como harmano, harmina, harmalina y harmalol
<i>Passiflora alata</i>	C-glicosil flavonoides 2-xilosilvitexina y pequeñas cantidades de vitexina, isovitexina y orientina
<i>Passiflora quadrangularis</i>	Passiflorina, Triterpene glycosido quadrangulosido, ácido oleanólico-3- fosforoso Monoterpenoides como (2E)-2,6-dimetil-2,5áciso heptadienóico, (2E)-2,6 dimetil-2,5 ácido heptadienoico-β-D-glucopiranosil ester, (5E)-2,6-dimetil-5,7-octadieno-2,3-diol.

Fuente: (Kamaldeep, Sanju, & Anupam, 2004, pp 1-23)

Elaborado por: Diana Paredes, 2016

1.1.6.2 Flavonoides más importantes encontrados en Passiflora

Apigenina: La apigenina es un flavonoide natural presente en las frutas y las verduras. Está reconocida como un flavonoide bioactivo que posee propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antiangiogénicas, antialergizantes, antígenotóxicas y anticancerosas. Los estudios epidemiológicos sugieren que una alimentación rica en flavona reduciría el riesgo de determinados cánceres, en particular los de mama, tubo digestivo, piel y próstata. Se ha sugerido que la apigenina tendría una acción protectora en otras enfermedades en las que se produce un proceso oxidativo, como los trastornos cardiovasculares y neurológicos. (Abu-Yousif, Smith, Getsios & col, 2008, pp 3057-3065)

Luteolina: Cuando se compara con 27 otros flavonoides la luteína tiene la mejor protección contra la agresión de nuestro ADN inhibiendo su daño oxidativo.

Quercetina: La quercetina es uno de los flavonoides más ampliamente difundido entre los alimentos utilizados por el ser humano. Tiene numerosos efectos beneficiosos para la salud humana, incluyendo

actividad antitumoral, protección cardiovascular, prevención de las cataratas, efectos antihipertensivos. (Perez-Vizcaino y col, 2009, pp 67-75)

Kaempferol es un potente antioxidante y ayuda a prevenir el daño oxidativo de nuestras células, lípidos y ADN. Numerosos estudios preclínicos han demostrado que el kaempferol y algunos glicósidos de kaempferol tener una amplia gama de actividades farmacológicas , incluyendo antioxidante , antiinflamatorio , antimicrobiano, anticancerígeno , cardioprotector , neuroprotector , antidiabético , anti- osteoporóticos , estrogénica / antiestrogénica , ansiolítico , analgésico y antialérgico ocupaciones. (Calderón, Burgos, Pérez & López, 2001, pp 298-344)

Vitexina: es un glucósido flavonoide que se encuentra en ciertas hierbas, incluyendo la hierba de espino. Vitexina y sus derivados inducen la apoptosis y suprimen el crecimiento de tumores.

Isovitexina: Es una flavona, la apigenina - 6 -C- glucósido.

Orientina: Es la 8-C -glucósido de luteolina.

Iso-orientina: Es la luteolina-6-C-glucósido

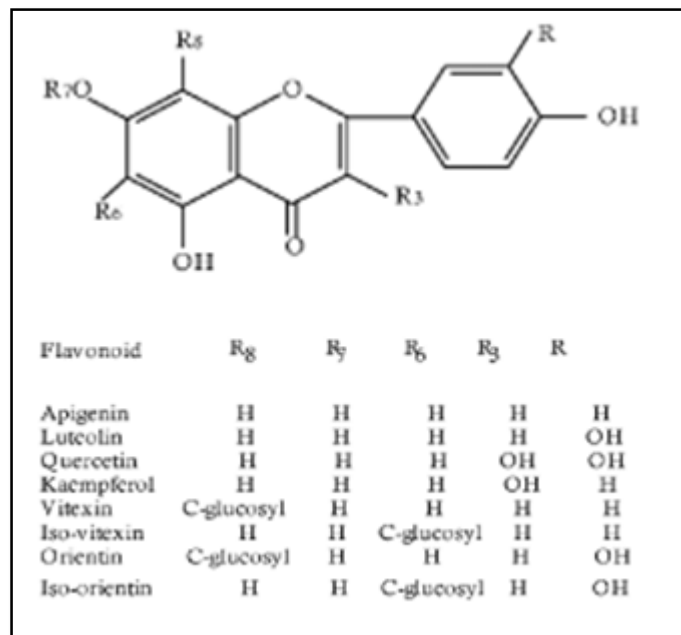


Figura 4- 3. Estructuras de flavonoides más importantes de la familia *Passifloraceae*

Fuente: (Kamaldeep, Sanju, & Anupam, 2004, pp 1-23)

1.1.6.3 Propiedades farmacológicas

El género *Passiflora* se ha utilizado tradicionalmente en las Américas y posteriormente en Europa como hierba calmante para la ansiedad, el insomnio, convulsiones, y la histeria. Todavía se utiliza hoy en día para tratar la ansiedad y el insomnio. Los científicos creen que las obras de pasiflora se dan mediante el aumento de los niveles de ácido gamaaminobutírico (GABA) en el cerebro, el cual reduce la actividad de algunas células del cerebro, haciendo que se sienta más relajado. (Maryland, 2014)

Tabla 7- 1. Actividades farmacológicas de diferentes tipos de *Passifloras*

ESPECIE	ACTIVIDAD
<i>Passiflora edulis</i>	En Brasil ha sido usada como ansiolítica, sedativa, diurética y analgésica, antihelmíntico, antidiarreico, estimulante, tónico y también en el tratamiento de la hipertensión, en síntomas de la menopausia, y para los cólicos de los bebés en América del Sur
<i>Passiflora foetida</i>	Infusiones de hojas se ha usado para tratar la histeria y el insomnio en Nigeria, en la India las hojas se aplican en la cabeza por mareos y dolor de cabeza; el fruto se utiliza como un emético.
<i>Passiflora caerulea</i>	En las Antillas, México, los Países Bajos y América del Sur, la raíz se ha usado como un sedante y vermífugo. En Italia, la planta se ha utilizado como un antiespasmódico y sedante. En Mauricio, una tintura y un extracto de la planta se han utilizado como un remedio para el insomnio
<i>Passiflora incarnata</i>	En Europa es usada para el insomnio, la ansiedad, y se ha utilizado como un té sedante en América del Norte La planta se ha utilizado como analgésico, anti-espasmódico, anti-asmáticos, germicida y sedante en Brasil; como sedantes y narcóticos en Irak; en condiciones de enfermedad como la dismenorrea, epilepsia, insomnio, neurosis y la neuralgia en Turquía; en la diarrea, dismenorrea, la neuralgia, quemaduras, hemorroides y el insomnio en los Estados Unidos

Fuente: (Kamaldeep, Sanju, & Anupam, 2004, pp 1-23)

Elaborado por: Diana Paredes, 2016

1.1.7 *Passiflora mixta*

1.1.7.1 Distribución geográfica

P. mixta también denominada curuba de monte o curuba de indio, es nativa de los Andes, desde Venezuela hasta Bolivia, entre 1.700 m y 3.700 m de elevación. Es una trepadora con hojas trilobadas y coriáceas. Los frutos tiene pericarpio coriáceo y son muy variables en tamaño y características de

la pulpa. Esta especie es considerada como un importante recurso para la reproducción del tumbo. (Sanjinés, Øllgaard, & Balslev, 2006, pp 329-346)

Tabla 8-1. Principales caracteres cualitativos polimórficos de *Passiflora mixta*

ÓRGANO	DESCRIPCIÓN	
TALLO	Forma exterior	Estriado/angulado
	Pubescencia	Glabro a aterciopelado
ESTÍPULAS	Duración	Decíduas
PECÍOLO	Pubescencia	Poco densa/ aterciopelado
HOJA	Pubescencia haz	Glabro a aterciopelado
	Pubescencia envés	Glabro/aterciopelado
BRÁCTEA	Pubescencia	Glabro a aterciopelado
FLOR	Forma de la copa	Campanulada
	Orientación	Semi-erecta(10-50°)
	Color ovario	Amarillo verdoso/kaki
	Color estilos	Rosado
	Distribución de color estilos	Uniforme/moteado
FRUTO	Forma	Elipsoide/fusiforme
	Color	Amarillo verde
	Manchas de Antracnosis	Algunas medias

Fuente: (Primot, 2005, pp 467-471)

Elaborado por: Diana Paredes, 2016

1.2 Antecedentes de la investigación

En el estudio de Cabrera Sandoval & Forero realizada en la universidad Nacional de Colombia en el año 2014, se determinó la actividad antioxidante y antimicrobiana en extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Passiflora ligularis* donde se determinó que los extractos hidroalcohólicos presentan mayor actividad y se observó correlación entre los fenoles y la actividad antioxidante.

El estudio de Rudnicki, realizado en Universida Federal de Rio Grande del Sur, en Brazil en el año 2007, las especies *P. alata* y *P. edulis* demostraron actividad antioxidante en extractos hidroalcohólicos, actividad mayoritaria en *P. edulis*. Además se demuestra una relación linear entre contenido de fenoles totales y actividad antioxidante, pudiendo decirse que los fenoles son los responsables de la actividad en los extractos.

Shanmugam, Karuppusamy, & Thangaraj en la Universidad de Bharathiar en el año 2014, mediante el análisis por HPLC de *Passiflora subpeltata* reveló la presencia de compuestos bioactivos tales como quercetina (22,36 mg g de extracto) y apigenina (21,26 mg / g de extracto) en cantidades más

altas y trazas de ácido gálico y catequina. Compuestos que pueden actuar como potentes antioxidantes, antiinflamatorios y analgésicos.

Según el estudio de Provensi realizado en la universidad Federal de Rio Grande del Sur en Brazil, en el año 2007, las especies de *Passiflora* presentan un uso tradicional importante como ansiolítico y sedativo. Las especies más citadas en literatura son: *P. actinia*, *P. alata*, *P. edulis*, *P. incarnata*, *P. quadrangularis*. Por lo cual presentan un gran potencial para el desarrollo de medicamentos ansiolíticos e hipnóticos y sedativos.

Por esta razón, se examinará el extracto de *Passiflora mixta* ya que es una especie menos estudiada, para encontrar posible actividad antioxidante y su relación con el contenido de flavonoides y fenoles.

CAPÍTULO II

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Lugar de investigación

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

2.2. Recolección del material vegetal

La planta *Passiflora mixta* (hojas y flores) fue recolectada en el mes de agosto (época de floración) en la parroquia La Candelaria del cantón Penipe de la provincia de Chimborazo cuyas coordenadas GPS son: -1.53403, -78.51056

2.3. Materiales y reactivos.

Tabla 1- 4. Descripción de los equipos usados

EQUIPOS	DESCRIPCIÓN
Molino	De cuchillas marca Arthur H, Tomas. C.O. Phila. PA. USA
Sonicador	Marca Branson 2510
Estufa	Marca Memmert
Rotavapor	BUCHI Rotavapor R110 & B-465 Water Bath
Mufla	IVYMEN N-8LITROS 1100°C
Balanza analítica	Balanza electrónica marca RADWAG, de 220 g de capacidad x 0,1 mg de lectura mínima.
Cámara UV	Chromato vue modelo cc20
Espectrofotómetro	Cole Parmer S 2150
HPLC	SCL CT0 10-A

Elaborado por: Diana Paredes, 2016

2.4. Acondicionamiento de la droga vegetal

Para el secado del material vegetal se eligieron los mejores ejemplares que no presenten contaminación de ningún tipo tanto de hojas como de flores de la planta fresca y se procedió a su lavado con agua potable. A continuación, se desecó en una estufa de aire caliente de marca Memmert a una temperatura de 40°C durante tres días. Una vez seco el material se trituró en un molino de cuchillas marca Arthur H, Tomas. C.O. Phila. PA. USA, hasta que el tamaño de partícula quedó entre 2 y 3 mm. Su almacenamiento se realizó en fundas herméticas en las cuales no se permitió el ingreso de humedad, y se almacenó en un lugar fresco, seco y oscuro hasta su uso.

2.5. Control de calidad de la droga vegetal

El control de calidad de la droga se realizó en base a métodos fisicoquímicos, de gran importancia para garantizar la seguridad y eficacia de la droga para su análisis posterior. A continuación, se describen los parámetros analizados.

2.5.1. Determinación del contenido de humedad

2.5.1.1. Fundamento

Método gravimétrico que se basa en la diferencia de pesos que se obtiene después de calentar la muestra en una estufa de 100-105°C.

La presencia de agua facilita el rápido crecimiento de microorganismos, hongos que causan deterioro de la planta y contaminación por las sustancias liberadas por estos microorganismos, teniendo esta consideración es de vital importancia determinar la cantidad de agua presente en la droga vegetal con el fin de asegurar la estabilidad de los componentes químicos de la misma.

2.5.1.2. Procedimiento

Se pesaron $2 \text{ g} \pm 0.5 \text{ mg}$ de droga cruda y se transfirieron a una cápsula previamente tarada y se secó a 100°C durante 3 horas. La cápsula se puso en un desecador donde se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se pesó; colocándose nuevamente en la estufa durante 1 hora y se repitió el procedimiento hasta obtener masa constante. El ensayo se realizó por triplicado.

2.5.1.3. Cálculos

La expresión de los resultados están expresados en % de Humedad en función de la siguiente formula:

$$\%H = \frac{M_2 - M_1}{M} * 100$$

Dónde:

H = Porcentaje de Humedad

M = masa de la muestra de ensayo (g).

M1= masa del pesa filtro con la muestra desecada (g)

M2 = masa del pesa filtro con la muestra de ensayo (g).

100 factor matemático para los cálculos.

2.5.2. *Determinación de cenizas totales*

2.5.2.1. *Fundamento*

Se basa en la diferencia de pesos que se obtiene después de una calcinación de la droga vegetal. La determinación de cenizas totales es un parámetro que nos indica alteración en la calidad de la droga cruda ya sea adulteración, contaminación o sustitución de la misma.

2.5.2.2. *Procedimiento*

Para el ensayo se pesó una cantidad de muestra pulverizada y tamizada de no menos de 2,0 g, hasta no más de 3,0 g con una desviación permisible de 0,5 mg en un crisol de porcelana o platino previamente tarado. La porción de ensayo fue calentada suavemente en campana de gases 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 h.

El crisol fue retirado de la mufla y se enfrió en una desecadora, se pesó, repitiéndose el proceso hasta que dos pesadas sucesivas no difieran en más de 0,5 mg por g (masa constante). Para alcanzar la masa constante los intervalos entre incineración y pesaje fue de 30 min. Si el residuo obtenido de la incineración presentase trazas de carbón, se procede a añadir unas gotas de solución de peróxido de hidrógeno concentrado, solución de nitrato de amonio al 10 % m/v o ácido nítrico, posteriormente se calienta la muestra hasta evaporar los solventes. Al enfriar el crisol el residuo debe presentarse de color blanco o casi blanco.

2.5.2.3. *Cálculos*

Los resultados son expresados en % de Cenizas totales en función de la siguiente fórmula:

$$\% C = \frac{(M_2 - M)}{(M_1 - M)} * 100$$

Donde:

C = porcentaje de cenizas totales en base hidratada.

M = masa del crisol vacío (g)

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

M2 = masa del crisol con la ceniza (g)

100 = factor matemático para los cálculos.

Los valores se aproximan hasta las décimas.

2.5.3. Determinación de cenizas solubles en agua

2.5.3.1. Fundamento

La finalidad del método consiste en evaluar la cantidad de material inorgánico soluble en agua presente en las cenizas totales.

2.5.3.2. Procedimiento

A las cenizas totales obtenidas, se le añadió un volumen 15 a 20 mL de agua destilada libre de material mineral. El crisol se tapó mientras la solución hervía suavemente a la llama del mechero durante 5 min. Se dejó enfriar la solución y se filtró a través un filtro libre de cenizas. El filtro con el residuo se transfirió al crisol inicial, se carbonizó con mechero en cámara de gases, previa la incineración en un horno mufla de 700-750 °C, por un tiempo no menor a 2 h. El crisol fue retirado de la mufla y se enfrió en una desecadora, cuando el crisol alcanzó la temperatura ambiente se pesó. Se repitió el procedimiento hasta alcanzar peso constante.

2.5.3.3. Cálculos

Los resultados son expresados en % de cenizas totales solubles en agua, en función de la siguiente formula:

$$\%Ca = \frac{(M_2 - Ma)}{(M_1 - M)} * 100$$

Donde:

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.

Los valores se aproximan a las décimas.

2.5.4. *Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico*

2.5.4.1. *Fundamento*

Se basa en la diferencia de pesos que se obtiene después de una calcinación de la droga vegetal y la extracción con HCl.

Este método determina el contenido de sustancias minerales insolubles en ácido clorhídrico contenido en una muestra vegetal. Las cenizas insolubles en ácido son una medida de la materia arenosa.

2.5.4.2. *Procedimiento*

A las cenizas totales obtenidas, se le añadió un volumen de 2-3 mL de ácido clorhídrico al 10 %. El crisol se tapó herméticamente con un vidrio reloj y se calentó sobre un baño de agua hirviendo durante 10 min. El vidrio reloj fue lavado cuidadosamente con 5mL de agua destilada caliente y este lavado se depositó junto con el contenido del crisol.

La solución se filtró a través de un filtro libre de cenizas; se lavó el residuo con agua destilada caliente hasta que el filtrado acidulado con ácido nítrico p.a; al cual se le añadió una o dos gotas de solución de nitrato de plata 0.1 mol/L, no presentó rastro de cloruros.

El filtrado con el residuo se desecó a una temperatura de 100 a 105°C, se transfirió el contenido al crisol inicial y se incineró en un horno mufla a una temperatura de 700-750 °C por un tiempo no menor a 2 h (si no se señala otra temperatura en la norma específica). El crisol fue retirado de la mufla y se enfrió en una desecadora, cuando el crisol alcanzó la temperatura ambiente se pesó. Se repitió el procedimiento hasta alcanzar peso constante

2.5.4.3. *Cálculos*

Los resultados son expresados en % de cenizas totales insolubles en ácido clorhídrico, en función de la siguiente formula:

$$\%Cia = \frac{(M_2 - M)}{(M_1 - M)} * 100$$

Dónde:

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

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

M2= masa del crisol con la ceniza (g)

100= factor matemático.

Los valores se aproximan hasta las décimas.

2.6. Análisis cualitativo

El tamizaje fitoquímico se realizó a través de reacciones químicas de identificación, mediante cambios de color o formación de precipitados, destinadas a determinar la presencia de metabolitos secundarios en el vegetal. La planta fresca, seca o el residuo de una extracción; fue sometida a tres extracciones sucesivas según el esquema de la Figura 1-2, a cada extracto se le midió el volumen obtenido y se le calculó su concentración, esto es, gramos de sustancias extraídas por mililitro de extracto. Para ello se tomó una alícuota de 5 mL y se pasó a una cápsula previamente tarada, se evaporó a sequedad en baño de agua y se pesó nuevamente.

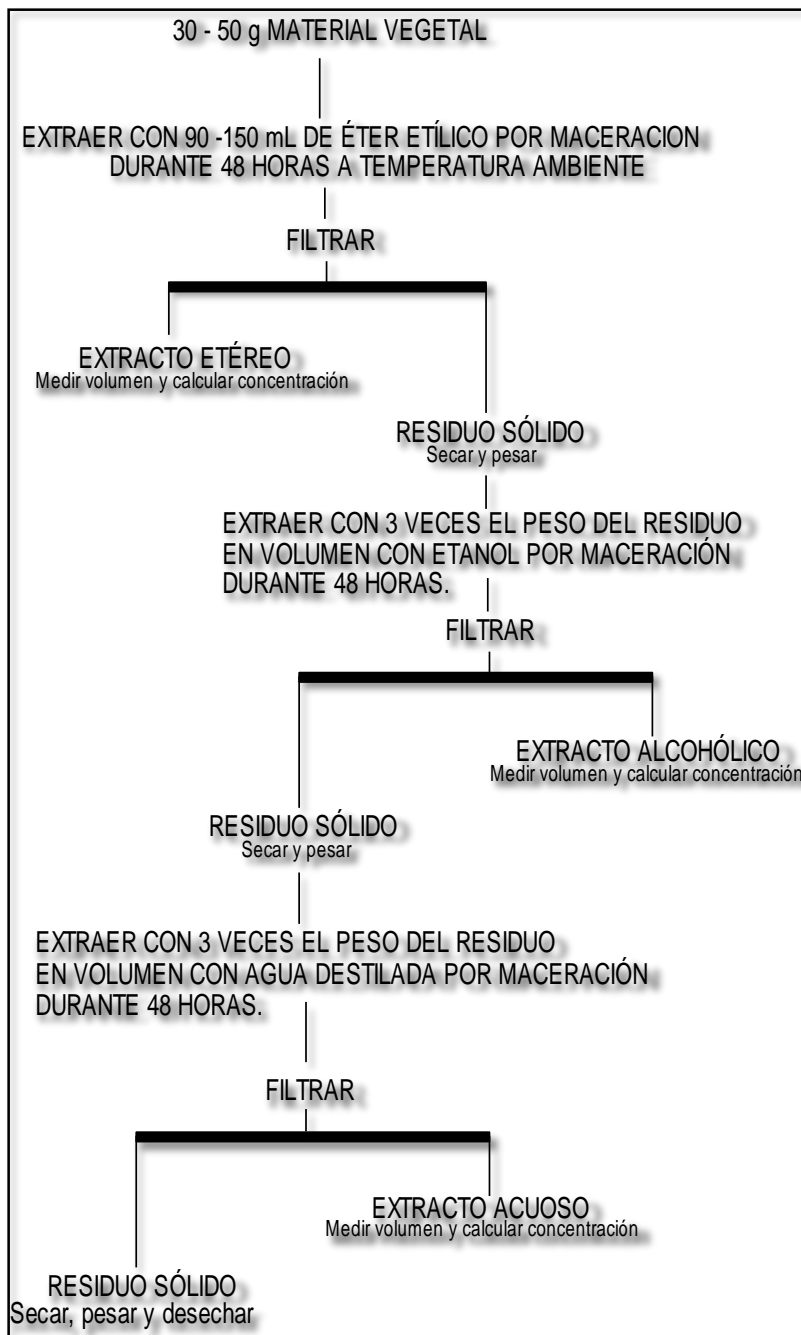


Figura 1- 5. Elaboración de extractos para tamizaje fitoquímico
 Fuente: (Miranda, M. 2000).

A partir de esto se procedió a determinar los metabolitos secundarios mediante reacciones de coloración

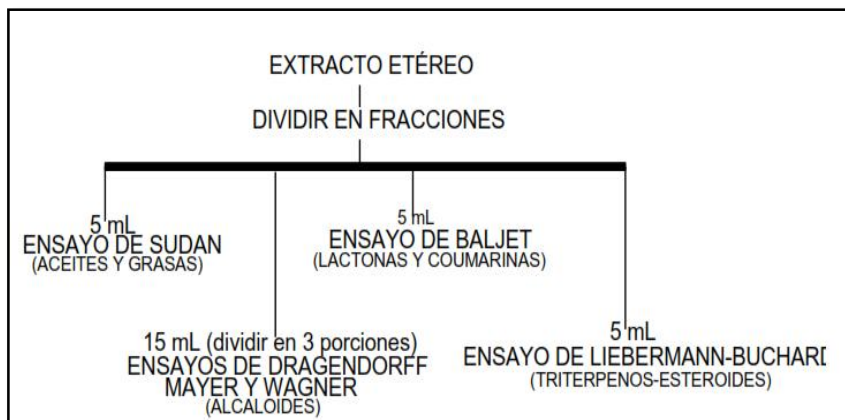


Figura 2- 5. Tamizaje fitoquímico con el extracto etéreo
Fuente: (Miranda, M. 2000).

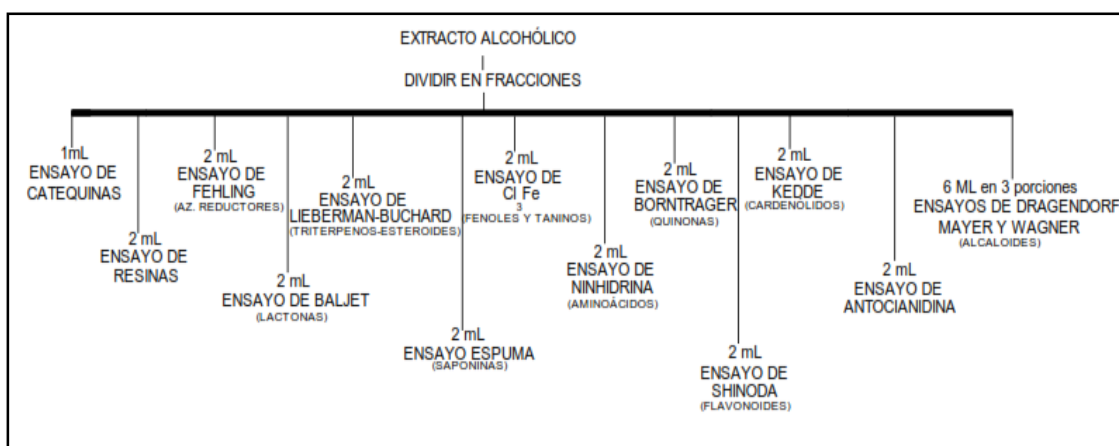


Figura 3- 4. Tamizaje fitoquímico con el extracto alcohólico
Fuente: (Miranda, M. 2000).



Figura 4- 4. Tamizaje fitoquímico con el extracto acuoso
Fuente: (Miranda, M. 2000).

2.7. Cromatografía en capa fina. (TLC)

Para determinar glicósidos flavónicos se siguieron dos procedimientos. En el primero se prepararon diferentes extractos en acetato de etilo, etanol al 96 % y agua destilada, para lo cual se pesaron 2 g de planta seca y pulverizada y se sonicaron con 10 mL de cada solvente durante 15 minutos, esto se realiza tanto para hojas como para flores. Se sembraron los extractos en fase estacionaria de sílica gel 60 con detector de fluorescencia a 254 nm y considerando la constante dieléctrica se preparan distintas fases móviles:

- Tolueno: acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua: metilisobutilcetona (3:3:0,5:0,5:1:4).
- Acetato de etilo: metilisobutilcetona: ácido fórmico: agua (50:30:1:1).
- Benceno: acetato de etilo: acetona (7:1:1).

Para la fase móvil Agua: n-butanol: acetona: ácido acético (16:2:2:1) se usó de fase estacionaria poliamida.

El segundo procedimiento se muestra en la Figura 5-2 en donde encontramos el análisis para glicósidos y agliconas y se lo realiza tanto para flores como para hojas.

Un gramo de materia seca y pulverizada se sometió a baño de agua a 60 °C, con 10 mL de metanol al 98 % durante 5 minutos, seguido de esto se procedió a sonicar durante 5 min y se filtró. A la fase metanólica se precipitó las clorofilas con igual cantidad de acetato de plomo al 4 %; de la fase metanólica sin clorofilas se sembró 20-30 µL en sílica gel 60 con indicador de fluorescencia a 254 nm, se eluyó con fase móvil de acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (100:11:11:26) y se observó en la lámpara UV tanto lejano como cercano. De la fase metanólica se tomaron las tres cuartas partes y se hidrolizaron con igual cantidad de ácido clorhídrico 2 N durante 2 horas a una temperatura de 80 °C. El extracto hidrolizado fue lavado 3 veces con acetato de etilo, 10 mL cada lavado, y se procedió a concentrar hasta ¼ del volumen inicial. Del extracto concentrado se sembró 20-30 µm en sílica gel 60 con indicador de fluorescencia a 254 nm, se eluyó con fase móvil de cloroformo: metanol: agua (40:9:1) y se observó en la lámpara UV tanto lejano como cercano.

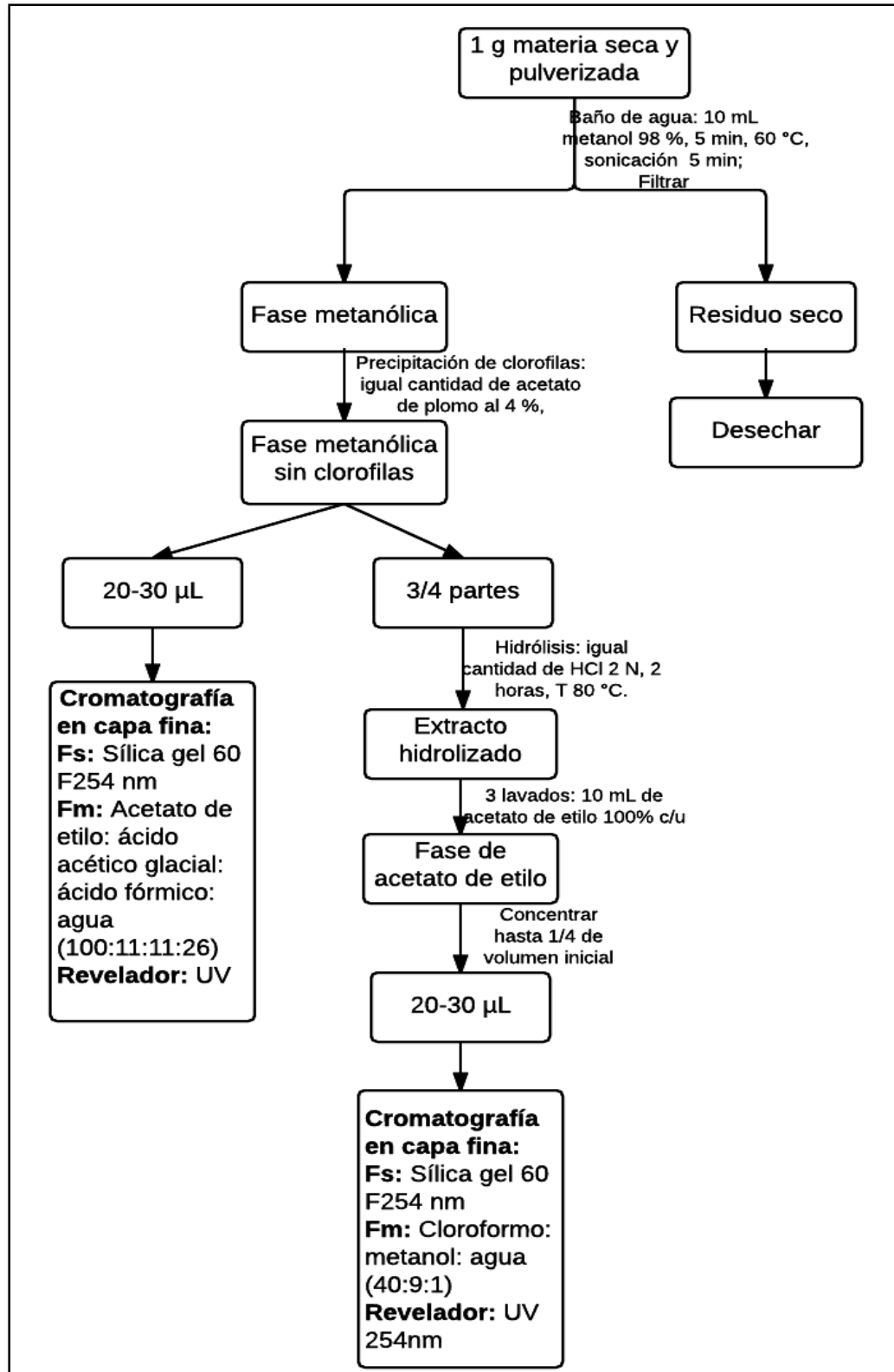


Figura 5- 5. Procedimiento para análisis por TLC

Elaborado por: Diana Paredes, 2016

Fuente: (Wagner, 2001)

2.8. Cuantificación de metabolitos secundarios

2.8.1. Preparación de extracto

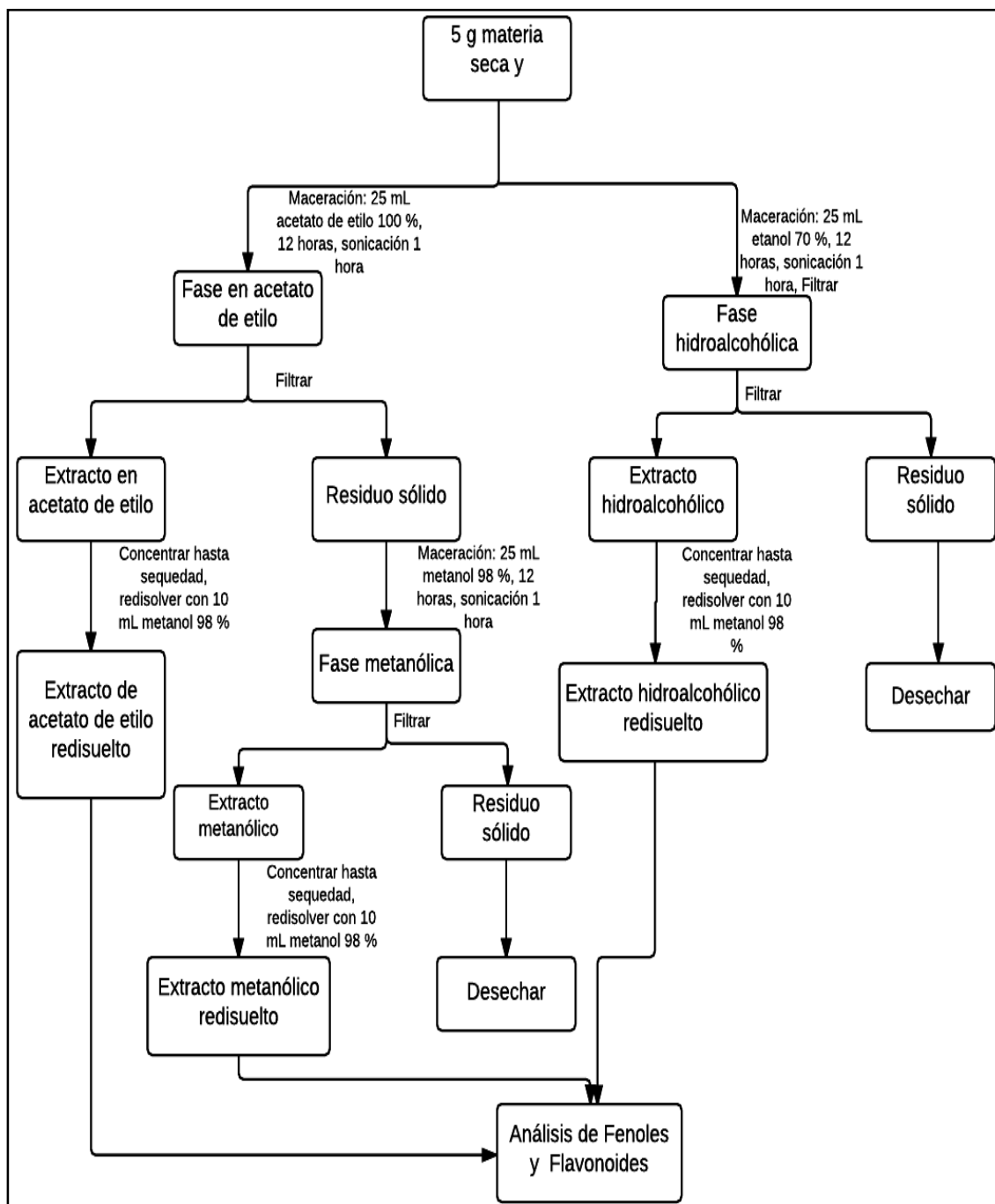


Figura 6- 6. Procedimiento para preparación de extractos para cuantificación de fenoles y flavonoides

Elaborado por: Diana Paredes, 2016

Para la cuantificación de metabolitos secundarios se prepararon tres extractos diferentes. Para el primero se pesaron 5g de materia seca y pulverizada y se maceró con 25 mL de acetato de etilo durante 12 horas, seguido de esto se sonicó durante 1 hora y se filtró. El extracto de acetato de etilo se concentró hasta sequedad. El residuo sólido sirvió como base para preparación del segundo extracto. Una vez que el residuo estuvo seco se le añadió 25 mL de metanol 98 % y se maceró durante 12 horas, seguido de esto se sonicó durante 1 hora y se filtró. El extracto metanólico se concentró hasta sequedad y el residuo sólido se desechó. Para preparar el tercer extracto se pesó 5g de materia seca y pulverizada y se maceró con 25 mL de etanol al 70 % durante 12 horas, seguido de esto se sonicó durante 1 hora y se filtró. El extracto hidroalcohólico se concentró hasta sequedad y el residuo sólido se desechó. Cada extracto seco se redisolvió con 10 mL de metanol 98 % a partir de los cuales se cuantificó tanto fenoles como flavonoides.

2.8.2. Cuantificación de fenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu

La siguiente metodología para cuantificación de fenoles se realizó tanto en hojas como en flores de *Passiflora mixta* y está basada en el estudio de Hua & Teik, 2012. La cuantificación se realizó por triplicado, para lo cual se preparó una curva de calibración con un estándar ácido gálico a concentraciones de: 20; 40; 60; 80 y 100 mg/L.

- Tomar 2 mL de muestra o estándar diluido
- Añadir 0,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu 20%
- Después de 5 minutos añadir 0,5 mL de solución de carbonato de sodio saturado (75 g/L)
- Inmediatamente añadir 5 mL de agua destilada
- Dejar reposar la mezcla por una hora bajo sombra a temperatura ambiente
- Efectuar las lecturas a una longitud de onda de 765 nm
- Trazar la curva de calibración (concentración vs absorbancia). (Anexo A)

Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 gramos de muestra seca.

2.8.3. Cuantificación de flavonoides totales

La siguiente metodología para cuantificación de flavonoides se realizó tanto en hojas como en flores de *Passiflora mixta* basada en la metodología de Boukhris, Simmonds, Sayadi, & Bouaziz, 2012, la misma que se realizó por triplicado.

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

- Tomar 1 mL de la muestra o estándar diluido
- Añadir 4 mL de agua destilada.
- A tiempo cero añadir 0,3 mL de NaNO₂ al 5 %.
- Después de 5 minutos añadir 0,3 mL de AlCl₃ al 10 %
- Esperar 6 minutos y añadir 2 mL de NaOH 1 M.
- Mezclar y dejar en reposo por 5 minutos a temperatura ambiente bajo sombra
- Leer la absorbancia de la mezcla caracterizada por un color rosado a 510 nm.
- Trazar la curva de calibración (concentración vs absorbancia) (Anexo B)

Los flavonoides totales se expresaron como miligramos equivalentes de quercetina (QE) por 100 gramos de muestra seca.

2.9 Análisis de flavonoides por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

El análisis HPLC requirió de una columna Supelco LC-18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm), con una fase móvil que consiste en una combinación de ácido fórmico 0,1%, acetonitrilo y metanol (60:16:24, v/v/v) a 30 ±1°C, con una velocidad de flujo de 1 mL/min. El volumen de inyección fue de 10 μL y la longitud de onda para la detección se mantuvo en 350 nm. La proporción de los componentes de la fase móvil fue tomada del estudio realizado por Chen, Kong, Song, Li & Jiang, Huidi en el año 2012. Todos los reactivos empleados presentaban grado HPLC.

2.9.1. Preparación de estándares

Se preparó una curva de calibración con una serie de soluciones estándares de luteolina, apigenina y quercetina diluidas en metanol grado HPLC con concentraciones de 10; 5; 1; 0,5 y 0,1 μL/mL. (Anexo C). Para lo cual se pesaron 5 mg de cada estándar y se diluyeron con 10 mL de metanol teniendo una solución madre de 500 ppm a partir de la cual se preparan las diluciones indicadas.

2.9.2. Preparación de la muestra

La Figura 7-2 detalla la preparación de la muestra tanto de hojas como de flores

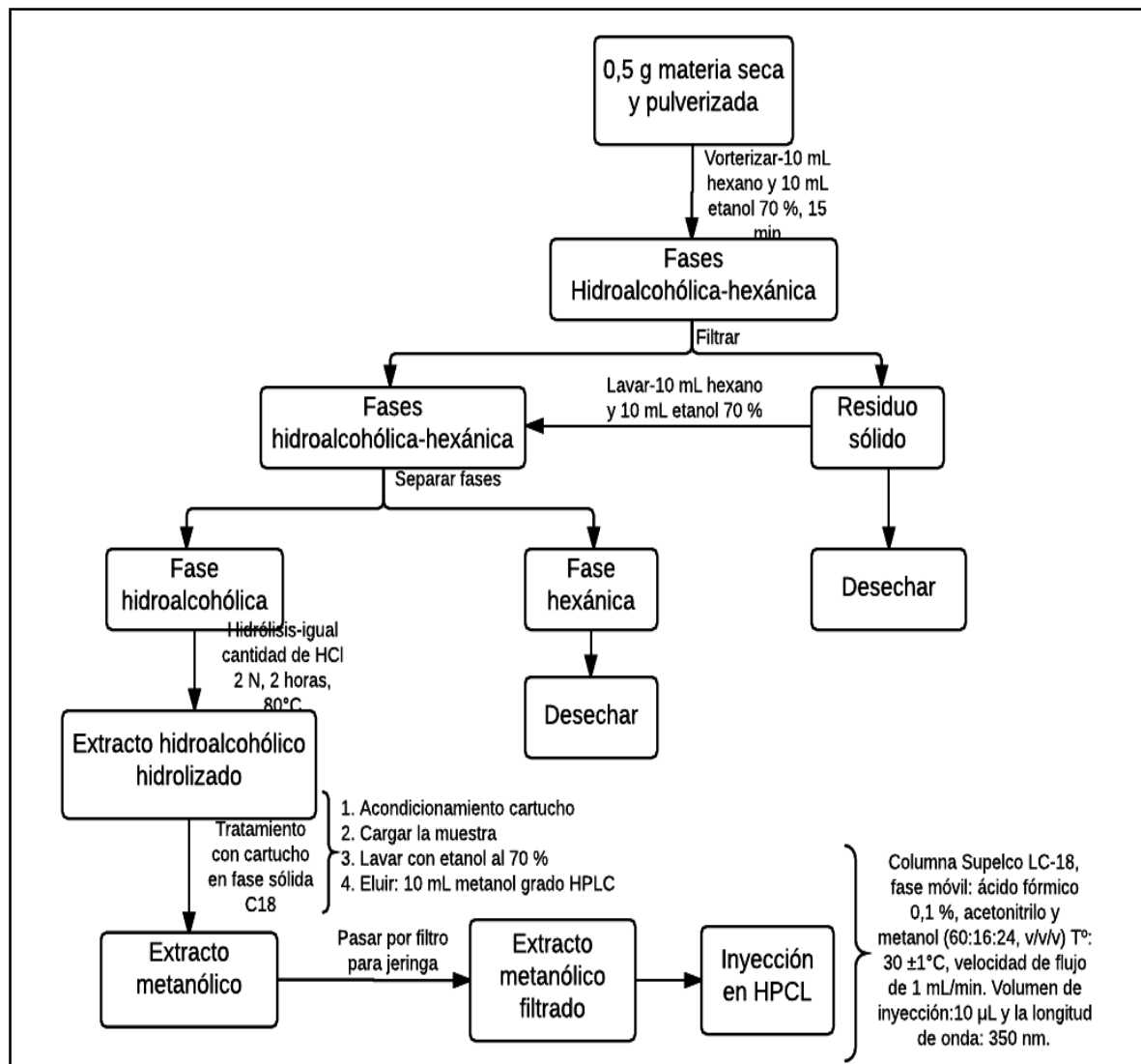


Figura 7- 7. Elaboración de extracto para análisis de HPLC

Elaborado por: Diana Paredes, 2016

Para preparar las muestras de hojas y flores para análisis de HPLC, se tomaron 0,5g de materia seca y pulverizada y se vortezizó con 10 mL de hexano y 10 mL de etanol al 70 % durante 15 minutos y se filtró. El residuo sólido se lavó con 10mL extras de hexano y etanol al 70 % y se desechó. El lavado se unió con las fases hidroalcohólica-hexánica obtenida del filtrado. Las fases se separaron y se conservó la fase hidroalcohólica, a la cual se sometió a hidrólisis con igual cantidad de HCl 2 N

durante 2 horas a 80 °C. El extracto hidrolizado fue tratado con cartucho en fase sólida C18, para lo cual se siguieron los siguientes pasos: 1) acondicionamiento del cartucho con metanol grado HPLC, 2) cargado el extracto en el cartucho, 3) lavado con etanol al 70 %, 4) elución con metanol grado HPLC, 5) el extracto metanólico eluido se pasó por un filtro para jeringa y el filtrado se inyectó en el HPLC con las condiciones descritas anteriormente.

2.10. Análisis de capacidad captadora de radicales libres

2.10.1. Preparación del extracto

Cinco gramos de materia seca se pulverizaron y maceraron con 25 mL de metanol 99,8 % durante 24 horas, seguido de esto se sonicó por 1 hora y se filtró. En un balón esmerilado previamente pesado se colocó el extracto metanólico filtrado, se concentró a sequedad y se pesó nuevamente. Se diluyó con 50 mL de metanol y se determinó la concentración. A partir de esta concentración conocida se prepararon 10 diluciones que van desde 100 hasta 4000 ppm a las cuales se analizaron su capacidad captadora de radicales libres.

2.10.2. Procedimiento

Como un estudio previo se determinó la cinética de reacción, para lo cual se prepararon, diluciones a 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 ppm. A las diluciones se midió su capacidad captadora de radicales libres mediante el proceso descrito a continuación y se midió la absorbancia luego de 30 minutos y 1 hora. Se graficó la curva de calibración y se observó la concentración a la que la absorbancia empieza a permanecer constante (Anexo E). En base a esto, se determinó el mejor tiempo de medición de los extractos y las concentraciones que formaron parte de la curva de calibración para determinar el IC₅₀

El análisis de la capacidad captadora de radicales libres se basó en un estudio realizado por Brand, Cuvelier, & Berset, 1995, que se muestra a continuación:

- Tomar 100 µL del extracto o blanco (metanol 98%)
- Se añade 3,9 mL de DPPH 60 µM.
- Dejar en reposo por 1 hora
- Medir las absorbancias a una $\lambda=515$ nm.
- Calcular el porcentaje de inhibición y el IC₅₀

2.10.3. Cálculos

La inhibición (IC50) del radical libre DPPH (IC50%) se calculó en porcentaje:

$$IC_{50\%} = \frac{\text{Ablanco} - \text{Amuestra}}{\text{Ablanco}} * 100$$

Donde

-Ablanco: es la absorbancia de la reacción de control (que contiene todos los reactivos excepto el extracto de ensayo),

-Amuestra: es la absorbancia del extracto de prueba.

La concentración del extracto de ensayo proporciona una inhibición del 50 % (IC₅₀, expresada en mg / ml) y se calculó a partir de la gráfica trazada entre porcentaje de inhibición vs la concentración del extracto.

$$IC_{50} = \frac{50 - \text{intercepto}}{\text{pendiente}}$$

Todas las pruebas se llevaron a cabo por triplicado.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentarán los resultados obtenidos de las pruebas y análisis realizados a hojas y flores de *P. mixta*, y su discusión en base a datos bibliográficos.

3.1. Control de calidad

Tabla 1- 5. Control de calidad de hojas y flores de *P. mixta*

Ensayo	Hojas (%)	Flores (%)	Límites de referencia Especificaciones USP # 28
Contenido de humedad	9,32 ± 0,015	10,34 ± 0,020	7-14%
Cenizas totales	7,29 ± 0,036	5,92 ± 0,025	12%
Cenizas solubles en agua	2,53 ± 0,030	2,34 ± 0,040	7%
Cenizas insolubles en HCl	1,24 ± 0,035	1,15 ± 0,035	5%

Elaborado por: Diana Paredes, 2016

Un exceso de agua en los materiales a base de hierbas fomentará el crecimiento microbiano, la presencia de hongos o insectos, y el deterioro después de la hidrólisis, por esta razón el análisis de humedad es de gran importancia. Los valores de humedad de la materia vegetal se encuentran dentro de los límites permitidos por la Especificaciones USP # 28, lo cual nos indican el correcto proceso de secado y almacenamiento de las hojas y flores de las plantas utilizadas en el proyecto de investigación.

Con el fin de medir la ceniza que permanece en la materia vegetal, luego de su tratamiento se utilizan tres diferentes métodos que miden cenizas totales, ceniza insoluble en ácido y cenizas solubles en agua. El método de cenizas totales mide la cantidad total de material restante luego del tratamiento, ya sea ceniza fisiológica que es derivada del propio tejido de la planta o la ceniza no fisiológica que es un residuo de materias extrañas ya sea arena o tierra que se van adhiriendo a la superficie de la planta. La ceniza soluble en agua nos brinda una idea de la cantidad de sales solubles en la materia vegetal. Las cenizas insolubles en ácido mide la cantidad de sílice presente, sobre todo en la arena y tierra silíceas. (WHO, 1998)

3.2. Análisis cualitativo

Tabla 2- 6. Tamizaje fitoquímico de hojas de *P. mixta*

PRUEBAS	TIPO DE METABOLITO	EXTRACTO ETÉREO	EXTRACTO ALCOHÓLICO	EXTRACTO ACUOSO
Sudán	Grasas	Positivo(++)	N/A	N/A
Dragendorff	Alcaloides	Negativo	Positivo(+)	Negativo
Wagner	Alcaloides	Negativo	Negativo	Negativo
Mayer	Alcaloides	Negativo	Negativo	Negativo
Baljet	Lactonas y coumarinas	Positivo(+++)	Positivo(+++)	N/A
Liebermann-Burchard	Triterpenos y esteroides	Positivo(+)	Positivo(+++)	Negativo
Catequinas	Catequinas	N/A	Negativo	N/A
Resinas	Resinas	N/A	Negativo	N/A
Fehling	Azúcares reductores	N/A	Positivo(+++)	Positivo(+)
Espuma	Saponinas	N/A	Negativo	Positivo(++)
Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	N/A	Positivo(++) Coloración verde intensa	Positivo(++) Coloración verde intensa
Boritrager	Quinonas	N/A	Positivo(+)	N/A
Antocianidina	Antocianidina	Negativo	Positivo(+++)	Negativo
Shinoda	Flavonoides	Negativo	Positivo(+++) Coloración amarilla	Positivo(++) Coloración amarilla
Mucílagos	Mucílagos	Negativo	Negativo	Negativo
Principios amargos		N/A	N/A	Positivo
Glucósidos cianogénicos		N/A	Negativo	N/A

+++ (Abundante); ++ (Moderado); + (escaso); N/A (No aplica)

Elaborado por: Diana Paredes, 2016

Tabla 3- 7. Tamizaje fitoquímico de flores de *P. mixta*

PRUEBAS	TIPO DE METABOLITO	EXTRACTO ETÉREO	EXTRACTO ALCOHÓLICO	EXTRACTO ACUOSO
Sudán	Grasas	Positivo (+++)	N/A	N/A
Dragendorff	Alcaloides	Negativo	Positivo (+)	Negativo
Wagner	Alcaloides	Negativo	Negativo	Negativo
Mayer	Alcaloides	Negativo	Negativo	Negativo
Baljet	Lactonas y coumarinas	Positivo (+)	Positivo (+++)	N/A
Liebermann-Burchard	Triterpenos y esteroides	Positivo (+++)	Positivo (+++)	Negativo
Catequinas	Catequinas	N/A	Positivo (+)	N/A
Resinas	Resinas	N/A	Negativo	N/A
Fehling	Azúcares reductores	N/A	Positivo (+++)	Positivo (++)
Espuma	Saponinas	N/A	Negativo	Positivo (++)
Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	N/A	Positivo (+++) Coloración verde intensa	Positivo (+++)
Bortrager	Quinonas	N/A	Positivo (+++)	N/A
Antocianidina	Antocianidina	Negativo	Positivo (+)	Negativo
Shinoda	Flavonoides	Negativo	Positivo (+++) Coloración roja	Positivo (+++) Coloración amarilla
Mucílagos	Mucílagos	Negativo	Negativo	Negativo
Principios amargos		N/A	N/A	Positivo (+)
Glucósidos cianogénicos		N/A	Positivo	N/A

+++ (Abundante); ++ (Moderado); + (escaso); N/A (No aplica)

Elaborado por: Diana Paredes, 2016

Tabla 4-3. Determinación del % de extracción de extractos de hojas y flores de *P. mixta*

Extractos	Hojas(%)	Flores (%)
Etéreo	44%	45%
Etanólico	40%	63,88%
Acuoso	37,5%	39%

Elaborado por: Diana Paredes, 2016

Tabla 5- 3. Determinación de sólidos totales de extractos de hojas y flores de *P. mixta*

Extractos	Hojas(mg/g)	Flores (mg/g)
Acetato de etilo	2,5±0,36	2,7±0,26
Metanólico	16,1±1,49	22,16±0,38
Acuoso	21,36±0,47	32,67±0,32

Elaborado por: Diana Paredes, 2016

El tamizaje fitoquímico de *P. mixta* muestra que posee similitud de metabolitos secundarios tanto en hojas como en flores, predominante la presencia de fenoles, cumarinas, triterpenos, flavonoides mientras que alcaloides solo da positivo para una prueba y se manifiesta de manera escasa en la misma, por lo cual no podemos asegurar con certeza su presencia en la especie. En bibliografía no se encuentra estudios que indiquen el tipo de metabolitos secundarios presentes en *P. mixta* por lo cual la bibliografía de referencia que se ha tomado para el análisis de resultados es el del género *Passiflora* en general y de especies de *Passifloras* específicas.

Según Carvajal y colaboradores, 2014 en su estudio de seis especies de *Passifloras* se obtuvo presencia de compuestos fenólicos, saponinas, triterpenos y alcaloides en las hojas, lo cual coincide notablemente con el tamizaje realizado en *P. mixta*. En la marcha fitoquímica para *P. quadrangularis* se analizaron únicamente las hojas de la planta contando con la presencia de compuestos fenólicos, leucoantocianidinas, saponinas, triterpenos y alcaloides. No se encontraron alcaloides en las hojas de *P. edulis* igual a lo publicado por Dhawan y col, 2002, pero si hay presencia positiva de flavonoides, por lo tanto el uso reportado, podría adjudicarse a efectos sedantes del tipo ansiolítico producidos por los flavonoides, en lugar de efectos alucinógenos debidos a la presencia de alcaloides.

Rodríguez y col. 2008, reportan en el resultado fitoquímico de *P. edulis* que es positivo en hojas y flores para flavonoides y compuestos fenólicos y se descarta la presencia de alcaloides, por lo cual podemos decir que la presencia de alcaloides depende en gran parte de la especie de *Passiflora* en estudio, por otra parte en el tamizaje de *P. mixta* solo existe presencia de alcaloides mediante la prueba

de Dragendorff y hay que tener presente que esta prueba no es selectiva para alcaloides sino que también puede detectar compuestos que contengan en su estructura nitrógeno, por lo cual hay la probabilidad de que sea un falso positivo.

3.3. Análisis de cromatografía en capa fina TLC

3.3.1 Determinación de glicósidos

Usando el primer procedimiento no se obtuvieron buenos resultados en la separación de compuestos ya que las placas se mostraban al UV lejano en forma de vela y no era posible medir los Rf. En algunas fases móviles los compuestos permanecían en el lugar de la siembra y no eluían, en especial en las placas de sílica, mientras que en la placa de poliamida los compuestos eluían hacia el frente del solvente. Por otra parte, usando el segundo procedimiento, se obtuvieron mejores resultados en cuanto a eficiencia, eficacia y resolución mostrando una separación de compuestos adecuada lo que permitió medir correctamente los Rf, como se muestra a continuación.

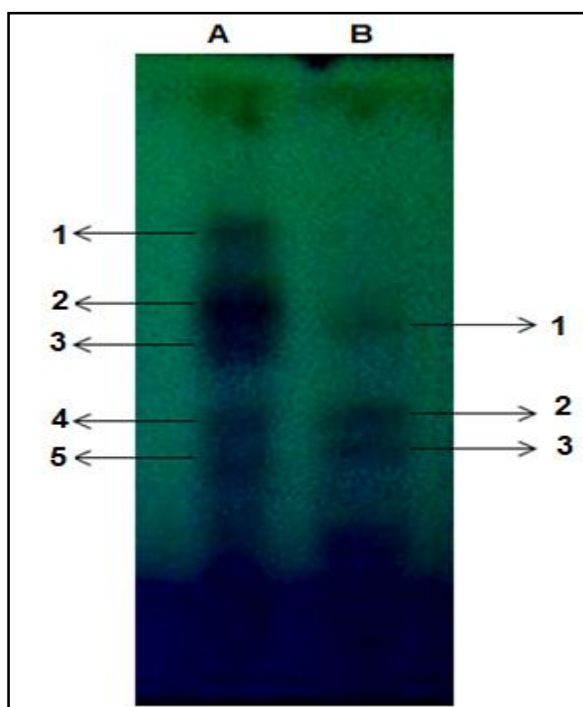


Figura 1- 6. Cromatografía del extracto metanólico para flavonoides de tipo glicósidos *de P. mixta* de hojas (A) y flores (B) vista a la lámpara UV cercano, en Fs: Sílica gel con indicador de fluorescencia a 254 nm, sílica gel matrix y Fm: acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (100:11:11:26)

Elaborado por: Diana Paredes, 2016

Tabla 6- 8. Medición de los Rf de TLC para glicósidos y comparación con referencias bibliográficas

Especie en estudio			Referencia bibliográfica	
Fase sólida: Sílica gel con indicador de fluorescencia a 254 nm, sílica gel matrix			(Wagner, 2001)	
Fase móvil: acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (100:11:11:26)				
	Compuesto	Rf	Compuesto	Rf
HOJAS	1	0,73	Isovitexina	0,51
	2	0,58	Vitexina	0,62
	3	0,51	Vitexina 2-o-glucósido	0,28
	4	0,38	Vitexina 1-ramnósido	0,37
	5	0,32	Isovitexina 2-o-ramnósido	0,37
FLORES	1	0,57	Orientina	0,57
	2	0,39	Isoorientina	0,46
	3	0,33		

Elaborado por: Diana Paredes, 2016

En la Tabla 6-3 se muestran los compuestos encontrados por Wagner, 2011 con sus respectivos Rf para el género *Passiflora*, de los cuales en la Figura 1-3 donde se observa la cromatografía en capa fina para glicósidos se encontraron 3 compuestos que coinciden con bibliografía; isovitexina, vitexina 1-ramnósido, isovitexina 2-O-ramnósido y orientina en hojas mientras que en flores los mismos compuestos con excepción de isovitexina. Hay que tener presente que no se puede asegurar al 100% que se trate de estos compuestos, debido a variaciones en las condiciones en que se realizó el estudio; además que TLC no es un método que nos permite determinar a ciencia cierta el tipo de compuestos presentes en extracto vegetal.

3.3.2 Determinación de agliconas

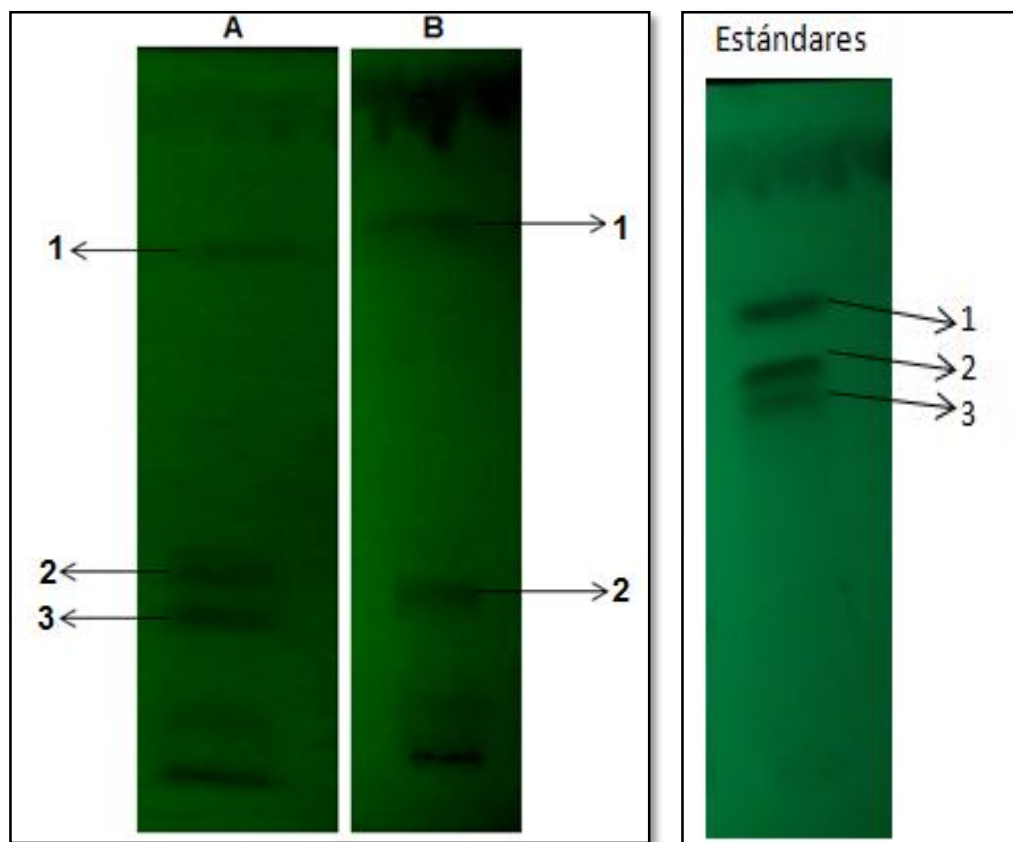


Figura 2- 6. Cromatografía en capa fina del compuesto etanólico hidrolizado de hojas (A) y flores (B) de *P. mixta* y estándares en UV λ corta = 254 nm

Elaborado por: Paredes, 2016

Fuente: Wagner, 2001

Tabla 7- 9. Medición de los Rf de TLC para agliconas y comparación con sus estándares

Fase sólida: Sílica gel con indicador de fluorescencia a 254 nm, sílica gel matrix					
Fase móvil: Cloroformo:metanol:agua(40:9:1)					
Revelador: UV λ corta = 254 nm					
Extractos de <i>P. mixta</i>			Estándares		
	Compuesto	Rf	Compuesto	Rf	
Hojas	1	0,74	Apigenina	0,73	
	2	0,31	Luteolina	0,64	
	3	0,22	Quercetina	0,59	
Flores	1	0,76			
	2	0,23			

Elaborado por: Diana Paredes, 2016

En la Figura 2-3 se observa la cromatografía en capa fina para agliconas, y sus respectivos estándares, de los cuales, en base al cálculo de sus Rf señalado en la Tabla 7-3, la presencia de apigenina es notoria en hojas mientras que en flores no es segura su presencia puesto que el Rf excede por 3 unidades al del estándar. Los compuestos 2 y 3 de hojas y 2 de flores podrían deberse a algún tipo de compuestos flavónicos no glicosilados. Pero no se puede asegurar al 100 % que se trate de estos compuestos.

3.4 Cuantificación de metabolitos secundarios

3.4.1 Cuantificación de fenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu

Tabla 8- 10. Cuantificación de fenoles totales en hojas y flores de *P. mixta*

EXTRACTOS	fenoles totales expresados como mg de ácido gálico/100 g de materia vegetal en HOJAS	fenoles totales expresados como mg de ácido gálico/100 g de materia vegetal en FLORES
Acetato de etilo	3305,556±254,588	1366,667±66,667
Metanol	3388,889±96,225	1944,444±50,918
Etanol 70% (Hidroalcohólico)	3777,778±346,944	2194,444±127,293

Elaborado por: Diana Paredes, 2016

La cuantificación de fenoles totales se realizó en base a la interpolación de datos en la curva de calibración de ácido gálico (Anexo A) que presentó una ecuación de: $y = 0,0006x + 0,061$ y un $R^2 = 0,9992$

La cantidad de fenoles encontrada en hojas es mayor a la encontrada en flores en todos los extractos, siendo el etanol al 70% el que extrajo mayor cantidad en hojas como en flores. En bibliografía encontramos una variedad de concentraciones de una misma especie, por ejemplo Marroquín, 2011 encontró 319,3 mg de ácido gálico/100g de extracto seco en *P. edulis* una cantidad mucho menor a lo encontrado en el extracto metanólico de hojas de *P. mixta* que presentó 3305,556mg de ácido gálico/100g de materia vegetal pero comparado con el estudio de Carvajal en 2011 la concentración de *P. mixta* es similar a *P. edulis* con 3148mg/100g. Marroquín además realizó extractos en diclorometano que posee una polaridad similar al acetato de etilo y presenta de igual manera una extracción menor que en metanol.

Cabrera, Sandoval & Forero, 2014 encontraron que los extractos a 70% de etanol elaborados a partir de hojas de *P. ligularis* alcanzaron la mayor concentración (1432 mg de ácido gálico/100g materia seca), estos extractos revelaron un mayor contenido de compuestos fenólicos, en comparación con los obtenidos a partir de flores, lo que coincide con los resultados obtenidos para *P. mixta*. La variación en la composición fenólica entre las especies es notoria, y esto podría deberse a diferencias genéticas, agronómicas y ambientales.

3.4.2 Cuantificación de flavonoides totales

Tabla 9- 11. Cuantificación de flavonoides totales en hojas y flores de *P. mixta*

EXTRACTOS	Flavonoides totales expresados como mg de Quercetina/100 g de materia vegetal en HOJAS	Flavonoides totales expresados como mg de Quercetina/100 g de materia vegetal en FLORES
Acetato de etilo	668,333±16,667	115,889±2,546
Metanol	2397,222±63,647	1203,333±16,667
Etanol 70% (Hidroalcohólico)	2605,556±63,647	1464,444±50,917

Elaborado por: Diana Paredes, 2016

La cuantificación de flavonoides se realizó en base a la interpolación de datos en la curva de calibración de quercetina (Anexo B) que presentó una ecuación de: $y = 0,0012x + 0,0218$ y un $R^2 = 0,9991$

Al igual como ocurrió con fenoles, la concentración de flavonoides en hojas es mayor que en flores y el mejor solvente de extracción es etanol al 70 %, que coincide con el estudio de Cabrera & Carvajal 2014. En el estudio de Marroquín 2011, las concentraciones de flavonoides de tres *Passifloras* van de 1100 a 2300 mg vitexina/100 g de material vegetal. Cabrera y Carvajal determinaron que la mayor concentración de flavonoides totales (1047 mg de vitexina/100 g materia seca) se encontró en los extractos con hojas utilizando etanol a 70 %, valores menores que los encontrados en *P. mixta*. Hay que considerar que las variaciones pueden deberse al tipo de estándar usado.

3.5 Análisis y cuantificación de flavonoides por HPLC

Tabla 10-3. Tiempos de retención (tR) de compuestos encontrados en flores y hojas, y sus estándares

	Quercetina (min)	Luteolina (min)	Apigenina (min)
Hojas	8,8	9,7	15,9
Flores	8,6	9,5	15,5
Estándar	8,6	9,2	15,1

Elaborado por: Diana Paredes, 2016

En base a los tiempos de retención resultantes en los ensayos de hojas y flores, (ver anexo D) se encontró que existe presencia de los tres estándares analizados. Siendo la quercetina el compuesto que aparece primero, con el menor tiempo de retención, seguido de luteolina y al final apigenina; estos datos guardan relación con los Rf de la cromatografía en capa fina, ya que el menor Rf presenta quercetina, seguido de luteolina y por último apigenina.

Tabla 11- 12. Cuantificación de flavonoides en hojas y en flores de *P. mixta* por HPLC

	Quercetina(mg/100g de materia vegetal)	Luteolina(mg/100g de materia vegetal)	Apigenina(mg/100g de materia vegetal)
Hojas	1,304±0,170	0,373±0,018	0,820±0,004
Flores	2,224±0,253	0,329±0,040	6,820±0,121

Elaborado por: Diana Paredes, 2016

La cuantificación se realiza en base a la interpolación en la curva de calibración de cada estándar (ver anexo C). Teniendo para apigenina: $y = 10,328x + 4,062$ y un $R^2 = 0,9933$; para luteolina: $y = 27,635x + 3,1617$ y un $R^2 = 0,9989$; y quercetina: $y = 6,1754x + 2,5719$ y un $R^2 = 0,9977$

La tabla 11-3 nos muestra la cuantificación de tres estándares flavónicos tipo agliconas en hojas como en flores de *P. mixta*. La presencia de apigenina es mayoritaria en flores mientras que quercetina se encuentra en mayor cantidad en hojas. En el estudio realizado por Zucolotto y col. 2015 se analiza flavonoides C-glicosilados en hojas en varias especies de *Passifloras*, donde se determina que el compuesto mayoritario en hojas es apigenina en comparación con luteolina, estos datos coinciden para flores de *P. mixta* pero no para hojas. Debemos tener en cuenta que la determinación del estudio

lo hace en compuestos glicosilados derivados de apigenina y luteolina, mientras que el presente estudio se determina directamente de las agliconas, varios factores como la capacidad de hidrólisis afectarían en gran manera los resultados.

3.6 Determinación de la actividad antioxidante

3.6.1 Determinación de la cinética de reacción

El Anexo E muestra la cinética de reacción del DPPH con el extracto metanólico de hojas luego de 30 minutos y una hora de haber iniciado la reacción. Se observa que en el extracto de hojas a partir de 1500 ppm, la absorbancia a 30 minutos permanece constante lo que significa que todo nuestro extracto ha reaccionado con el DPPH, lo mismo ocurre a una hora pero desde 1000 ppm. Por otra parte en el extracto de flores la reacción a 30 minutos finaliza a 3000 ppm y en una hora a 1500 ppm. A partir de esta consideración, se realizan las mediciones de las absorbancias en 1 hora para determinar el IC₅₀ y las diluciones consideradas para realizar la curva de calibración serán menores a estos valores.

3.6.2 Determinación del IC₅₀

Tabla 12- 13. Determinación del % de Inhibición y el IC₅₀

<i>P. mixta</i>			Estándar Ácido gálico	
Concentración µm/mL	%Inhibición Hojas	%Inhibición Flores	Concentración (µm/mL)	%Inhibición
100	24,205	13,364	10	11,811
200	36,457	25,478	20	23,446
400	52,843	44,293	40	46,892
600	74,617	63,525	60	68,295
800	89,394	76,358	80	89,609
IC ₅₀ (µm/mL)	361,167±2,742	479,445±1,428	IC ₅₀ (µm/mL)	43, 787±0,157

Elaborado por: Diana Paredes, 2016

La Tabla 12-3 indica que el IC₅₀ de hojas es menor que el de flores, eso nos quiere decir que el extracto metanólico de hojas tiene mejor capacidad captadora de radicales libres que el de flores. En bibliografía se encontró que los responsables de la actividad son polifenoles, y flavonoides lo cual guarda relación con la cantidad de éstos tanto en hojas como flores descritos anteriormente. Cabrera & Carvajal en 2011 determinan que *P. ligularis* presenta actividad antioxidante mayor en hojas que

en flores, lo que coincide con el presente estudio. El IC₅₀ de hojas para *P. mixta* es de 361,167±2,742 µm/mL que comparado el estudio de Marroquín, 2011 donde la actividad antioxidante de *P. edulis*, *P. ligularis* y *P. incarnata* va de 1,65-4,96 mg/ml podemos decir que *P. mixta* tiene una mejor capacidad captadora de radicales libres, con respecto a *estas especie*, pero hay dar a notar que los métodos empleados para la determinación son diferentes y las condiciones no son las mismas. Por esta razón se ha determinado la capacidad captadora de radicales libres también del estándar de ácido gálico en base a la ecuación de la curva de calibración (Anexo F), en donde el IC₅₀ encontrado fue de 43,787±0,157 µm/mL que es significativamente menor al de *P. mixta*, pero hay que considerar también en esta comparación que el estándar es una sustancia pura, mientras que los extractos de hojas y flores son sustancias con una mezcla de varios compuestos.

CONCLUSIONES

- Se determinó que la muestra analizada de la especie *P. mixta* cumple con los parámetros de calidad establecidos en la USP#28, lo que la hace apta para su estudio.

- En la identificación de metabolitos secundarios mediante tamizaje fitoquímico se determinó la presencia de compuestos de interés como son fenoles y flavonoides, a más de otros como lactonas, cumarinas, triterpenos, antocianidinas y azúcares reductores.
- Se identificó mediante cromatografía en capa fina la posible presencia de isovitexina, vitexina 1-ramnósido, isovitexina 2-O-ramnósido y orientina en el extracto metanólico de hojas, mientras que en flores los mismos compuestos con excepción de isovitexina. En el extracto hidrolizado de hojas se identificó la posible presencia de apigenina.
- Se cuantificó mediante espectrofotometría fenoles y flavonoides determinando que el extracto hidroalcohólico de hojas ($3777,778 \pm 346,944$ mg Eq de ácido gálico/100 g de planta) es el que posee mayor cantidad de fenoles mientras que el extracto de acetato de etilo de flores el que menos cantidad posee ($1366,667 \pm 66,667$ mg Eq de ácido gálico/100 g de planta). Lo mismo ocurre con flavonoides siendo la mayor cantidad $2605,556 \pm 63,647$ mg Eq de quercetina/100 g de planta en extracto hidroalcohólico de hojas y la menor $115,889 \pm 2,546$ mg Eq de quercetina/100 g de planta en extracto de acetato de etilo de flores.
- Mediante cromatografía líquida de alta eficiencia se cuantificó en hojas y flores apigenina, luteolina y quercetina determinando que el extracto hidrolizado de flores posee mayor cantidad de apigenina ($6,820 \pm 0,121$ mg/100 g de planta), pero la menor cantidad de luteolina ($0,329 \pm 0,040$ mg/100 g de planta), comparadas con el extracto hidrolizado de hojas, que presenta mayor cantidad de quercetina ($1,304 \pm 0,170$ mg/100 g de planta), y menor de luteolina ($0,373 \pm 0,018$ mg/100 g de planta)
- Se evaluó la capacidad captadora de radicales libres en el extracto metanólico de hojas obteniendo un IC_{50} de $361,167 \pm 2,742$ μ g/mL y en el extracto metanólico de flores un IC_{50} de $479,445 \pm 1,428$ μ g/mL

RECOMENDACIONES

- Se recomienda que el análisis espectroscópico de fenoles y flavonoides se respete en gran manera los tiempos indicados ya que una pequeña variación afectaría el resultado final. Así

también el uso de los estándares en especial quercetina debe realizarse protegiendo de la luz para evitar su degradación.

- Se recomienda realizar un estudio sobre la capacidad captadora de radicales libres *in vivo* de *P. mixta*, para comparar con los resultados obtenidos en el presente estudio.
- Debido a las propiedades psicoactivas de la familia *Passifloraceae* sería de gran interés que se evalúe la actividad ansiolítica de *P. mixta*.
- Se debería realizar un estudio sobre fraccionamiento de extractos de flores y hojas de *P. mixta* e identificación de compuestos por espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ABU-YOUSIF, A; SMITH, K; GETSIOS, S.** "Enhancement of UVB-Induced Apoptosis by Apigenin in Human Keratinocytes and Organotypic Keratinocyte Cultures". *Cancer Research* [en línea], 2008, (United States of America) 68(8), pp. 3057-3065[Consulta: 18 enero 2016]. ISSN 18413777. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18413777>
2. **ACOSTA, M., QUINTANA, J., & MANCÍAS, M.** "Retos tecnológicos para un diagnóstico actual por el laboratorio: Estrés oxidativo en pediatría" *Humanidades Médicas*. [en línea], 2006,(Cuba) 6(3) [Consulta: 20 septiembre 2015]. ISSN 1727-8120. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1727-81202006000300003&script=sci_arttext
3. **ARRAIZA, M.** *Uso Industrial de Plantas Aromáticas y Medicinales* [en línea] Madrid: 24 marzo 2010 [Consulta: 14 enero 2016]. Disponible en <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema6.pdf>
4. **ARTRICENTER.** *20 cosas que deberías saber sobre los fitomedicamentos* [blog]. 7 marzo, 2013. [6 septiembre 2015]. Disponible en: <http://artricenter.org/2013/03/07/20-cosas-que-deberias-saber-sobre-los-fitomedicamentos/>
5. **AVELLO, M., & SUWALSKY, M.** "Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección". *Atenea* [en línea], 2006, (Chile) n 494, pp 161-172. [Consulta: 29 septiembre 2015]. ISSN 0718-0462. Disponible en http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-04622006000200010&script=sci_arttext
6. **BRAND, W; CUVELIER, M; BERSET, C.** "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity". *LWT - Food Science and Technology*[en línea], 1995, (Francia), 28(1), pp 25-30 [Consulta: 27 septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643895800085>
7. **CABRERA, S; SANDOVAL, A; FORERO, F** " Potencial antioxidante y antimicrobiano de extractos acuosos e hidroalcohólicos de granadilla (*Passiflora ligularis*)". *Acta Agronómica*[en línea],2014,(Colombia) 63(3),pp 204-211 [Consulta:20 enero 2016]. ISSN 0120-2812. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28122014000300002&lng=es&nrm=iso&tlng=es

8. **CALDERÓN, J., BURGOS, E., PÉREZ, C., & LÓPEZ, M.** "A review on the dietary flavonoid kaempferol". *Mini Rev Med Chem*[en línea],2011, 11(4), pp 298-344 [Consulta:18 enero 2016]. ISSN 21428901. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21428901>
9. **CAMPS, D.** *Bioquímica del estrés oxidativo* [en línea]. Córdoba-Argentina, Lulu, 2010. [Consulta:7 enero 2016] pp 51-56. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=QcELAgAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Bioqu%C3%ADmica+del+estr%C3%A9s+oxidativo&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiG5c2qtMvKAhVB6SYKHQFjDQ4Q6AEIGjAA#v=onepage&q=Bioqu%C3%ADmica%20del%20estr%C3%A9s%20oxidativo&f=false>
10. **CARVAJAL, L; TURBAY, S; ROJANO, B & COL.** "Algunas especies de Passiflora y su capacidad antioxidante". *Revista Cubana de Plantas Medicinales*[en línea], 2011, 16(4), pp 354-363. [Consulta:20 enero 2016] ISSN 1028-4796. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962011000400007
11. **CARVAJAL, L; TURBAY, S; & ÁLVAREZ, L.** "Propiedades Funcionales Y Nutricionales De Seis Especies De Passiflora (Passifloraceae) del Departamento de Huila, Colombia" *Caldasia* [en línea], 2014, (Colombia),36(1), pp 1-15. [Consulta:8 noviembre 2015]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/24126/1/21243-205833-1-PB.pdf>
12. **CEA, R.** *Fitofármacos* [en línea].El Salvador: Nelson Alfaro, 2013. [Consulta: 26 septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.dbbe.fcen.uba.ar/contenido/objetos/Cea2013.pdf>
13. **CHEN y col.** "Pharmacokinetic study of luteolin, apigenin, chrysoeriol and diosmetin after oral administration of Flos Chrysanthemi extract in rats". *Fitoterapia*[en línea], 2012, 86: pp. 1616-1622. [Consulta:25 septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X12002584>
14. **DA SILVA, J; BETIM, C; COLOMEU, T; & COL.** "Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (Passiflora edulis) leaves: In vitro and in vivo study" *Food Research International* [en línea]. 2013, (Brazil),53(2),pp 882–890. [Consulta:25 septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996913000033>
15. **DE MIGUEL, A.** *Reacciones adversas medicamentosas.* [en línea].2013. [Consulta 29 septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.uv.es/derma/CLindex/CLtoxicodermias/CLtoxicodermias.htm>

16. **DHAWAN, K., & KUMAR, A.** "Comparative anxiolytic activity profile of various preparations of *Passiflora incarnata* linneaus: a comment on medicinal plants standardization". *J Altern Complement Med* [en línea], 2002, 8(3):283-291. [Consulta: 8 noviembre 2015] ISSN 12165186. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12165186>
17. **GARCÍA, M.** *Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales*. 2007. [Consulta: 25 septiembre 2015] Disponible en: http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava.pdf
18. **GARRIDO, A.** *El peróxido de hidrógeno como mediador en el proceso de contracción-relajación. Estudios in vitro eiIn vivo* (Tesis doctoral). Universidad de Alcalá, 2007. pp 14
19. **HERNÁNDEZ, A., & BERNAL, R.** "Lista de Especies de Passifloraceae de Colombia". *Biota colombiana* [en línea], 2000, (Colombia), 1(3), pp 320-335. [Consulta: 29 septiembre 2015] ISSN 0124-5376. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/491/49110302.pdf>
20. **SHAO-HUA, H; LEAN-TEIK, N.** "Quantidication of polyphenolic content and bioactive constituents of some commercial rice varieties in Taiwan". *Journal of food composition and Analysis* [en línea], 2012, (China), 26(1-2), pp 122-127. [Consulta: 29 septiembre 2015] Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157512000506>
21. **KAMALDEEP, D., SANJU, D., & ANUPAM, S.** "Passiflora: a review update". *Journal of Ethnopharmacology* [en línea] 2004, (India), 94(1), pp 1-23. R[Consulta: 29 septiembre 2015] Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874104000856>
22. **MARROQUÍN, M.** *Comparación de la Actividad Antioxidante, Detección y Cuantificación de Flavonoides y Compuestos Fenólicos en tres Especies de la Familia Passifloracea (Passiflora edulis, Passiflora incarnata, Passiflora ligularis)*. (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. 2011. pp. 38-41
23. **MARYLAND, U.** *Passionflower*. [en línea] United States of America, 26 junio 2014. [Consulta: 29 septiembre 2015. Disponible en: <https://umm.edu/health/medical/altmed/herb/passionflower>
24. **MENDOZA, N.** *Farmacología Médica* [en línea]. México: Editorial Médica Panamericana, 2008 . [Consulta: 19 enero 2016. Disponible en: [https://books.google.com.ec/books?id=EUBNE4Y0v9sC&printsec=frontcover&dq=Mendoza,+N.+\(2008\).+Farmacolog%C3%ADa+M%C3%A9dica+.+M%C3%A9xico:+Editorial+M%C3%A9dica+Panamericana+.&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjs5Mme08vKAhWC3SYKHSWaBXs](https://books.google.com.ec/books?id=EUBNE4Y0v9sC&printsec=frontcover&dq=Mendoza,+N.+(2008).+Farmacolog%C3%ADa+M%C3%A9dica+.+M%C3%A9xico:+Editorial+M%C3%A9dica+Panamericana+.&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjs5Mme08vKAhWC3SYKHSWaBXs)

Q6AEIzAA#v=onpage&q=Mendoza%2C%20N.%20(2008).%20Farmacolog%C3%ADa%20M%C3%A9dica%20.%20M%C3%A9xico%3A%20Editorial%20M%C3%A9dica%20Panamericana%20.&f=false

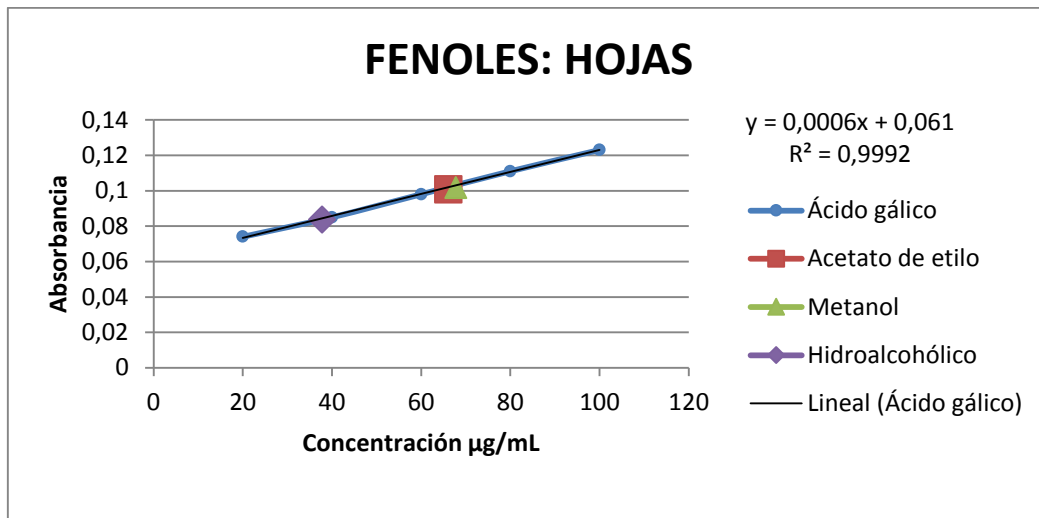
25. **MIRANDA, M.** *Farmacognosia y Productos naturales*. Habana, (2000).
26. **NAVARRO, R.** *¿Que es la oxidación?* [en línea] 2015 [Consulta: 29 septiembre 2015] Disponible en: <http://www.maxenespanol.com/docs/Que%20es%20la%20oxidacion.pdf>
27. **NÚÑEZ, A.** "Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades". Revista *Cubana de Salud Pública* [en línea], 2011, (Cuba), 37(5), pp 644-660. [Consulta: 29 septiembre 2015] ISSN 0864-3466.. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662011000500013
28. **OMS.** *Formulario Modelo de la OMS 2004*, [en línea]. 2004. [Consulta: 27 septiembre 2015]. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js5422s/4.4.html>
29. **OMS.** *Cáncer*. [en línea]. febrero 2015. [Consulta: 29 septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
30. **PEREZ-VIZCAINO, F; DUARTE, J; JIMENEZ, R; & col.** "Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin". *Pharmacol Rep* [en línea]. 2009, 61(1), pp 67-75. [Consulta: 18 enero 2016] ISSN 19307694. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19307694>
31. **PRIETO, S., GARRIDO, G., GONZÁLEZ, J. & COL** "Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria". *CENIC* [en línea]. 2004, (Cuba), 35(1), pp 19-36. [Consulta: 29 septiembre 2015] ISSN: 0253-5688 Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181226086004.pdf>
32. **PRIMOT, S & col.** "Variación morfológica de tres especies de curubas (*Passiflora tripartita* var.mollissima, *P. tarminiana* y *P. mixta*) y sus híbridos en el Valle del Cauca(Colombia)" [en línea]. 2005, (Colombia), 27(3), pp 467-471. [Consulta: 30 septiembre 2015] ISSN: 1806-9967. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-29452005000300030&script=sci_arttext
33. **PROVENSI, G.** *Investigación de actividad ansiolítica de *Passiflora alata* Curtis (PASSIFLORACEAE)*.(Tesis de maestría). Universidad Federal de Río Grande del Sur, Porto Alegre, 2007. pp 38-44

34. **PUCHOL, D.** *Los trastornos de ansiedad: la epidemia silenciosa del siglo XXI* [en línea]. Valencia, España, 29 septiembre 2003. [Consulta: 20 septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.psicologiacientifica.com/trastornos-de-ansiedad-epidemia/>
35. **REYES, A.** *Antioxidantes: la magia de lo natural*. [en línea]. 2013. [Consulta: 29 septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.eumed.net/rev/tlatemoani/08/rgc.html>
36. **RODRIGUEZ, L., REYES, S., & BURCHIEL, D.** "Risks and benefits of commonly used herbal medicine in Mexico". *Toxicology and Applied pharmacology* [en línea]. 2008; 227(1): pp 125–135 [Consulta: 30 septiembre 2015] ISSN: 2322858. Disponible en : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2322858/>
37. **RUDNICKI, M.** "Antioxidant and antiglycation properties of Passiflora alata and Passiflora edulis extracts" *Food chemistry* [en línea], 2007, (Brazil), 100(2): pp 719-724. [Consulta: 30 septiembre 2015] ISSN: 2322858. Disponible en : https://www.researchgate.net/publication/216711524_Antioxidant_and_antiglycation_properties_of_Passiflora_alata_and_Passiflora_edulis_extracts
38. **SANJINÉS, A., ØLLGAARD, B., & BALSLEV, H.** "Frutos comestibles" *Botánica Económica de los Andes Centrales* [en línea], 2006, (Bolivia), pp 329-346. [Consulta: 29 septiembre 2015], Disponible en: <http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2021.pdf>
39. **SHANMUGAM, S., KARUPPUSAMY, A., & THANGARAJ, P.** "Antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic effects of polyphenols from Passiflora subpeltata leaves – A promising species of Passiflora". *Industrial Crops and Products* [en línea] 2014, 54: pp 54:272–280. [Consulta: 20 enero 2016], Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/260314831_Antioxidant_analgesic_anti-inflammatory_and_antipyretic_effects_of_polyphenols_from_Passiflora_subpeltata_leaves_-_A_promising_species_of_Passiflora
40. **TAIZ, L., & ZEIGER, E.** *Fisiología vegetal*. [en línea]. Castelló de la Plana- España: Publicacions de la Universitat Jaume I, 2006. [Consulta: 12 enero 2016], Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=7QIbYg-OC5AC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

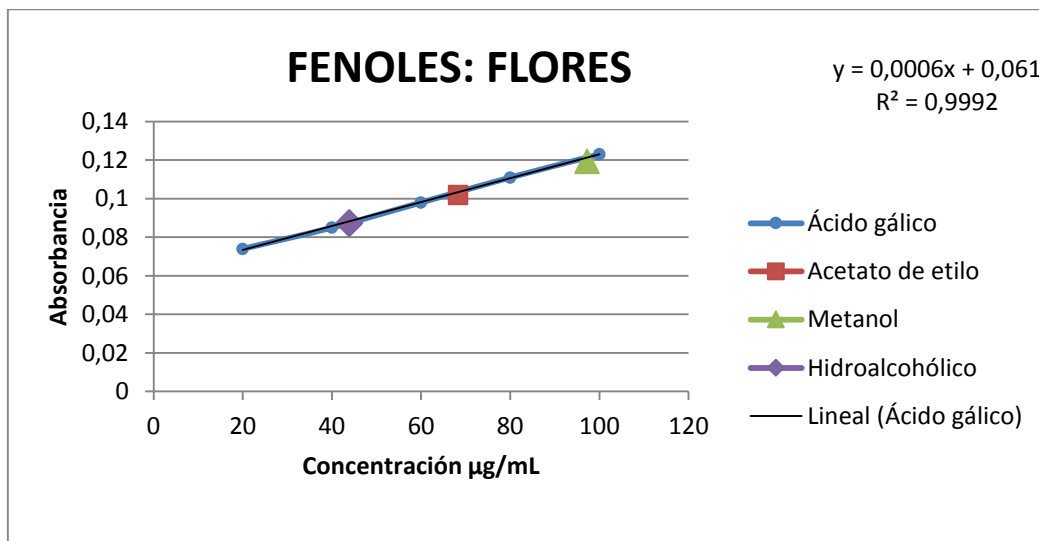
41. **WAGNER, H.** *Plant Drug Analysis*. 2da ed. Munich: Springer. 2001. pp 230-231
42. **WHO.** *Updated edition of Quality control methods for medicinal plant materials*. [en línea], 1998, [Consulta: 14 enero 2016], Disponible en <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/h1791e/h1791e.pdf>
43. **ZAFORTEZA, C.** *Ansiolíticos e Hipnóticos*. [en línea], 2007, [Consulta: 22 septiembre 2015], Disponible en <http://ocw.uib.es/ocw/infermeria/farmacologia/m3-tema3>
44. **ZANOLI, P., AVALLONE, R., & BARALD, M.** "Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin". *Fitoterapia* [en línea], 2000, *71(1)*, pp 117-123. [Consulta: 20 enero 2016] ISSN: 10930722. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10930722>
45. **ZUCOLOTTO, S., FAGUNDES, C., & REGINATTO, F.** "Analysis of C-glycosyl Flavonoids from South American Passiflora Species by HPLC-DAD and HPLC-MS". *Phytochemical Analysis* [en línea], 2012, (Brasil), *23(3)*: pp: 232-239. [Consulta: 21 enero 2016] Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/51587681_Analysis_of_c-glycosyl_flavonoids_from_South_American_Passiflora_species_by_HPLC-DAD_and_HPLC-MS_Phytochem_Anal

ANEXOS

ANEXO A. Curvas de calibración de ácido gálico para cuantificación de fenoles en hojas y flores de *P.mixta*

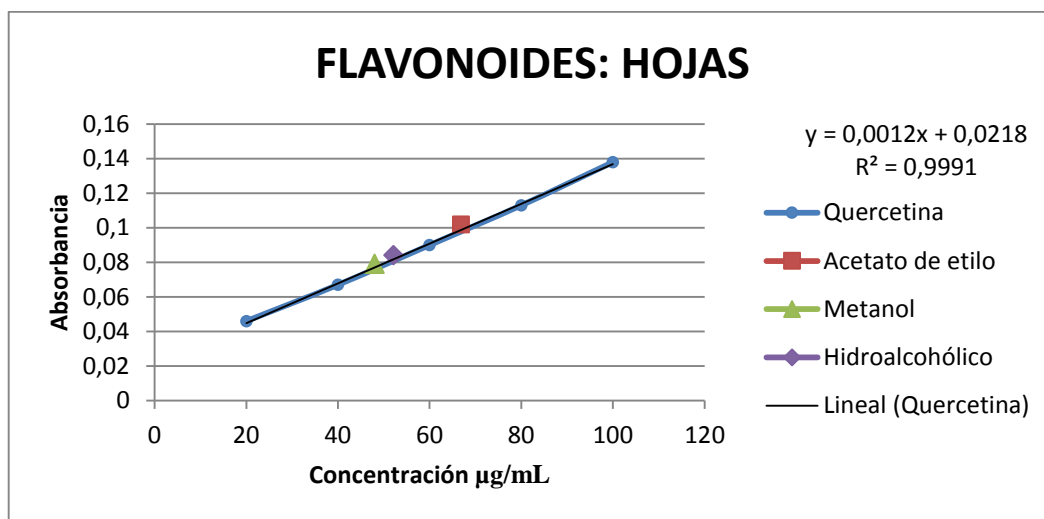


Elaborado por: Diana Paredes, 2016

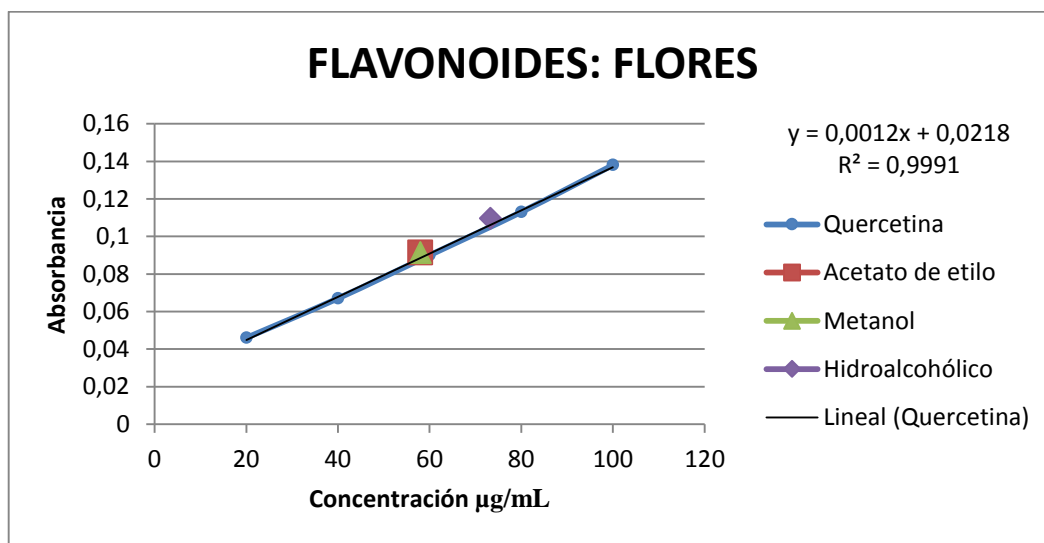


Elaborado por: Diana Paredes, 2016

ANEXO B. Curvas de calibración de quercetina para cuantificación de flavonoides en hojas y flores de *P. mixta*

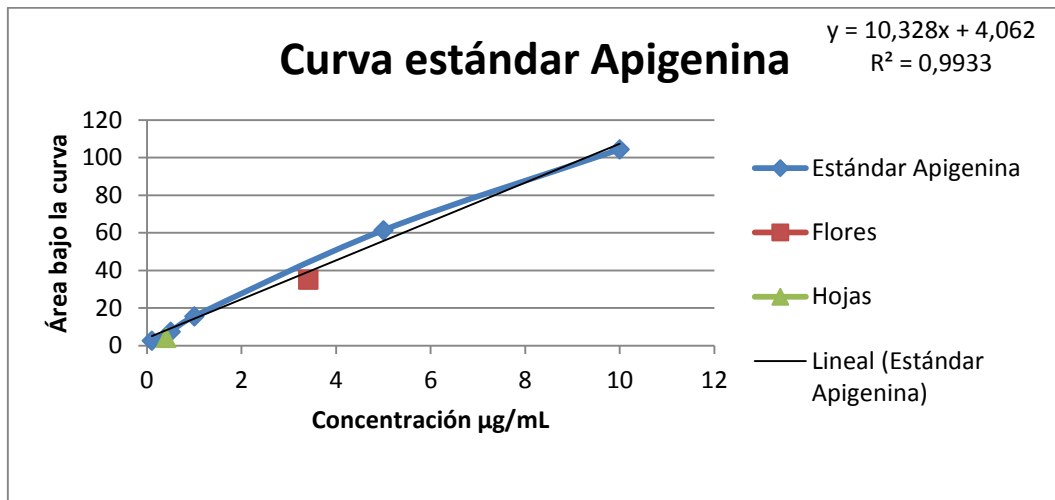


Elaborado por: Diana Paredes, 2016

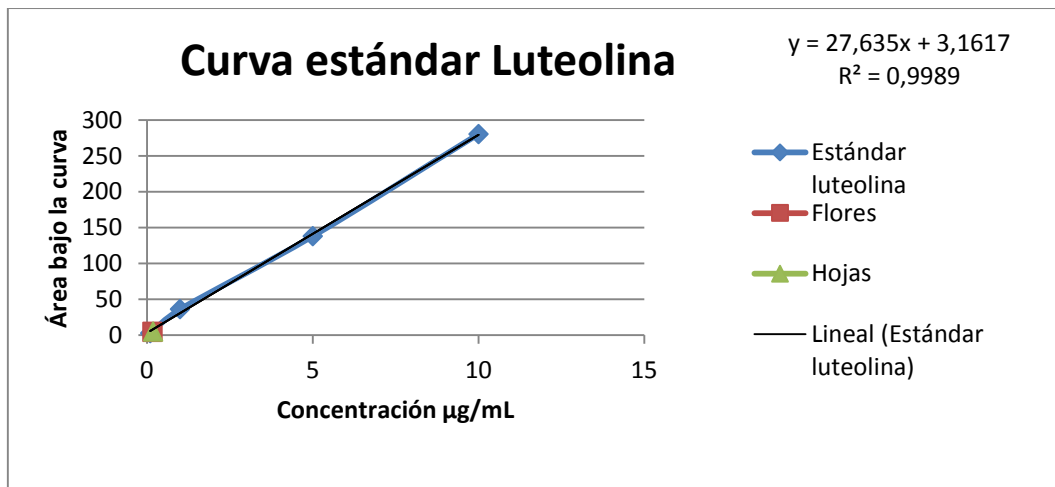


Elaborado por: Diana Paredes, 2016

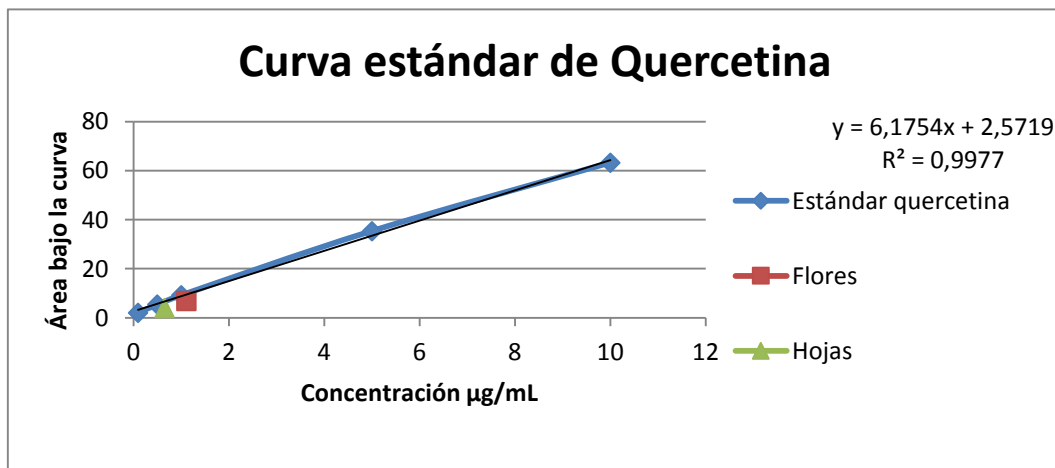
ANEXO C. Curvas de calibración de Apigenina, Luteolina y Quercetina para su cuantificación por HPLC en hojas y flores de *P. mixta*



Elaborado por: Diana Paredes, 2016

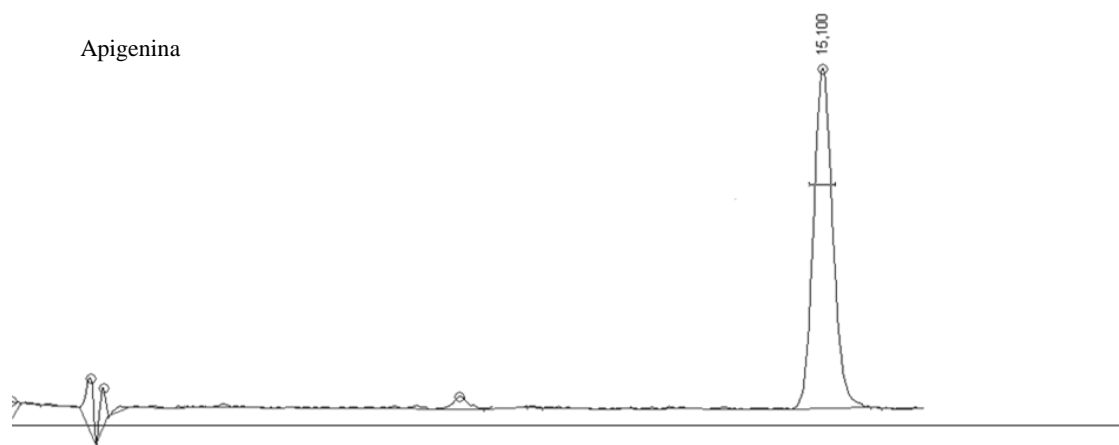
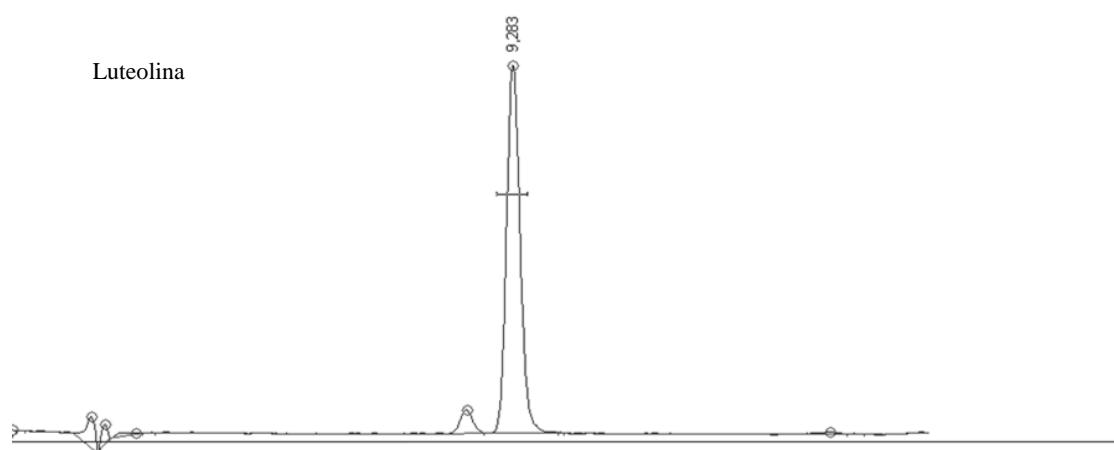
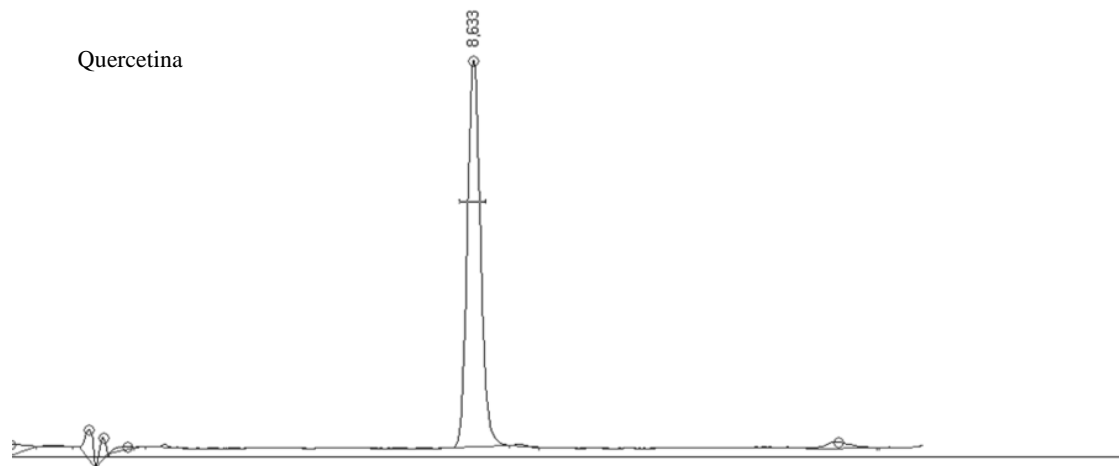


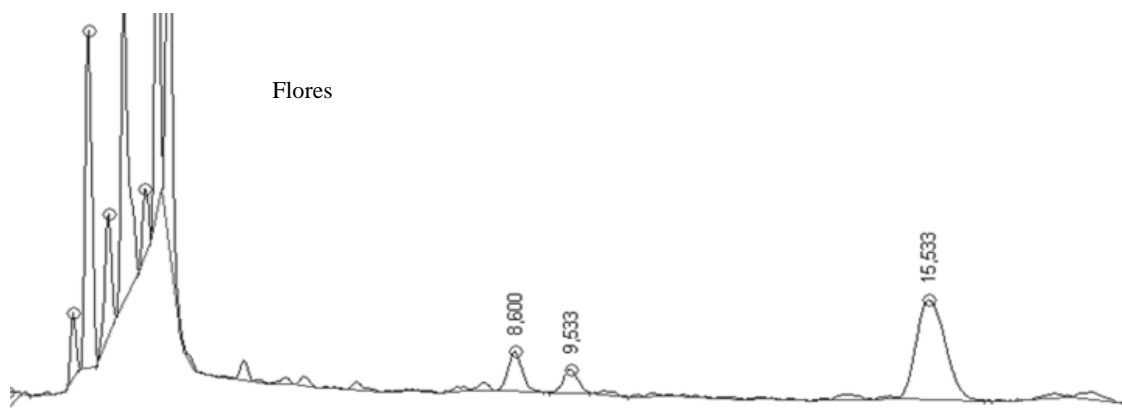
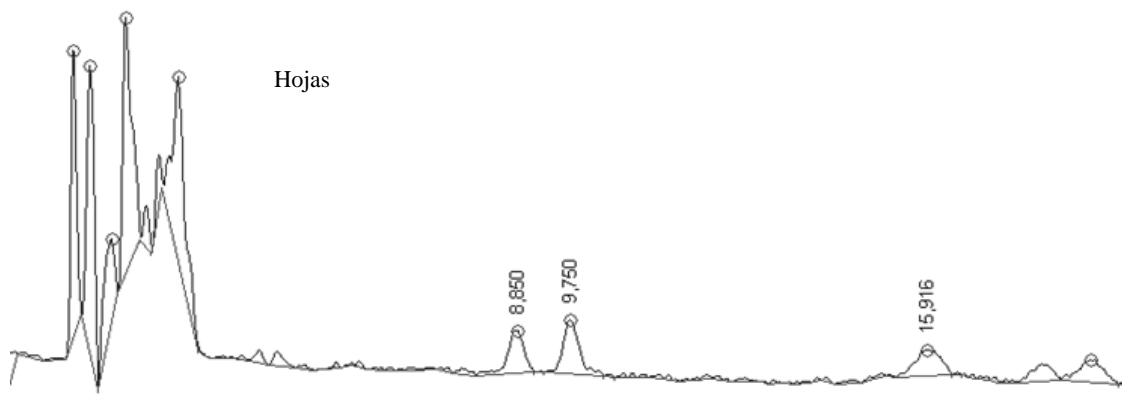
Elaborado por: Diana Paredes, 2016



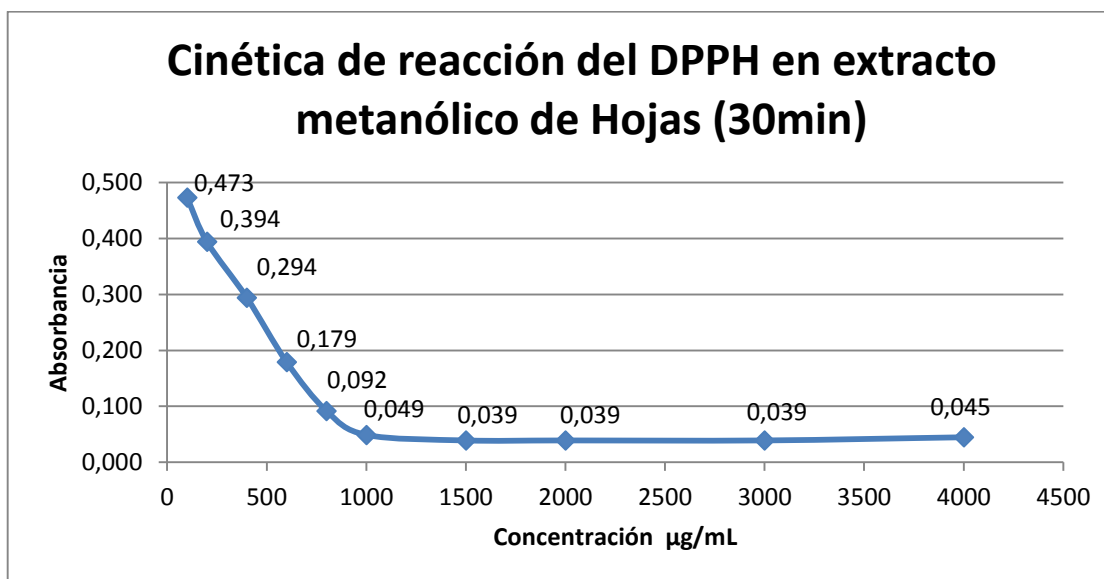
Elaborado por: Diana Paredes, 2016

ANEXO D. Cromatogramas de estándares y muestras



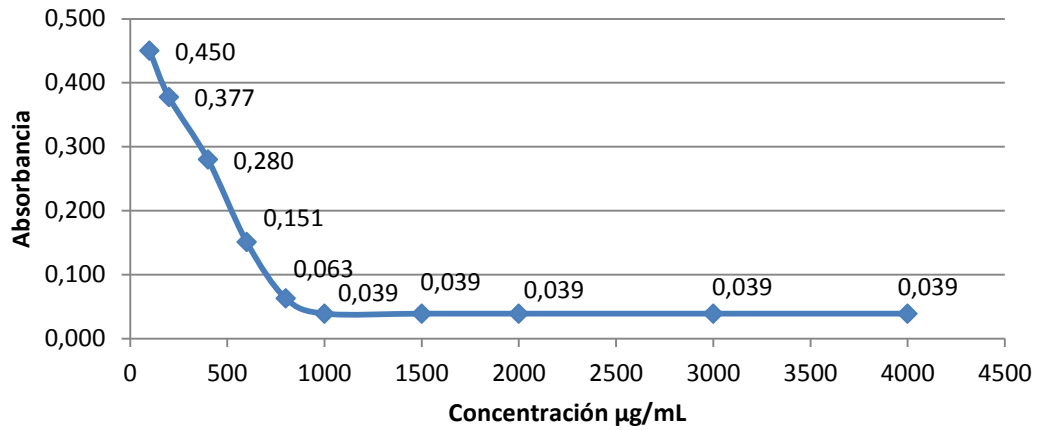


ANEXO E. Cinética de reacción de extractos metanólicos de flores y hojas de *P.mixta*



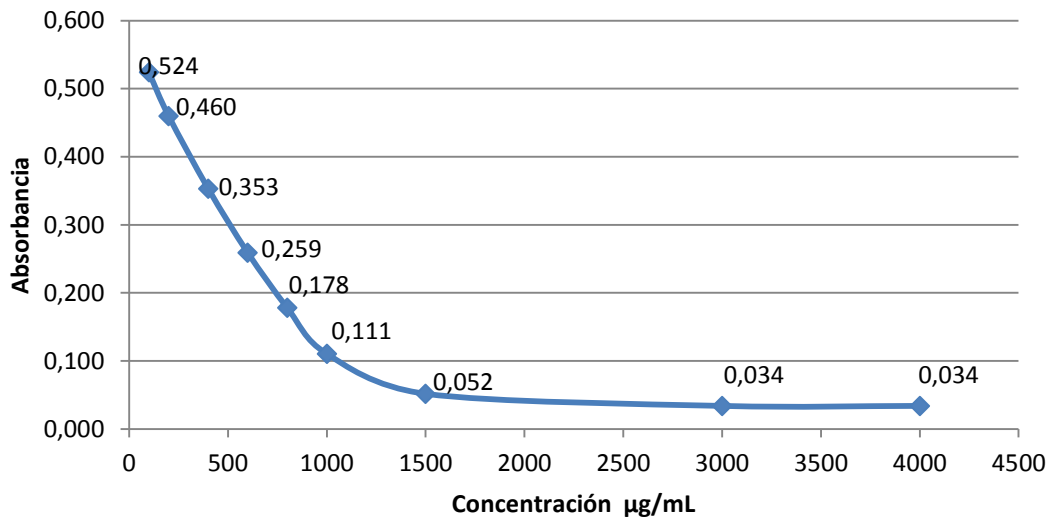
Elaborado por: Diana Paredes, 2016

Cinética de reacción del DPPH en extracto metanólico de Hojas (1H)



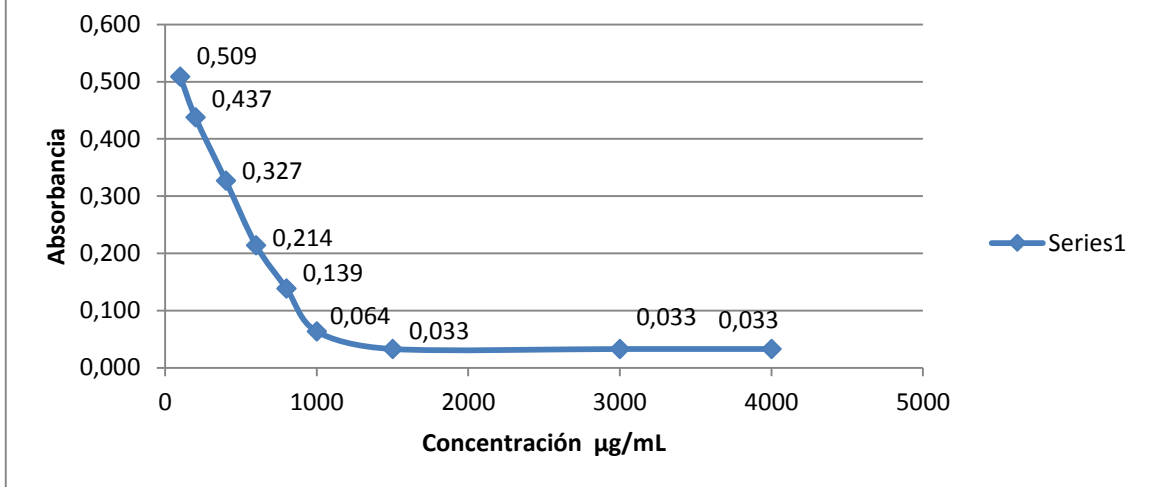
Elaborado por: Diana Paredes, 2016

Cinética de reacción del DPPH con el extracto metanólico de Flores (30min)



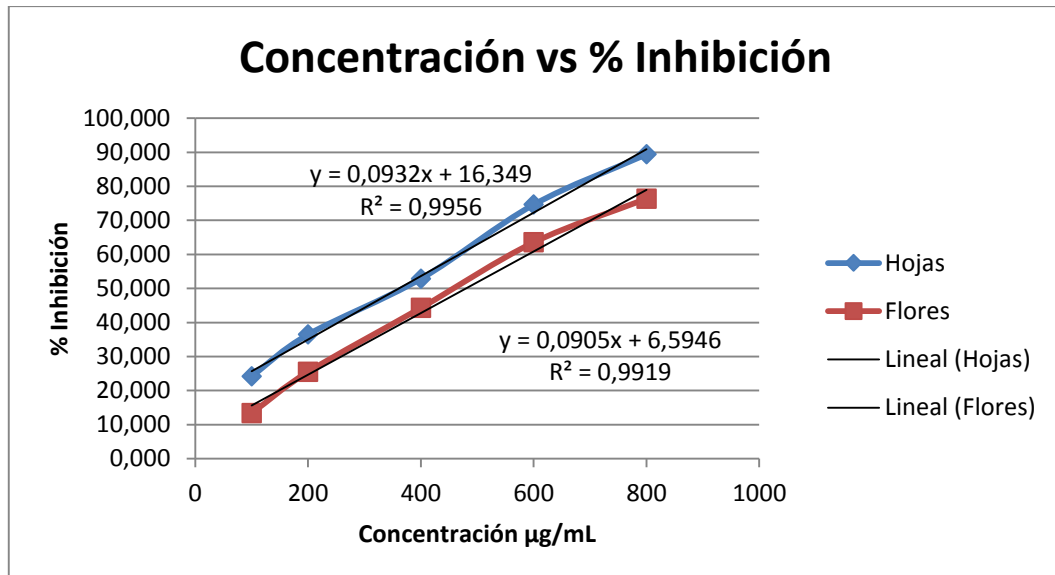
Elaborado por: Diana Paredes, 2016

Cinética de reacción del DPPH con el extracto metanólico de Flores (1hora)

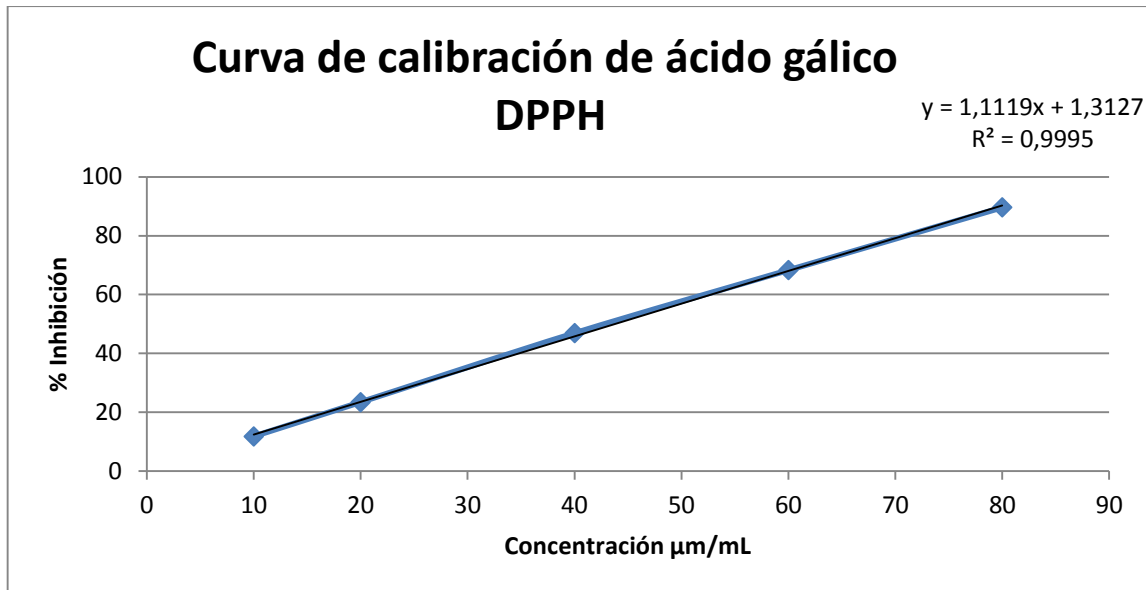


Elaborado por: Diana Paredes, 2016

ANEXO F. Curva de calibración de extractos metanólicos de hojas, flores de *P. mixta* y ácido gálico con % de Inhibición para cálculo de IC₅₀



Elaborado por: Diana Paredes, 2016



Elaborado por: Diana Paredes, 2016

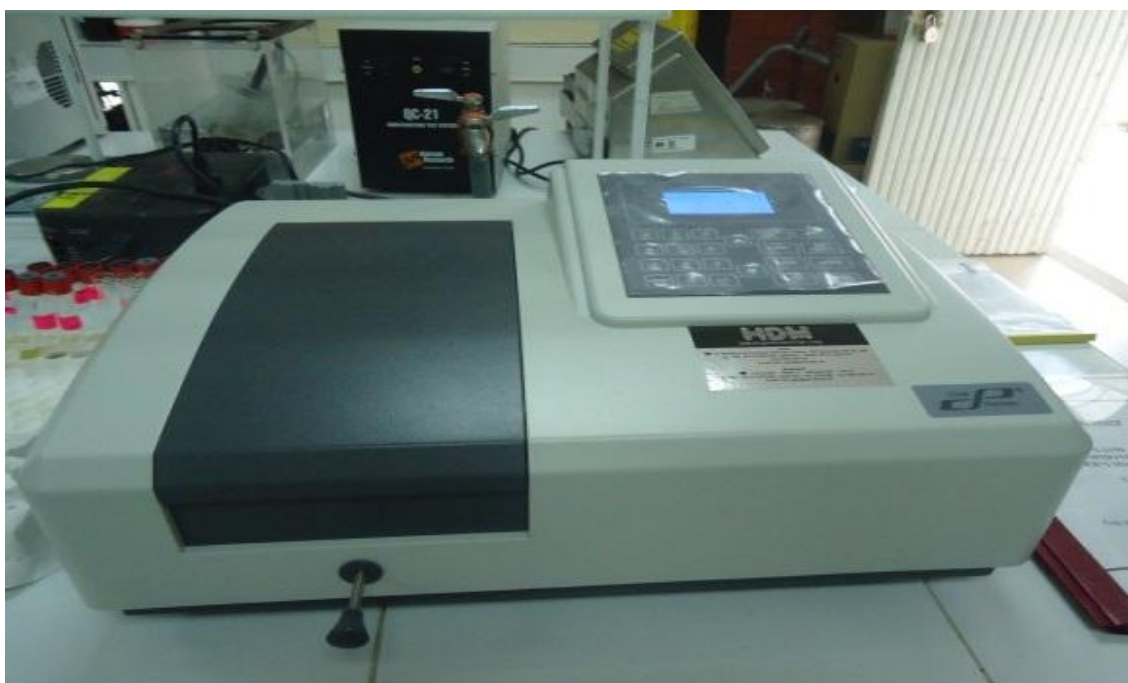
ANEXO G. Equipo de destilación para obtener extractos hidrolizados



ANEXO H. Rotavapor para concentración de extractos



ANEXO I. Espectrofotómetro usado en cuantificación de fenoles, flavonoides y capacidad captadora de radicales libres.



ANEXO J. Equipo HPLC empleado para la cuantificación de Flavonoides.



ANEXO K. Análisis de capacidad captadora de radicales libres.



ANEXO L. Cromatografía en capa fina con diferentes fases móviles, vista al UV lejano



Fase móvil: tolueno: acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua:
metilisobutilcetona (3:3:0,5:0,5:1:4). Fase estacionaria: sílica gel 60 254nm
Elaborado por: Diana Paredes, 2016



Fase móvil: Agua:nbutanol:acetona: ácido acético (16:2:2:1)
Fase estacionaria: poliamida.
Elaborado por: Diana Paredes, 2016



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 mixta*”

Trabajo de titulación presentado para optar por el grado de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: DIANA CAROLINA PAREDES ALVAREZ

Riobamba - Ecuador

2016

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Diana Carolina Paredes Alvarez, 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, 05 de febrero de 2016

Diana Carolina Paredes Alvarez

060325913-6