



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

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

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: DIANA ISABEL MUÑOZ GARCÉS

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

Riobamba – Ecuador

2016

© 2016, DIANA ISABEL MUÑOZ GARCÉS

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

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

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

	FIRMA	FECHA
Lic. Karen Acosta M.Sc. DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN	_____	_____
BQF Fausto Contero Bedoya MIEMBRO DEL TRIBUNAL	_____	_____
DOCUMENTALISTA SISBIB ESPOCH	_____	_____
NOTA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	_____	

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Diana Isabel Muñoz Garcés, 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 autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 04 de Febrero del 2016

DIANA ISABEL MUÑOZ GARCÉS
CI: 180428798-3

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de titulación a Dios que es mi guía, mi refugio y mi protección quien está en cada momento de vida derramando su inmenso amor y sus bendiciones.

Para mis queridos padres José e Isabel, a ellos que supieron guiarme por el duro sendero de la vida con abnegación, cariño y comprensión. Para ellos que con su santo amor me dedicaron los mejores años de su vida, dejando de ser ellos mismos para formar parte de mi vida.

A mis hermanos Rodrigo y Vinicio, que me han brindado su apoyo, su paciencia, sus consejos y son mi mejor ejemplo a seguir.

Diana

AGRADECIMIENTO

Mi inmenso agradecimiento a Dios que es mi fuerza y mi inspiración, a mi familia que son el motor fundamental para que cada uno de mis sueños se hagan realidad.

Mi sincero agradecimiento y gratitud a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a la Facultad de Ciencias y a mi querida Escuela de Bioquímica y Farmacia por permitirme formarme profesionalmente en sus instalaciones; a mis maestros, al grupo de investigación GIPRONAF, Susana, Fausto, Diego y Karen quienes supieron educarme moral e intelectualmente hasta conseguir mi gran ideal; a más de ser mis maestros son grandes amigos y excelentes seres humanos.

A la persona especial que llego a mi vida, brindándome su apoyo, comprensión, amistad y amor dedicando gran parte de su tiempo haciendo que cada día sea mejor. A mis amigos con quienes he compartido alegrías y tristezas; formando parte de una etapa muy bonita de mi vida.

Dejando como promesa escrita el seguir adelante hasta donde se cumpla mis sueños y anhelos. Que sea una escalinata más de todo lo bueno que deseo hacer en mi vida.

Diana

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
°C	Grados Celcius
CE	Electroforesis capilar
cm	Centímetros
DPPH	2,2-difenil –1-picryl hidrazilo
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
FDA	Agencia de Alimentos y Medicamentos o Agencia de Drogas y Alimentos
g	Gramos
GC	Cromatografía de gases
GRAS	Generalmente reconocida como segura
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
M	Molar
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NEFT	Norma Ecuatoriana de Fitoterápicos
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
POS	Organización Panamericana de la Salud
ppm	Partes por millón
TLC	Cromatografía en capa fina
TOC	Trastorno Obsesivo Compulsivo
UHPLC	Cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución
uL	Micro litros
uM	Micro molar
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
UV	Radiación Ultravioleta

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	4
Objetivo General.....	4
Objetivo Específico.....	4
CAPÍTULO I.....	5
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Fundamentación Teórica.....	5
1.1.1. Fitoterapia.....	5
1.1.2. Planta medicinal.....	5
1.1.3. Medicina tradicional.....	5
1.1.4. Medicina complementaria/alternativa.....	5
1.1.5. Medicamentos herbarios.....	6
1.1.6. Fitomedicina.....	6
1.1.7. Fitofarmacología.....	6
1.1.8. Fitoquímica.....	6
1.1.9. Droga.....	6
1.1.10. Droga Vegetal.....	7
1.1.11. Principio activo.....	7
1.1.12. Extractos vegetales.....	7
1.1.13. Extracción.....	7
1.1.14. <i>Passiflora</i>	7
1.1.15. Condiciones de seguridad.....	9
1.1.16. Composición de las hojas.....	9
1.1.17. <i>Passiflora quadrangularis</i> (Badea).....	10
1.1.18. Clasificación Taxonómica.....	10

1.1.19. Nombres comunes	10
1.1.20. Origen y Distribución.....	11
1.1.21. Características Botánicas.....	11
1.1.22. Alcaloides.....	12
1.1.23. Fenoles Naturales	13
1.1.24. Flavonoides	14
1.1.25. Antioxidante	19
1.1.26. Acción antioxidante de flavonoides	19
1.1.27. Ansiedad.....	20
CAPÍTULO II	22
2. MARCO METODOLÓGICO	22
2.1. Recolección de la droga vegetal.....	22
2.2. Lugar de la investigación	22
2.3. Materiales, equipos y reactivos	22
2.3.1. Materia vegetal.....	22
2.3.2. Materiales.....	23
2.3.3. Equipos.....	24
2.3.4. Reactivos	25
2.4. Acondicionamiento de la droga vegetal	26
2.5. Técnicas y Métodos.....	27
2.5.1. Métodos fisicoquímicos aplicados a las drogas crudas. Parámetros de control de calidad..	27
2.5.2. Tamizaje fitoquímico	28
2.5.3. Obtención de los extractos	30
2.5.4. Cuantificación de fenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu con estándar ácido gálico	32
2.5.5. Cuantificación de flavonoides totales mediante un método colorimétrico con estándar quercetina	34
2.5.6. Preparación de la muestra para HPLC	35
2.5.7. Capacidad Captadora de radicales libres DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo).....	36

CAPÍTULO III.....	40
3. MARCO DE RESULTADOS, ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	40
3.1. Control de calidad de la materia vegetal	40
3.2. Tamizaje fitoquímico	41
3.3. Cromatografía en Capa Fina de la fracción glicosilada.....	45
3.4. Cromatografía en Capa Fina de la fracción hidrolizada.....	46
3.5. Cuantificación de Fenoles y Flavonoides mediante espectrofotometría	47
3.5.1. Cuantificación de fenoles.....	48
3.5.2. Cuantificación de flavonoides.....	49
3.6. Identificación y cuantificación mediante HPLC	52
3.7. Determinación de la actividad antioxidante	56
CAPITULO IV.....	58
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	58
4.1. Conclusiones	58
4.2. Recomendaciones.....	59
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1	Taxonomía de <i>P. quadrangularis</i>	10
Tabla 1-2	Materiales utilizados en los diferentes ensayos.....	23
Tabla 2-2	Lista de equipos utilizados en las diferentes determinaciones.....	24
Tabla 3-2	Lista de reactivos utilizados en los diferentes ensayos.....	25
Tabla 1-3	Control de calidad de las hojas y flores secas de <i>P. quadrangularis</i>	40
Tabla 2-3	Concentraciones de los extractos de hojas de <i>P. quadrangularis</i>	41
Tabla 3-3	Concentraciones de los extractos de flores de <i>P. quadrangularis</i>	41
Tabla 4-3:	Tamizaje fitoquímico de los extractos étereo, alcohólico y acuoso de hojas de <i>Passiflora quadrangularis</i>	42
Tabla 5-3	Tamizaje fitoquímico de los extractos étereo, alcohólico y acuoso de flores de <i>Passiflora quadrangularis</i>	43
Tabla 6-3	Glicósidos cianogénicos.....	43
Tabla 7-3	Resultados de la determinación del Factor de Retención de la cromatografía en capa fina de la fracción flavónica de hojas y flores de <i>P. quadrangularis</i>	45
Tabla 8-3	Porcentaje de rendimiento de los diferentes extractos.....	47
Tabla 9-3	Curva de calibración de ácido gálico mediante Folin-Ciocalteu.....	48
Tabla 10-3	Resultados de la Cuantificación de fenoles totales de los diferentes extractos de hojas y flores de <i>P. quadrangularis</i>	48
Tabla 11-3	Curva de calibración de quercetina mediante tricloruro de aluminio.....	50
Tabla 12-3	Resultados de la Cuantificación de flavonoides totales de los diferentes extractos de hojas y flores de <i>P. quadrangularis</i>	50
Tabla 13-3	Resultados del Porcentaje de Flavonoides de hojas y flores de <i>P. quadrangularis</i>	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1	Flavonas.....	10
Figura 2-1	<i>Passiflora quadrangularis</i>	12
Figura 3-1	Alcaloides de tipo Harmano.....	13
Figura 4-1	Núcleo Básico de un flavonoide.....	15
Figura 5-1	Clasificación de los flavonoides.....	15
Figura 1-2	Preparación de la Materia Vegetal para el tamizaje fitoquímico.....	28
Figura 2-2	Estudio de los Grupos Funcionales del Extracto Etéreo de la materia Vegetal.....	29
Figura 3-2	Estudio de los Grupos Funcionales del Extracto Alcohólico de la materia vegetal.....	29
Figura 4-2	Estudio de los Grupos Funcionales del Extracto Acuoso de <i>Passiflora quadrangularis</i>	29
Figura 5-2	Preparación de extractos material vegetal seco de <i>P. quadrangularis</i>	30
Figura 6-2	Preparación de la muestra para HPLC.....	35
Figura 7-2	Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante...37	
Figura 8-2	Determinación de la capacidad antioxidante.....	38
Figura 1-3	Cromatografía en capa fina de la fracción flavónica glicosilada de hojas y flores de <i>P. quadrangularis</i>	45
Figura 2-3	Cromatografía en capa fina de la fracción flavónica hidrolizada de hojas y flores de <i>P. quadrangularis</i> con los respectivos estándares.....	46
Figura 3-3	Representación gráfica de Fenoles totales de hojas y flores en los diferentes extractos.....	49
Figura 4-3	Representación gráfica de Flavonoides totales de hojas y flores en los diferentes extractos.....	51
Figura 5-3	Cromatograma HPLC de estándares y muestras hidrolizadas de extractos metanólicos de hojas y flores.....	53
Figura 6-3	Cuantificación Quercetina.....	54
Figura 7-3	Cuantificación de Luteolina.....	54
Figura 8-3	Cuantificación de Apigenina.....	54
Figura 9-3	Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el método DPPH de ácido gálico.....	56
Figura 10-3	Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el método DPPH del extracto de hojas.....	56

Figura 11 -3	Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el método DPPH del extracto de flores.....	57
---------------------	--	----

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A	Recolección y acondicionamiento de la materia prima de <i>P. quadrangularis</i> .
ANEXO B	Parámetros de control de calidad
ANEXO C	Tamizaje fitoquímico
ANEXO D	Cromatografía en capa fina
ANEXO E	Cuantificación por espectrofotometría UV de fenoles y flavonoides y de los diferentes extractos
ANEXO F	Cuantificación de fenoles por espectrofotometría UV en los diferentes extractos de hojas y flores
ANEXO G	Cuantificación de flavonoides por espectrofotometría UV en los diferentes extractos de hojas y flores
ANEXO H	Cuantificación de flavonoides mediante HPLC de la fracción hidrolizada de hojas y flores de <i>P. quadrangularis</i>
ANEXO I	Cromatograma de las diferentes concentraciones para la cuantificación de quercetina, luteolina y apigenina
ANEXO J	Concentraciones de la Curva de Calibración de Quercetina
ANEXO K	Concentraciones de la Curva de Calibración de Luteolina
ANEXO L	Concentraciones de la Curva de Calibración de Apigenina
ANEXO M	Concentración y % de Inhibición de ácido gálico por el método DPPH
ANEXO N	Concentración y promedio del % de Inhibición del extracto de hojas por el método DPPH
ANEXO O	Concentración y media del % de Inhibición del extracto de flores por el método DPPH
ANEXO P	Capacidad Captadora de radicales libres mediante DPPH

RESUMEN

Se realizó un estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antioxidante *In Vitro* de hojas y flores de *Passiflora quadrangularis*. Se recolectó la especie en la comunidad la Victoria. Los análisis se efectuaron en Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, dentro del Grupo de Investigación de Productos Naturales y Farmacia (GIPRONAF) en el marco del proyecto institucional “Estudio comparativo de la actividad psicoactiva de pasifloras de la provincia de Chimborazo”. Se acondicionó la planta, se efectuó el control de calidad de la droga y el tamizaje fitoquímico. El estudio se enfocó en la cromatografía en capa fina (TLC) para elucidar compuestos de tipo flavónico, la cuantificación de fenoles y flavonoides por espectrofotometría UV y flavonoides por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), la determinación de la capacidad captadora de radicales libres mediante 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH). Los mejores resultados de la cuantificación espectrofotométrica fue del extracto etanólico al 70 % en hojas con un porcentaje de 13.11 %, en flores 7.25 % de fenoles totales expresados como ácido gálico, para flavonoides en hojas y flores se encontró 1.18% y 0.54% respectivamente de flavonoides totales expresados como quercetina. En la fracción flavónica hidrolizada se cuantificó mediante HPLC en hojas 0.0057% de apigenina, 0.00105% de luteolina y 0.0103% de quercetina y en flores 0.00125% de apigenina, 0.00015% de luteolina y 0.0012% de quercetina. En la capacidad captadora de radicales libres se obtuvo la concentración máxima de la media inhibitoria IC₅₀ del extracto metanólico de hojas a 5993.49 ±3.6 ug/mL y de flores 10092.55±2.8 ug/mL necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50 %. Mediante la realización de este estudio se concluye que el extracto de hojas presenta mejor capacidad antioxidante. Se recomienda modificar las concentraciones del DPPH y del antioxidante para determinar cómo actúa este radical a diversas concentraciones.

Palabra clave: < BADEA [*Passiflora quadrangularis*]>, <CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA [TLC]>, <ESPECTROFOTOMETRÍA>, <CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA [HPLC]>, <ANTIOXIDANTE [IC₅₀] >, <FARMACIA>.

ABSTRACT

It was made a phytochemical and evaluation study of the antioxidant activity *In Vitro* of leaves and flowers of *Passiflora quadrangularis*. It is collected the species in the community La Victoria. The analyses were made in Escuela Superior Politecnica de Chimborazo, within the Group of Investigation of Natural Products and Pharmacy (GIPRONAF) in the frame of the institutional project "Comparative Study of the psychoactive of passion flowers of the Province of Chimborazo". The plant was conditioned, the quality control of the drug was made and the phytochemical screening. The study was focused in the thin layer chromatography (TLC) to elucidate composes of flavonic type, the quantification of phenols and flavonoids by espectrophoyometry UV and flavonoids of high performance liquid chromatography (HPLC), the determination of the catching capacity of free radical by means of 1,1 difenil-2-picril-hydrazile (DPPH). The best results of the espectrophotometric quantification was the ethnolic extratc to 70 % in leaves with a percentage of 13.11 %, in flowers 7.25 % of total phenols expressed as gallic acid for flavonoids in leaves and flowers: 1.18 % and 0.54 % of total flavonoids were found, expressed as quercetine. In the hydrolized flavonic fraction was quantified through HPLC in leaves 0.0057 % of apigenine, 0.00105 % of luteoline and 0.0103 % of quercetine, and in flowers 0.00125 % of apigenine, 0.00015% of luteoline and 0.0012 % of quercetine. In the catching capacity of free radicals the máxium concentration of the inhibitory average IC₅₀ was obtained, from the metanolic extract of leaves to 5993.49± 3.6 ug/mL to 50%. By means of the making of this study, it is concluded that the extract of leaves present a better antioxidant capacity. It is recommended modifying the concentrations of DPPH and of the antioxidant to determine how to act these radical to diverse concentrations.

KEY WORDS: <BADEA [*Passiflora quadrangularis*]>, <THIN LAYER CHROMATOGRAPHY [TLC]>, <HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY [HPLC]>, <ANTIOXIDANT [IC₅₀]>, <PHARMACY>

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen diversas enfermedades que afectan al sistema nervioso central como es el caso de la ansiedad. Según la Organización Mundial de la Salud, el 3.8% de la población mayor de edad padece de trastornos de ansiedad, datos obtenidos de la Unidad de Adolescentes del Departamento de Psiquiatría del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid afirman que el 9-12 % de trastornos de ansiedad afecta a la población de niños como de jóvenes. (OMS 2015) (Ruíz 2005)

Los trastornos mentales son otro problema que afecta a la población, datos de la OMS arrojan que el 7% de personas ancianas sufren problemas de depresión; en Ecuador el 10% de las familias sufren problemas de depresión según indica el Diario de Salud Mental. Además, el estrés es otra enfermedad del presente siglo reconocida por la OMS y por la Organización Panamericana de la Salud OPS. (Investigación 2012)

Estos sucesos se ven más afectados en la situación actual de salud de los trabajadores, ya que es inevitable que en algún momento de la vida cada individuo atraviese sentimientos de ansiedad, tristeza, insomnio, mal humor, dolor de cabeza, gastritis, palpitar acelerado, síntomas que se ven asociados con el estrés, provocando de esa manera comportamientos de malestar ya sea en el ámbito laboral, educativo hasta sentimental. (Reyes 2010)

Al ser tratados estos padecimientos con una terapia medicamentosa pueden producir efectos secundarios no apreciados por el paciente, como es en el caso de trastornos de ansiedad, que al utilizar benzodiacepinas se puede generar síndrome de abstinencia, intolerancia, adicción; en el caso de antidepresivos de igual manera causan efectos no deseables como dependencia física, síndrome de abstinencia mal formaciones cardiacas durante el embarazo que hacen que las personas no terminen su tratamiento y eso conlleva a secuelas peores. (Schiffman 2011 Noviembre) (Health 2012).

En la actualidad el consumo de benzodiacepinas se ha incrementado considerablemente, siendo Argentina uno de los países con más alto consumo en lo que respecta al clonazepam; Según el informe emitido por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), el consumo de este tipo de fármacos creció más del 5% en 2013 en este país. (AEMPS n.d.)

Los medicamentos más consumidos son las benzodiazepinas, que actúan sobre el sistema nervioso central, con efectos sedantes, ansiolíticos, anticonvulsivos y relajantes. Más de tres millones de argentinos consumen ansiolíticos. Lo más alarmante es que el uso de estos medicamentos con o sin recomendación médica creció en los últimos diez años más de un 40%; de esa manera se pone en riesgo la salud del paciente que desconoce prácticamente la dosificación y la frecuencia correcta de la toma. (AEMPS n.d.)

Por otro lado, un desbalance de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en el organismo humano ocasiona daños en los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos dando lugar a enfermedades crónicas como el cáncer, el mal de Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, procesos ligados con el envejecimiento.

Los productos vegetales presentan una variedad de compuestos químicos que actúan como agentes antioxidantes, inhibiendo la formación y el daño producido por las ERO, razones que impulsan a la búsqueda de bases teóricas para su investigación. (Ceconi C 2003)

Existen diversos estudios científicos de especies del género *Passiflora* donde se indican ensayos realizados para probar su actividad en el sistema nervioso, hallando una participación GABAérgica, actividad sedante y ansiolítica en la especie *Passiflora quadrangularis*. Por otro lado, también se ha encontrado actividad antioxidante en la *Passiflora ligularis* (Gazola, Costa & Castellanos 2015).

Debido a que se trata de un género con gran potencial y que en Ecuador son escasos los estudios de esta familia, resulta necesario estudiar especies como es el caso de *Passiflora quadrangularis*, localizada en la provincia de Chimborazo. Por ello, este trabajo de titulación se enfocó en el estudio fitoquímico comparativo y actividad antioxidante *in vitro* de hojas y flores de la especie de *P. quadrangularis*. (H. Wagner 2001) (Silva 2014)

El mayor interés de esta investigación siguiendo objetivo 3 del Plan Nacional del Buen Vivir, es prevenir y disminuir el incremento de enfermedades, reducir la tasa de mortalidad en el país; y, de esa manera, mejorar la calidad de vida la población. Por otro lado, también es necesario rescatar los saberes ancestrales y revalorizar los conocimientos y uso del género *Passiflora*.

A través de este trabajo de titulación, se contribuirá a la recuperación y potenciación del conocimiento y uso social del patrimonio cultural, pues se estimula la revitalización cultural y la

recuperación de saberes relacionados con las plantas usadas como psicoactivas. (Desarrollo 2013-2017)

Los principales beneficiarios de este estudio son estudiantes sometidos al estrés, comunidades de las nacionalidades y pueblos aledaños, pacientes con trastornos psicoactivos tales como depresión, ansiedad, trastorno bipolar, personas cuya calidad de vida se haya visto disminuida,. Además, en quienes estos trastornos constituyan factores de riesgos para el desarrollo de otros problemas como hipertensión, gastritis, diabetes, etc.

Por otro lado, en un hipotético futuro también saldrán favorecidas las comunidades indígenas, varios agricultores, que estén dispuestos a cultivar o recolectar plantas para la industrialización de *Passiflora*. Indirectamente, saldrán beneficiados empresarios farmacéuticos que puedan hacer uso de la información y posteriormente elaborar formas farmacéuticas.

OBJETIVOS

Objetivo General

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

Objetivo Específico

1. Determinar la calidad y composición cualitativa de la droga vegetal seca de *P. quadrangularis* mediante control de calidad y tamizaje fitoquímico.
2. Identificar la presencia de compuestos de tipo flavónico mediante cromatografía en capa fina en extractos de hojas y flores de *P. quadrangularis*
3. Cuantificar la concentración de fenoles y flavonoides en extractos de hojas y flores de *P. quadrangularis* por espectrofotometría y cromatografía líquida de alta eficacia.
4. Evaluar la capacidad captadora de radicales libres *in vitro* de extractos de hojas y flores de *P. quadrangularis* mediante DPPH.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Fundamentación Teórica

1.1.1. Fitoterapia

Es el estudio de las plantas medicinales con finalidad de ser utilizadas en la terapéutica, ya sea para advertir, para calmar o para curar las enfermedades. (Rodríguez 2005)

1.1.2. Planta medicinal

Cualquier especie vegetal que contiene en la planta o en alguno de sus órganos, los principios activos que poseen actividad farmacológica su finalidad es ser utilizados terapéuticamente o emplearse como modelo para lograr nuevos fármacos por hemisíntesis. (Rodríguez 2005) (Osorio 2009)

1.1.3. Medicina tradicional

La medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales. (Zhang 2016)

1.1.4. Medicina complementaria/alternativa

Los términos "medicina complementaria" y "medicina alternativa", utilizados indistintamente junto con "medicina tradicional" en algunos países, hacen referencia a un conjunto amplio de prácticas de atención de salud que no forman parte de la propia tradición del país y no están integradas en el sistema sanitario principal. . (Zhang 2016)

1.1.5. Medicamentos herbarios

El concepto de medicamentos herbarios abarca hierbas, material herbario, preparaciones herbarias y productos herbarios acabados, que contienen como principios activos partes de plantas, u otros materiales vegetales, o combinaciones de esos elementos. . (Zhang 2016)

1.1.6. Fitomedicina

La fitomedicina es aquella disciplina de la medicina que emplea en terapéutica a las plantas medicinales en forma de extractos, infusiones, decocciones en sus diversas presentaciones, en un contexto científico y adoptando los criterios de investigación propios de la metodología científica: fases preclínicas, clínicas, ensayos farmacológicos, toxicológicos, mutagénicos, etc (Morales 2006)

1.1.7. Fitofarmacología

Estudia los fitomedicamentos, en cuanto a su mecanismo y sitios de acción (receptores), como a la Fitoterapia, que aplica los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico y busca establecer las interacciones medicamentosas, contraindicaciones y efectos adversos. (Morales 2006)

1.1.8. Fitoquímica

Es la ciencia que se encarga del estudio de los productos químicos que producen o forman parte estructural de los vegetales.es decir es una disciplina científica, su finalidad es el aislamiento, análisis, purificación, elucidación de la estructura y caracterización de la actividad biológica de diversas sustancias producidas por los vegetales. (Duran 2011)

1.1.9. Droga

Es toda sustancia de origen material obtenido por procesos sintéticos la misma que contiene principios activos que poseen actividad biológica. (Verpoorte 2000)

1.1.10. Droga Vegetal

Son los principios activos que se encuentra ubicados en las diversas partes de la planta como puede ser hojas flores, raíces, etc. (Verpoorte 2000)

1.1.11. Principio activo

Es la sustancia químicamente pura que posee la actividad terapéutica. (Osorio 2009)

1.1.12. Extractos vegetales

Es una mezcla compleja de diversas sustancias obtenidos por procesos como puedes ser químico, físico y biológico. (Osorio 2009)

El carácter específico de los extractos vegetales es que se pueden extraer principios activos variados a partir de una misma planta. Esto va en dependencia del solvente empleado para extraer la parte vegetal de interés para el estudio que se realiza. El alcohol disuelve los principios activos liposolubles de una parte vegetal específica. (Osorio 2009)

Para diferenciar el extracto no solo basta el solvente utilizado sino también el método de extracción que se realizó es por eso que necesariamente se debe purificar, concentrar para obtener extractos óptimos. (Osorio 2009)

1.1.13. Extracción

Existen diferentes métodos para extraer los principios activos de una planta, los mismos que necesitan según la técnica empleada y la naturaleza propia de la planta un líquido extractivo.

1.1.14. *Passiflora*

La familia Passifloraceae abarca 935 especies, divididas en 27 géneros distribuidos en zonas tropicales y subtropicales del mundo, especialmente en África y las Américas. (Silva 2014)

De la familia Passifloraceae el género más grande e importante es la *Passiflora*. Son distribuidas en toda América Latina. Se utilizan hojas de diferentes especies de este género

tradicionalmente en varios países como sedantes o tranquilizantes, y las frutas son utilizadas como frutos comestibles o en la preparación de zumos. (Costa 2013)

Según revisiones de Gislanea Silva (2014) el género *Passiflora* presenta propiedades terapéuticas, tales como ansiolíticas ampliamente conocidas y efectos sedantes. Se ha realizado diferentes técnicas cromatográficas y electroforéticas, tales como cromatografía planar (TLC), cromatografía líquida (HPLC y UHPLC), cromatografía de gases (GC) y electroforesis capilar (CE).

Se han evaluado diferentes compuestos presentes en cada parte de la planta de *Passiflora alata*, *P. incarnata*, *P. foetida*, *P. edulis*, explorando las hojas, las frutas con sus cortezas semillas, y otras partes como néctar y composiciones de callo de cultivo, y se han encontrado estructuras de tipo flavonoides y alcaloides. (Silva 2014)

Existen estudios de diferentes especies realizados por Dhawan, Sharma (2004) de *Passiflora* donde se muestran los Fito constituyentes, informes farmacológicos, clínicos, las aplicaciones e informes toxicológicos. Dentro de los principales fitoconstituyentes se ha encontrado flavonoides, glicósidos, alcaloides, compuestos fenólicos y componentes volátiles; se ha utilizado algunas especies de *Passiflora* siendo la más importante *Passiflora incarnata* que posee propiedades significantes depresoras del SNC. (Kamaldeep Dhawan 2004)

Datos encontrados en informes de Pereira y Colaboradores (2004) indica que existe estudios de diversas especies de *Passiflora* entre ellas hojas de *Passiflora edulis*, *P. alata*, *P. caerulea* y *P. incarnata*, donde se cuantificaron flavonoides por el método de cromatografía líquida de alta eficiencia encontrándose compuestos de tipo vitexina, orientina, isoorientina, rutina. (Pereira 2004)

Según publicaciones de Ayres y Colaboradores (2015) se indica que se han utilizado en la medicina popular tradicional brasileña para el tratamiento de la ansiedad y el insomnio las especies *P. edulis* y *P. edulis flavicarpa*. Este estudio indica la presencia de compuestos flavonoides glucósidos, con actividad antidepresiva y ansiolítica. (Ayres 2015)

Geison Costa (2013) realizó estudios *P. alata* y *P. quadrangularis*, aislando e identificando los principales flavonoides y saponinas de las hojas de estas especies, mediante métodos rápidos y eficientes HPLC -DAD para la comparación de estos compuestos de las dos especies.

Derivados de vitexina se proponen como marcadores químicos en la identificación de *P. alata* y *P. quadrangularis* y la detección de adulteraciones en materia prima. (A & Ac 2013)

Gazola Y Col (2015) realizaron estudios del pericarpio de *Passiflora quadrangularis* encontrando como principal compuesto flavonoide apigenina el mismo que indujo una actividad sedante con acción sobre el sistema GABAérgico. (Gazola, Costa & Castellanos 2015)

Estudios realizados por Shanmugam Saravanan (2014) indican propiedades antioxidantes analizadas por el método DPPH en un extracto de acetona realizado a las hojas de *Passiflora subpeltata* y *Passiflora ligularis*. (Shanmugam Saravanan 2014)

P. alata y *P. quadrangularis* se utilizan abundantemente en América del Sur. Sus frutos se consumen, y con las hojas se realiza infusiones que utilizan en la medicina popular. En la Farmacopeia Brasileira, se describe *P. alata* y se utiliza en algunas preparaciones farmacéuticas utilizado como sedante suave. (Costa 2013) *P. quadrangularis* se cultiva en altitudes inferiores a 2.500m produce principalmente en zonas tropicales del Sur de América Latina, como Colombia, Ecuador y el norte y el noreste de Brasil. (Correa 1978)

Informes sobre la composición química del género *Passiflora* describen como constituyentes principales compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas, compuestos cianogénicos y alcaloides. (Costa 2013) (Silva 2014)

1.1.15. Condiciones de seguridad

La *Passiflora* según la FDA se ubica en la lista GRAS que quiere decir que se encuentra Generalmente reconocida como segura. (Administration 2013)

1.1.16. Composición de las hojas

Las hojas del género *Passiflora* son una gran fuente de compuestos bioactivos, que se puede encontrar como alcaloides (harmano, harmina, harmalina, harmol, harmolol, saponinas, compuestos cianogénicos y principalmente polifenoles (flavonoides C - glicosilo tales como vitexina , isovitexina , orientin , isoorientina y apigenina). (A 2006) (Santos k 2006)

Los flavonoides presentes en el jugo de frutas de Fruta de la pasión (*Passiflora*) identificados mediante HPLC fueron apigenina-6- C -glicosil-8 C –arabinosídeo, isoorientina, orientina, isovitexin , luteolina6- C -quinovosídeo y luteolina 6- C –fucosídeo. (Zeraik 2010)

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

Figura 1-1: Flavonas

Fuente: (H. Wagner 1996)

1.1.17. *Passiflora quadrangularis* (Badea)

1.1.18. Clasificación Taxonómica

Según el reino vegetal la clasificación taxonómica de la *Passiflora quadrangularis* es la siguiente:

Tabla 1-1: Taxonomía de *P. quadrangularis*

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	
Reino	Plantae
División	Angiospermae
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Dilleniidae
Orden	Violales
Familia	Passifloraceae
Género	<i>Passiflora</i>
Especie	<i>P. quadrangularis</i>

Realizado por: Diana Muñoz, 2015

Fuente: Recopilación de tesis ESPOCH, UTA. (Rea 2014)

1.1.19. Nombres comunes

P. quadrangularis es la especie de la familia Passifloraceae que posee la fruta más grande de su género, conocida también como la granadilla real o granadilla grande, granadilla, o parcha, parcha de Guinea. Según algunos países se la conoce por su término inglés: *giant granadilla*; en Colombia, badea o corvejo; en Venezuela, badea; en Bolivia, granadilla real o sandía de pasión. En Brasil, es *maracuya-acu*, *maracuja* silvestre, maracuya grande,

maracuja suspiro, *maracuja mamao*, o *maracuja de caiena*. En Surinam, es *grote* o *grote markoen*. En Perú y Ecuador es conocida con el nombre de *tumbo tambo* y *badea*. (Mast n.d.)

1.1.20. Origen y Distribución

P. quadrangularis es una especie trepadora del género *Passiflora*. Crece en zonas tropicales y subtropicales. Algunos expertos han localizado su zona oriunda en el norte de América del Sur, para ser más específicos en México, Perú, Brasil y las islas del Caribe; a pesar de la información hallada no es muy clara la zona en donde se origina. (J 2010)

En Ecuador, esta planta es procedente de la provincia de El Oro, a pesar que se ha encontrado en la Amazonía y ciertos sectores específicos de la Sierra, su cultivo se da en altitudes comprendidas entre los 0 y 1000 metros sobre el nivel del mar. Requiere para crecer correctamente una temperatura de entre 20 y los 24 °C, textura media para el suelo, de drenaje fácil de igual manera la permeabilidad, suficiente materia orgánica y un pH que fluctúe entre 5.5 y 6.5. (T. 2012)

1.1.21. Características Botánicas

Raíz: Al comienzo del crecimiento es fibrosa pero al ir envejeciendo se va engrosando. Su volumen en el suelo es grande por lo que sus niveles de fertilidad que necesita son altos para que se producción tenga buen potencial. Para el consumo humano se utilizan las raíces de la badea, dando propiedades alucinógenas e incluso pueden llegar a ser venenosas, por poseer un componente conocido como pasiflorina. Por eso, es mejor consumir las raíces engrosadas de plantas adultas después de ser hervidas. (T. 2012)

Tallo: El tallo es cuadrangular como claramente indica su nombre y la superficie es lisa, dura en la base puede llegar a medir entre 5 y 50 metros de largo, caracterizada por ser trepadora y su crecimiento rápido, tosco grueso y fuerte. Posee zarcillos, cuya longitud es de 30cm enrollados en espiral, por lo que fácilmente se fijan en algunas superficies. (T. 2012)

Hojas: Son abundantes, de color verde claro, de forma oval a lanceolada de 10 a 30 cm de largo y una anchura de 8 a 15 cm. Su base es dentada en ciertas hojas y en otras no es apreciables esta forma. Le sobresale en el envés una nervadura de la lámina o limbo, además presentan pecíolos glandulados y ápices redondeados o puntiagudos.

Flores: Tienen un diámetro de 8 a 12cm, en la base llevan 3 hojillas verdosas; son olorosas, de sépalos carnosos, verdes en la parte externa y blancos o rosados en la interna; poseen pétalos rojos en el lado interno y rosados o blancos en el externo. La corona está formado de 5 o 6 ciclos de apéndices, 3 internos y 2 externos que pueden medir hasta 5 cm de longitud con base rosadas rojizas, en el medio lila y blancos en el ápice; estos colores llamativos se debe a la presencia de un pigmento del grupo de las antocianina. (Duque C 2005)

Fruto: Es un fruto más grande de todas las especies del género *Passiflora*, solamente cerca del 12% de las flores producen frutos, son ovalados de 15 a 30 cm de largo de 12 a 18 cm de diámetro. El pericarpio es liso, brillante, textura blanda con 3 surcos no tan profundos; de extremos redondeados, color verde durante su crecimiento y en la madurez amarillo. El epicarpio de color blanco, presenta una textura esponjosa, olorosa, levemente dulce y ácida; conteniendo las semillas en el centro. (Duque C 2005)

Semillas: Textura dura, forma achatada, de color negro. Sus medidas pueden ser de 1.25 cm de largo y 0.5 a 0.7 cm de ancho. Por cada fruto se produce de 100 a 200 semillas. El ápice presenta una forma truncada, rodeadas de una sustancia jugosa, mucilaginoso y translúcida denominada arilo. (Duque C 2005)



Figura 2-1: *Passiflora quadrangularis*
Fuente: (Plant World Seeds 1985)

1.1.22. Alcaloides

Actualmente, se conocen cerca de 5500 metabolitos secundarios de plantas pertenecientes a alcaloides, tomando en cuenta que los alcaloides constituyen un grupo bastante grande, los que pueden hallarse como glicósidos al estado libre o como sales con ácidos orgánicos. (Luck 1988)

A pesar de que no existe una definición exacta, alcaloide es aquella sustancia básica que contiene uno o más átomos de nitrógeno como parte de un sistema cíclico, el mismo que presenta actividad farmacológica. (Luck 1988)

Los alcaloides que se encuentra presente en la familia Passifloraceae según estudios publicados en la Revista Brasileira de Farmacognosia son de tipo indólico, estos comprende el segundo grupo de alcaloides más conocidos. (Zuraik 2010)

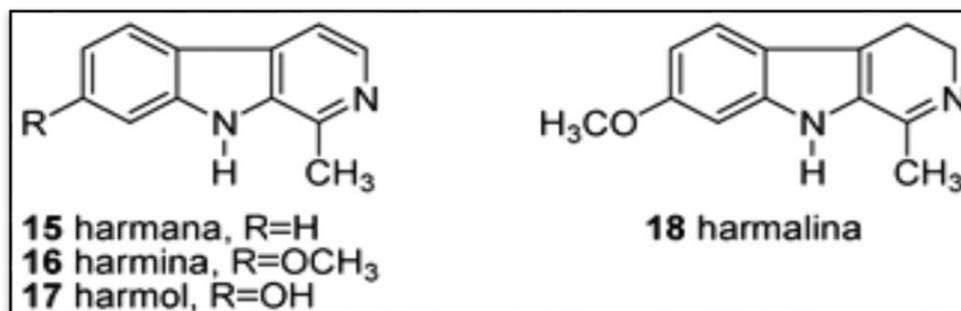


Figura 3-1: Alcaloides de tipo Harmano
Fuente: (Zeraik 2010)

La función en la planta de estos metabolitos no es muy acertada, a pesar de eso existe informes que indican que algunos alcaloides participan como reguladores del crecimiento o como repelentes o atractores de insectos, a pesar de ello ciertos alcaloides presentan acción fisiológica. (Luck 1988)

1.1.23. Fenoles Naturales

Son un grupo de sustancias químicas orgánicas de importancia biológica, se encuentran formando parte de algunas estructuras celulares de las plantas y árboles, mientras que otros se forman como productos del metabolismo celular (metanolitos secundarios) o bien, son producidos por algunos vegetales como compuestos bactericidas. (Herrera 2011)

Los fenoles naturales se clasifican en: Fenoles vegetales simples, son monohidroxi o polihidroxifenoles. Algunos son secretados como sustancias antibacterianas por las macro algas mientras que otros se liberan como productos de la transformación metabólica de compuestos aromáticos y pueden ingresar al agua a partir del proceso de humificación. Materiales de tinción, se encuentran almacenados en las vacuolas de los tejidos vegetales, llegándose a acumular en grandes cantidades en los tejidos secos. Se clasifican en taninos y flavonoides. (Herrera 2011)

1.1.24. Flavonoides

Los flavonoides se biosintetizan en todas las "plantas terrestres" o embriofitas, y también en algunas algas Charophyta, y aunque todas las especies comparten la vía biosintética central, poseen una gran variabilidad en la composición química de sus productos finales y en los mecanismos de regulación de su biosíntesis, por lo que la composición y concentración de flavonoides es muy variable entre especies y en respuesta al ambiente. (Herrera 2011)

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales, que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana. (SA & NM. 2002)

Los flavonoides son sintetizados en el citoplasma y luego migran hacia su destino final en las vacuolas celulares. Cumplen funciones metabólicas importantes en las plantas, algunas funciones son comunes a todas las plantas y otras son específicas de algunos taxones. Como ejemplo de funciones universales, los flavonoides son responsables de la resistencia de las plantas a la fotooxidación de la luz ultravioleta del Sol, intervienen en el transporte de la hormona auxina, y se cree que funcionan como defensa ante el herbivorismo. Una función importante cumplida en muchas plantas es la atracción de los animales polinizadores, a través del color o el olor que dan a la planta o a sus flores. (Herrera 2011)

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer. (CR, S & EP 1995)

Son los más distribuidos y más numerosos componentes naturales, compuestos de bajo peso molecular, contienen quince átomos de carbono en su núcleo básico y están constituidos por un sistema C₆-C₃-C₆, unidos dos anillos aromáticos A y B por una unidad de tres carbonos que como pueden formar o no un tercer anillo. (Luck 1988)

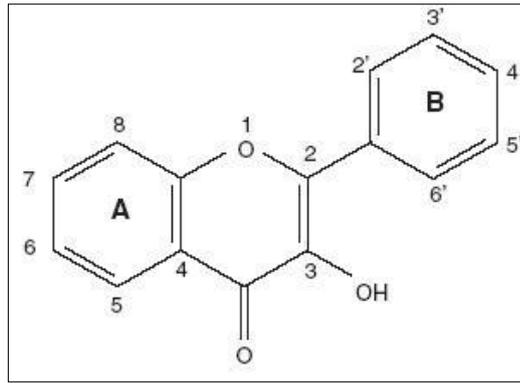


Figura 4-1: Núcleo Básico de un flavonoide
Fuente: (Luck 1988)

Se encuentran particularmente en mezclas como agliconas o glicósidos, es conveniente realizar el estudio en forma de agliconas para eso es necesario hidrolizar previamente el extracto. Los flavonoides son solubles en agua y etanol. Los glicósidos o más correctamente los heterósidos son compuestos que presentan en estructura, una parte formada por una o más moléculas de azúcar y otra mitad denominada aglicón o aglicona. (Luck 1988)

Los flavonoides se clasifican de acuerdo al siguiente esquema

Nombre	Descripción	Ejemplo	Estructura
Antocianidinas	Tiene un grupo –OH unido en posición 3, pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C	Antocianidina	
Flavanos	Con un grupo –OH en posición 3 del anillo C	Catequina	
Flavonas	Poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3	Diosmetina	
Flavonoles	Grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C	Quercetina	

Figura 5-1: Clasificación de los flavonoides
Fuente: (Christopher et al. 2009)

1.1.24.1. Las flavonas

Las flavonas son amarillas y pueden estar en algunas flores, como en la primula, dándoles un color amarillo a sus pétalos, o en frutos, como en la piel de las uvas, son las responsables del color amarillento de los vinos blancos.

Existe tres flavonas importantes: la tricetina, presente en el polen de algunas mirtáceas, y también en las podocarpáceas (*Podocarpus spp.*); apigenina, presente en muchas plantas como la camomila, (*Matricaria recutita*) o el espino blanco (*Crataegus laevigata*), da un color marrón marfileño a las flores si se presenta sola; y luteolina, de color amarillo, que incluso sirve para teñir lana y otros tejidos, para lo cual se ha empleado la Retama de los tintoreros (*Genista tinctoria*). (Herrera 2011)

Apigenina

La apigenina es un flavonoide que se encuentra en ciertas frutas y verduras. Sus propiedades anti inflamatorias, antioxidantes, antiangiogénicas y antialérgicas podrían reducir el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer como los de mama, estómago, piel y próstata. No obstante, algunos estudios indican que tomar suplementos antioxidantes (los flavonoides) el mismo día que la quimioterapia pueden negar los efectos de ésta última. (Toxicology 2013)

Esto puede deberse a que los flavonoides ejercen una acción antioxidantes y, dado que uno de los métodos empleados por la quimioterapia se basa en su actividad pro-oxidación, podría ser que la quimioterapia y los suplementos antioxidantes “compitan entre sí” si se introducen simultáneamente en el organismo del paciente. (Toxicology 2013)

Dos nuevos estudios publicados recientemente demuestran que la apigenina provoca la muerte celular de dos líneas de células tumorales de cáncer de páncreas. Tratando estas células con apigenina durante 24 horas antes de aplicar quimioterapia, los científicos obtuvieron excelentes resultados contra estas células cancerosas. (Toxicology 2013)

En lugar de aplicar simultáneamente quimioterapia y flavonoides, los investigadores emplearon primero los flavonoides para “ablandar” las defensas; los flavonoides favorecen la muerte de las células tumorales al inhibir una enzima muy importante para la supervivencia de las células, la enzima denominada GSK-3 β . Esto, a su vez, lleva a un descenso en la producción de genes anti-apoptosis en las células tumorales del cáncer de páncreas (la apoptosis es el mecanismo de autodestrucción de la célula cuando su ADN sufre algún tipo de daño irreparable). (Toxicology 2013)

En uno de sus experimentos, el porcentaje de células que ejecutaban apoptosis pasó de 8,4% a un 43,8% después de tratarlas con apigenina antes de emplear ningún tipo de quimioterapia.

Asimismo, el tratamiento con flavonoides también reguló la expresión de genes asociados a citoquinas pro-inflamatorias. (Toxicology 2013)

En 1983, el grupo argentino de Medina, Paladini y colaboradores realizaron investigaciones buscando los principios activos de plantas con propiedades sedantes. Realizaron estudios de unión a receptores a BDZ con la esperanza de encontrar principios activos con estructuras similares a las benzodiazepinas. (Estrada-Reyes, Ubaldo-Suárez & Araujo-Escalona 2012)

Como resultado de este estudio aislaron y demostraron por primera vez que la flavona crisina y la apigenina aisladas de la pasiflora (*Passiflora coerulea*), de la manzanilla (*Matricaria rucutita*) y el núcleo flavona en sí mismo, poseen propiedades ansiolíticas en modelos de conducta en ratones. (Estrada-Reyes, Ubaldo-Suárez & Araujo-Escalona 2012)

En modelos in vitro estos metabolitos secundarios mostraron alta y mediana afinidad por el sitio de unión a BDZ. Estas flavonas presentaron además escasa actividad sedante y miorrelejante, lo cual representó la primera ventaja de estos metabolitos sobre las BDZ y mostró su potencial como fármacos para uso humano. (Estrada-Reyes, Ubaldo-Suárez & Araujo-Escalona 2012)

Luteolina

La luteolina (3,4,5,7-tetrahydroxyflavones), una flavona dietética importante, regula una variedad de efectos biológicos, incluyendo la progresión del cáncer, resistencia a la insulina y la inflamación. (So-Mi Kwon 2015)

La luteolina es un potente anti cancerígeno en concreto en el cáncer de colon, las células cancerosas del colon segregan factor de crecimiento insulínico tipo 2 o IFG-II, que juega un importante papel en señalar el crecimiento incontrolado de las células y su réplica. Según el estudio publicado en BMC Gastroenterology los investigadores vieron que la luteolina suprime la secreción de IGF-II, deteniendo la progresión del cáncer de colon. (Express 2016)

Los científicos Italianos descubrieron que ambos la apigenina y la luteolina son una poderosa defensa contra el cáncer de mama, reduciendo en un 19% el riesgo cuando se toma en grandes cantidades. Según un estudio publicado en el European Journal of Pharmacology los experimentos tanto in vivo como in vitro sugieren que la luteolina pudiera inhibir el desarrollo de cáncer de piel. (Express 2016)

La Luteolina y la Orientina poseen actividades farmacológicas demostradas en estudios preclínicos como antioxidantes, antiinflamatorias, antibióticas y para combatir el cáncer. (Fundación CANNA n.d.)

1.1.24.2. Los flavonoles

Los flavonoles suelen ser incoloros o amarillos y se encuentran en las hojas y en muchas flores. Los más importantes son tres: quercetina, es el flavonol amarillo del polen de muchas fagáceas (*Quercus* sp.); 7 miricetina, presente en la uva; y kaempferol, está presente en las inflorescencias y las protege de la luz ultravioleta. (Herrera 2011)

Quercetina

La quercetina es un flavonoide ampliamente distribuido en el reino vegetal. Se trata de un compuesto polifenólico presente naturalmente en vegetales, frutas, bebidas no alcohólicas y plantas medicinales (*Ginkgo biloba*, *Tilia* spp., *Aesculus hippocastanum*, etc). Por ejemplo abunda en manzanas, cebollas, té y vino tinto, en donde aparece como glucósido.

Propiedades

Actividad Antioxidante: Entre las principales virtudes de la quercetina destaca su poder removedor sobre los radicales libres, ejerciendo un papel citoprotector en situaciones de peligro de daño celular. Su capacidad antioxidante medida como Trolox es de 4.7 mM, lo que equivale a 5 veces mayor al demostrado por las vitaminas E y C. (A. n.d.)

La quercetina demostró disminuir la incidencia de infarto de miocardio y de derrames cerebrales en personas de tercera edad. Las poblaciones que consumen productos ricos en este flavonoide estadísticamente presentan menores riesgos de afecciones cardiovasculares (5). En ratas se pudo observar que la quercetina mejora la función contráctil del ventrículo izquierdo y reduce la incidencia de trastornos de la conducción cardíaca. (A. n.d.)

La quercetina disminuye la inflamación de glándulas parótidas humanas, favorece la cicatrización de heridas, en especial aquellas heridas supuradas del área maxilofacial y cuello. En ratas demostró disminuir la inflamación de retina y úvea, así como vesiculitis y perivasculitis aledañas. (A. n.d.)

1.1.25. Antioxidante

Es cualquier molécula que puede prevenir o retardar la oxidación de otras moléculas, muy a menudo sustratos biológicos como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. (CORFO-Chile 2015)

1.1.26. Acción antioxidante de flavonoides

La capacidad que presentan los polifenoles vegetales para actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos era ya conocida en los años treinta; a pesar de ello, era ignorado el mecanismo antioxidante. El creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica. (Galleano 2010)

Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica y se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas anti-prostanoide y anti-inflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación (prevención de la placa de ateroma) (SV, S & MG 1998)

Sobre la salud humana los beneficios de los flavonoides se atribuyen a menudo por su potente capacidad de actuar disminuyendo el estado de equilibrio de los radicales libres en las concentraciones de un sistema biológico. (H.C. Hung 2004) Esta capacidad podría ser posible teniendo en cuenta que los polifenoles tienen estructuras químicas de apoyo, pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres (Galleano 2010)

Diferentes informes indican que ciertos flavonoides pueden proporcionar beneficios en situaciones patológicas asociadas con una alta producción de radicales libres, por ejemplo, la hipertensión y la enfermedad cardiovascular (M. Galleano 2009) (H.C. Hung 2004)

Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones. (Korbut R 1987) Otras actividades que merecen ser destacadas son sus acciones antivirales y antialérgicas, así como sus propiedades anti-trombóticas y antiinflamatorias. (MJ 1988) (Swies J 1984)

1.1.27. Ansiedad

La definición de ansiedad es un etapa de agitación e inquietud que por lo general acompaña a la ira, el miedo o también a la felicidad. La ansiedad está unida a la supervivencia, ya que en un estado de ansiedad se incrementan las facultades perceptivas ante un peligro. Pero cuando esta característica innata del ser humano se vuelve patológica lo denominamos Trastorno de Ansiedad. (Consumo 2006)

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud) las fobias, el TOC (trastorno obsesivo-compulsivo) y los ataques de pánico forman parte de los Trastornos de Ansiedad y pueden ser tratados con psicoterapia o con fármacos ansiolíticos. (Salud 2012)

1.1.27.1. Tratamiento Convencional

Durante décadas los trastornos de ansiedad han sido y son tratados con moléculas sintéticas conocidas con el nombre de benzodiazepinas, las cuales actúan uniéndose con un receptor específico del cerebro como parte del receptor para el ácido gammaaminobutírico (GABA). Este es un neurotransmisor cuya acción sobre dicho receptor constituye la base del principal mecanismo inhibitorio de la conducción del impulso nervioso en el sistema nervioso central. Existen muchas benzodiazepinas (BDZ); entre las que destacan: clordiazepóxido, diazepam, oxazepam, clorazepato, lorazepam, prazepam, alprazolam, clonazepam, flurazepam, temazepam, triazolam, quazepam, clobazam, etcétera. (Alonso n.d.)

Uno de los graves problemas que suelen traer estas drogas, es su alta adictibilidad, ya que es muy común que una persona que toma benzodiazepinas diariamente, no pueda dejar de hacerlo en el largo plazo. Se ha comprobado que el uso repetido de estas sustancias produce tolerancia, dependencia física y psicológica, además de que la interrupción brusca de la administración prolongada se acompaña de un síndrome de abstinencia. (Alonso n.d.)

En resumen, los efectos colaterales de las benzodiazepinas incluyen: sedación y somnolencia, disminución de la atención, amnesia anterógrada (olvido de hechos recientes, con conservación de la memoria de sucesos antiguos), disminución de la agudeza mental y de la coordinación muscular (lo cual puede conducir a riesgos en sujetos que manejan o que trabajan con máquinas potencialmente peligrosas). Estos efectos se potencian con el alcohol. (Alonso n.d.)

1.1.27.2. Tratamiento Fitoterápico

Se pudo demostrar que los flavonoides de *P. edulis* y *P. incarnata* administrados por vía oral a ratas, potencian la acción del hexobarbital, prolongando así el tiempo de sueño y disminuyendo notoriamente la motilidad, sin provocar incoordinación motriz ni efectos miorelajatorios. A efectos de dilucidar el o los compuestos responsables del efecto ansiolítico, se pudo finalmente determinar que el flavonoide crisina sería el principal responsable de dicho efecto, ya que su estructura química es propia de las sustancias afines a los receptores GABA-A. De esta manera ejercería un efecto sedante similar al del diazepam, aunque diez veces menor, no ejerciendo acciones miorelajantes (Alonso n.d.)

La pasionaria presenta la cualidad de generar un sueño similar al fisiológico acompañado de un despertar rápido, sin embotamiento o borrachera matinal. Suele sinergizarse con valeriana, lúpulo, melisa o tilo en casos de insomnio. Un ensayo clínico a doble ciego de pasionaria junto a espino albar por vía oral demostró, al cabo de unas pocas semanas, mejorar la forma física en pacientes de tercera edad. (Alonso n.d.)

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Recolección de la droga vegetal

Las hojas y flores de *P. quadrangularis* se recogieron frescas y en el mejor estado posible con la ayuda de una tijera de podar, en la comunidad la Victoria cantón Cumandá perteneciente a la provincia de Chimborazo. Las muestras se tomaron en dos diferentes puntos en las siguientes coordenadas:

Primer punto

- Latitud: -2.1956165477437457
- Longitud: -79.10039665628379
- Altitud: 845 msnm

Segundo punto

- Latitud: -2.1961026226442506
- Longitud: -79.10575310582082 y
- Altitud: 400 msnm

2.2. Lugar de la investigación

La investigación se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales y en el Laboratorio de HPLC de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, dentro del Grupo de Investigación de Productos Naturales y Farmacia (GIPRONAF).

2.3. Materiales, equipos y reactivos

2.3.1. Materia vegetal

Hojas y flores de *P. quadrangularis* secadas y molidas a un tamaño de 2-3mm

2.3.2. Materiales

Tabla 1-2: Materiales utilizados en los diferentes ensayos

MATERIAL	CANTIDAD
CONTROL DE CALIDAD DE MATERIA PRIMA	
Cápsulas de porcelana	4
Pizeta	1
Reverbero	1
Pinzas para cápsulas	2
PREPARACIÓN DE EXTRACTOS	
Frascos de vidrio color ámbar	4
Reverbero	1
Termómetro	1
Balones esmerilados de 50mL	3
Embudo Büchner y Kitasato	1
TAMIZAJE FITOQUÍMICO	
Refrigerante de bolas	2
Balones esmerilados de 250mL	2
Pinzas universales	4
Mangueras	3
Reverbero	2
Embudos simples	2
Trípodes	1
Vasos de precipitación de 250mL	3
Tubos de ensayo	10
Gradilla	1
Pipeta de 5mL	1
Pipeta de 1mL	1
CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)	
Cuba cromatográfica	1
Capilares	4
Aspersor	1
EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN (ESPECTRO UV)	
Frasco de vidrio ámbar de 250mL	5
Frasco de vidrio ámbar de 10 mL	3
Vaso de 50mL	3
Espátula	1
Balones aforados de 10mL	5
Balones aforados de 25mL	2
Balones aforados de 50mL	2
Balones aforados de 100mL	2

Probeta de 50mL	1
Tubos de vidrio de 10mL	10
Celdas de cuarzo	2
Puntas azules de 1000uL	50
Puntas amarillas de 100uL	20
Paquete de papel aluminio	1
IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN HPLC	
Balón aforado de 1000mL	1
Micropipeta automática BOECO de 1000uL	1
Micropipeta automática BOECO de 100uL	1
Membrana	1
Filtro	1
Pocillos	2
Embudo de separación de fase móvil	2
Kitasato de 1000mL	1
Puntas azules de 1000uL	10
Puntas amarillas de 100uL	10
Gradilla	1
Tubos de ensayo	5
Frasco de vidrio 1000mL	2
Vasos de precipitación 50mL	2
Probeta de 100mL	1

Realizado por: Diana Muñoz, 2015

2.3.3. Equipos

Tabla 2-2: Lista de equipos utilizados en las diferentes determinaciones

ANÁLISIS	EQUIPOS
Control de calidad materia prima y Tamizaje Fitoquímico	Molino Arthur H. Thomas C.O, PHILA. PA, U.S.A
	Sonicador
	Estufa Memmert, Estufa redLINE
	Mufla OPTIC ivymen system
	Desecador
	Balanza analítica HDM ELQUITECNICA CIA. LTDA
Cromatografía en capa fina (TLC)	Vortex
	Cámara UV. ULRA- VIOLET PRODUCTSS INC. CHROMATO.vue Modelo CC-20
Extracción y cuantificación de fenoles y flavonoides totales (espectrofotómetro UV) y determinación de la actividad	Balanza analítica HDM ELQUITECNICA CIA. LTDA
	Refrigerador
	Espectrofotómetro Cole Parmer S-2150.
	Cronómetro
	Rotavapor R110

antioxidante	Vortex
	Micropipeta BOECO 1000UI
	Micropipeta BOECO 100uL
Identificación y cuantificación de flavonoides (HPLC)	Bomba de pistón GAST.
	Baño ultrasonido Branson 2510
	Liquid Chromatograph Shimadzu
	Computadora para HPLC

Realizado por: Diana Muñoz, 2015

2.3.4. Reactivos

Tabla 3-2: Lista de reactivos utilizados en los diferentes ensayos

ANÁLISIS	REACTIVOS
Tamizaje fitoquímico	<ul style="list-style-type: none"> • Reactivo de Dragendorff • Reactivo de Mayer • Reactivo de Wagner • Reactivo de Baljet • Reactivo de Lieberman Buchard • Reactivo para Catequinas • Reactivo para resinas • Reactivo de Fehling • Reactivo de FeCl3 • Reactivo de Borntrager • Reactivo de Shinoda • Reactivo de Antocianidinas • Cloruro férrico • Magnesio metálico • Cloruro de sodio (polvo) • Ácido clorhídrico
Cromatografía en capa fina (TLC)	<ul style="list-style-type: none"> • Placa cromatográfica de silica gel con fluorescencia indicador 254nm, sílica gel matrix L*W 5cm *10 cm • Acetato de etilo Reag. Ph Eur • Ácido acético glacial • Ácido fórmico 88% • Agua bidestilada • Clorofomo ACS,ISO, Reag.Ph Eur • Metanol LiChrosolv Reag. Ph Eur Grado para Cromatografía Líquida
Extracción y cuantificación de fenoles, flavonoides totales y determinación de la actividad antioxidante	<ul style="list-style-type: none"> • Soluciones de ácido gálico • Acetato de etilo 100% Reag. Ph Eur

(espectrofotómetro UV)	<ul style="list-style-type: none"> • Metanol 98% • Etanol 70% • Agua bidestilada • Nitrito de Sodio 5% • Tricloruro de aluminio 10% • Hidróxido de sodio 1M • Soluciones de quercetina • Carbonato de sodio saturado • Reactivo de Folin-Ciocalteu 20% • Reactivo DPPH • Metanol 99.83%
Identificación y cuantificación (HPLC)	<ul style="list-style-type: none"> • Hexano EMSURE ACS, Reag. Ph Eur • Etanol 70% • Ácido clorhídrico fumante 37% EMSURE ACS, Reag. Ph Eur • Cartucho en fase sólida C18 • Acetonitrilo LiChrosolv Reag. Ph Eur Grado para Cromatografía Líquida • Metanol Grado LiChrosolv Reag. Ph Eur Grado para Cromatografía Líquida • Ácido fórmico 0.1% • Agua Bidestilada • Estándares de apigenina, luteolina y quercetina

Realizado por: Diana Muñoz, 2015

2.4. Acondicionamiento de la droga vegetal

Lavado

Se lavaron con agua clorada hojas y flores con la finalidad de eliminar impurezas.

Secado y Molido:

Las hojas y las flores en mejor estado se secaron por separado en una estufa de aire caliente marca Memmert a una temperatura no mayor de 40°C, se observó que no exista humedad en las diferentes partes de la droga vegetal, se procedió a triturar en un molino de cuchillas marca Arthur H. Thomas C.O, C.O, PHILA. PA, U.S.A a un tamaño de partícula de 2-3mm; se recogió en una funda ziploc para evitar que la partes de droga vegetal obtenidas de la planta absorbiesen humedad.

2.5. Técnicas y Métodos

2.5.1. Métodos fisicoquímicos aplicados a las drogas crudas. Parámetros de control de calidad.

El control de calidad de la droga vegetal es un parámetro transcendental para garantizar la seguridad, eficacia e inocuidad de la misma, además es una medida que ayuda a identificar la especie en uso.

1. Determinación del contenido de Humedad

La humedad excesiva es un factor que hay que controlar porque puede producir una proliferación microbiana, pueden también activar enzimas; todos estos factores que conllevan a un daño de la materia vegetal.

Los límites de agua establecidos en las farmacopeas fluctúan entre 8 a 14% con mínimas diferencias entre ellas, pero de modo general debe poseer un contenido de humedad menor a 10% una droga vegetal (A. 1994) .

El contenido de humedad se efectuó por un método gravimétrico en estufa de aire caliente. (Miranda 2006)

2. Determinación de cenizas totales

Es equivalente al residuo orgánico que queda después de calcinar la droga vegetal orgánica. La cantidad de cenizas totales se evaluó mediante el método gravimétrico de incineración en mufla.(Miranda 2006)

3. Determinación de cenizas solubles en agua

Este método consiste en evaluar la cantidad de material inorgánico soluble en agua presente en las cenizas totales. La determinación de cenizas solubles en agua se realizó por un método gravimétrico se incineración en mufla (Miranda 2006)

4. Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

Este método se basa en determinar el contenido de sustancias minerales insolubles en ácido clorhídrico contenido en la droga vegetal. Son indicativas de la materia arenosa. La determinación de las cenizas insolubles en ácido clorhídrico se realizó por un método gravimétrico de incineración en mufla. (Miranda 2006)

2.5.2. Tamizaje fitoquímico

La planta fresca, seca; se sometió a una extracción según el esquema de la Figura 1-2, se obtuvo el extracto de las hojas y flores por separado y se midió el volumen obtenido y se calculó la concentración, esto es, miligramos de sustancias extraídas por mL de extracto.

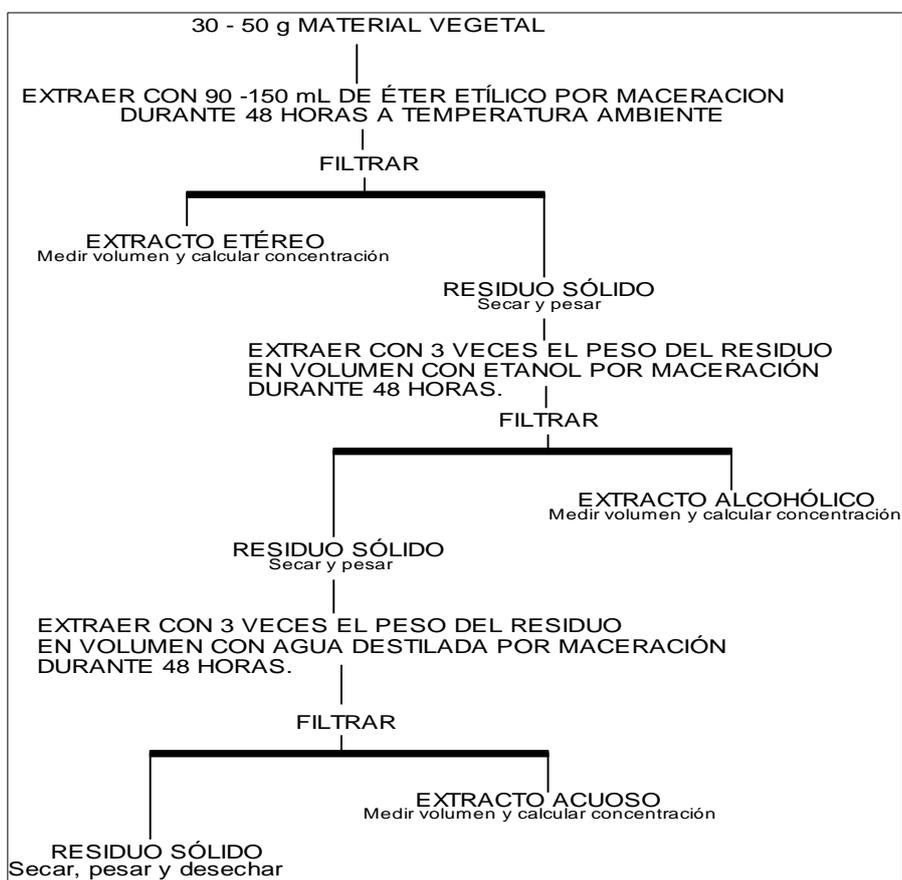


Figura 1-2: Preparación de la Materia Vegetal para el tamizaje fitoquímico
Fuente: (Miranda 2006)

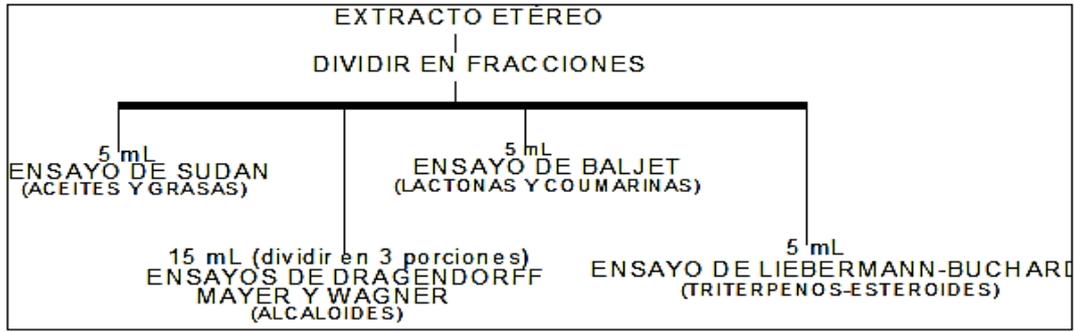


Figura 2-2: Estudio de los Grupos Funcionales del Extracto Etéreo de la materia vegetal
Fuente: (Miranda 2006)

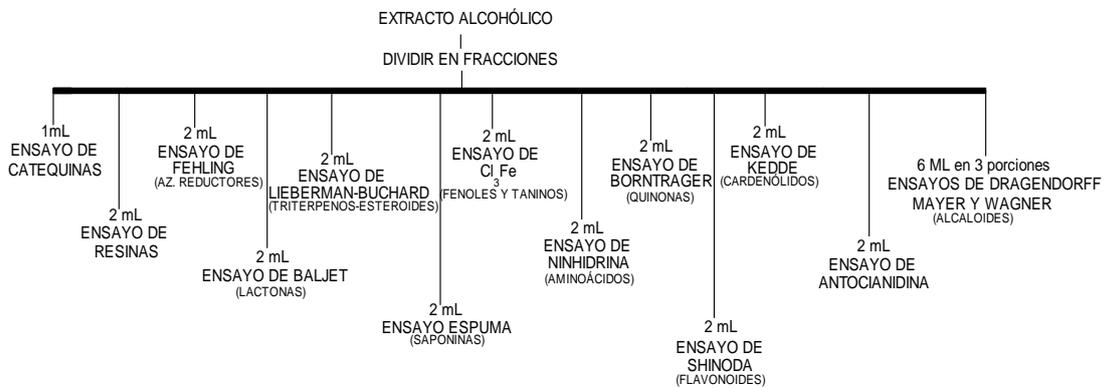


FIGURA 3-2: Estudio de los Grupos Funcionales del Extracto Alcohólico de la materia vegetal
Fuente: (Miranda 2006)

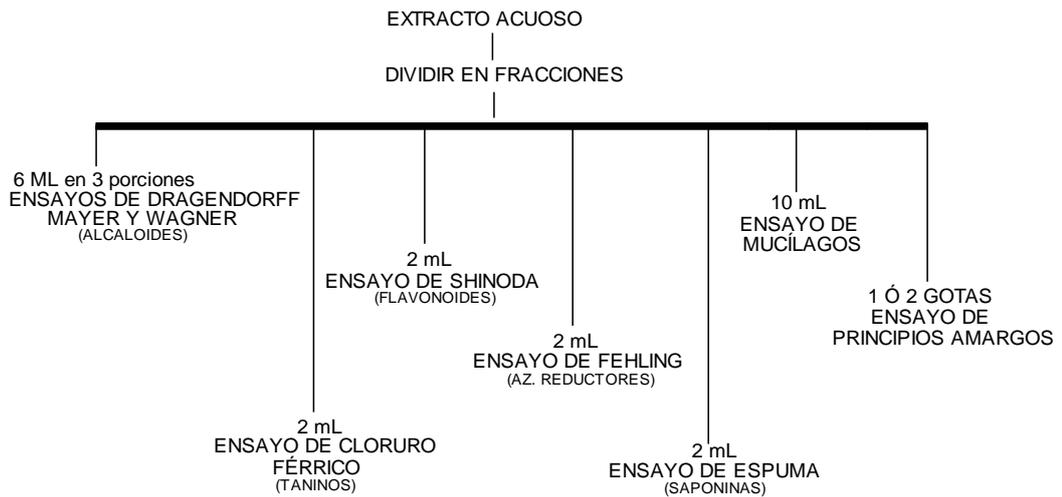


FIGURA 4-2: Estudio de los Grupos Funcionales del Extracto Acuoso de *Passiflora quadrangularis*

Fuente: (Miranda 2006)

2.5.3. Obtención de los extractos

La obtención de los extractos se realizó mediante el esquema 5-2, para la cromatografía en capa fina se realizó al extracto glicosilado y al extracto hidrolizado con diferentes sistemas de solventes; y para la cuantificación de fenoles y flavonoides mediante el método espectrofotométrico se realizó diferentes extractos siendo estos acetato de etilo, sub-extracto metanólico y extracto etanólico como se indica a continuación.

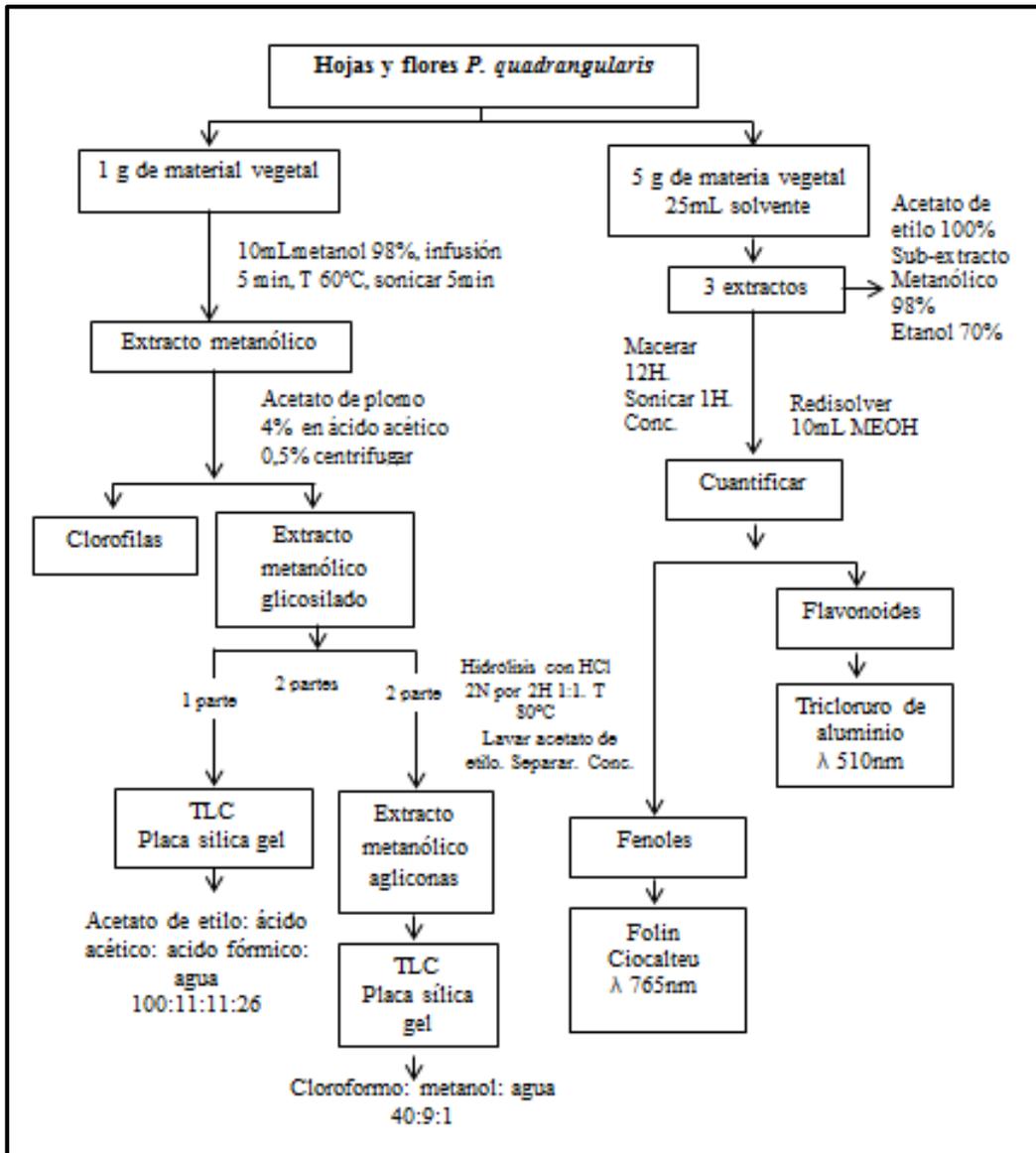


Figura 5-2: Preparación de extractos del material vegetal seco de *P. quadrangularis*

Realizado por: Diana Muñoz, 2015

Fuente: (H. Wagner 1996)

Se probó diferentes maneras de extracción y sistemas de solventes como se indica a continuación:

- Se pesó 2 g de planta en 30 mL de solventes de polaridad creciente: acetato de etilo, etanol, agua. Se sonicó por 15 minutos.
- Se realizó cromatografía en capa fina en diferentes sistema de solventes:
- Tolueno, metilisobutil cetona, acetato de etilo, agua (5: 3:1:1) en placa de sílica gel con fluorescencia indicador 254nm. (Ver Anexo D 1)

Revelador: UV

- Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético, agua, metil isobutil cetona (6:0,5:0,5,:1:4) en placa de sílica gel con fluorescencia indicador 254nm. (Ver Anexo D 2)

Revelador: Vapores de Amoniac

- Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético, agua, metil isobutil cetona (5:0,5:0, 5, 0,5:3) en placa de sílica gel con fluorescencia indicador 254nm. (Ver Anexo D 3)

Revelador: UV

- Acetato de etilo, acetona, ácido acético, agua (6:2:1:1) en placa de sílica gel con fluorescencia indicador 254nm. (Ver Anexo D 4)

Revelador: UV

- Agua, ácido fórmico, metil isobutil cetona, acetato de etilo (1:1:3:5) en placa de sílica gel con fluorescencia indicador 254nm. (Ver Anexo D 5)

Revelador: UV

- Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético, metil isobutil cetona, agua (7:0,7:0,3:2:1) en placa de sílica gel con fluorescencia indicador 254nm. (Ver Anexo D 6)

Revelador: UV

- Acetato de etilo; metil isobutil cetona, ácido fórmico, agua (50:30:10:10) en placa de sílica gel con fluorescencia indicador 254nm. (Ver Anexo D 7)

Revelador: UV

- Hexano, acetato de etilo, metanol, agua (1:0,8:1:0,8) en placa de sílica gel con fluorescencia indicador 254nm. (Ver Anexo D 8)

Revelador: UV

- Butanol; ácido acético, agua: (5:1:2) en placa de sílica gel con fluorescencia indicador 254nm

Revelador: UV

- Acetato de etilo; acetona, agua, ácido acético (5:4:0,5:0,5) en placa de poliamida. (Ver Anexo D 9)

Revelador: UV

El procedimiento y sistema de solventes que dio mejor resultado fue el siguiente:

Preparación de los extractos para TLC

- Se colocó 1g de planta en 10mL de metanol al 98%, se realizó infusión por 5 minutos a una temperatura no mayor de 60°C.
- Se sonicó durante 5 minutos
- Se filtró el extracto y se separa las clorofilas con una solución de acetato de plomo 4% en ácido acético 0.5%.
- Se centrifugo por 5 minutos y se separó el sobrenadante.
- Se separó en dos partes iguales
- Una parte se sembró en una placa de sílica gel con fluorescencia indicador 254nm, en un sistema de solventes para flavonoides glicósidos de Acetato de etilo, Ácido acético, ácido fórmico, agua 100:11:11:26. Revelador: UV
- Se realizó la hidrólisis con la otra mitad de la fracción flavónica durante 2H con HCl 2N en una relación 1:1 a una temperatura no mayor a 80 °C.
- Se realizó lavados 3 veces con 10mL de acetato de etilo y finalmente se concentró hasta 1/3 del volumen.
- Se sembró en una en una placa de sílica gel con fluorescencia indicador 254nm en un sistema de solventes de Cloroformo, metanol, agua 40:9:1. Revelador: UV

2.5.4. Cuantificación de fenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu con estándar ácido gálico

- Se preparó la muestra para la cuantificación de fenoles y flavonoides en extractos de diferente polaridad acetato de etilo, metanol, etanol al 70% en proporciones 1:5 por maceración 12 horas y sonificación una hora.
- Se filtró con una bomba de pistón GAST.

- Se concentró a sequedad en un rotavapor R110
- Se redisolvió con 10mL de metanol al 98%, se procedió a realizar las diferentes diluciones para la posterior cuantificación

Se efectuó 1 a cuantificar los fenoles totales presentes en el extracto metanólico 98%, para lo cual se preparó una curva de calibración con estándar de ácido gálico a determinadas concentraciones: 20; 40, 60, 80, 100 mg/L.

- Se realizó diluciones de los diferentes extractos de hojas en acetato de etilo al 100 % 1/500, metanol 98 % 1/500 y etanol al 70 % 1/1000
- Se realizó diluciones de los diferentes extractos de flores en acetato de etilo al 100% 1/500, metanol al 98 % 1/250 y etanol al 70% 1/500
- Se tomaron 2 mL de muestra o estándar diluido
- Se añadieron 0.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu 20 %
- Después de 5 minutos se añadieron 0.5 mL de solución de carbonato de sodio saturado (75 g/L)
- Inmediatamente se añadieron 5mL de agua destilada
- Se dejó reposar la mezcla por una hora bajo sombra a temperatura ambiente
- Se efectuaron las lecturas a una longitud de onda de 765 nm
- Se trazó la curva de calibración (concentración vs absorbancia). (Hua 2012)

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

Expresión de resultados

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

Dónde:

X= g/100g de fenoles totales expresados como ácido gálico

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

B= Volumen de redisolución (10 mL)

C= Factor de dilución de los diferentes extractos

Se calculó el porcentaje de fenoles totales de hojas y flores obtenidos en cada extracto.

2.5.5. Cuantificación de flavonoides totales mediante un método colorimétrico con estándar quercetina

Se procedió a cuantificar 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.

- Se realizó diluciones de los diferentes extractos de hojas en acetato de etilo al 100 % 1/25, en metanol al 98 % 1/50 y etanol al 70 % 1/100
- Se realizó diluciones de los diferentes extractos de flores en acetato de etilo al 100 % 1/25, en metanol al 98 % 1/25 y etanol al 70 % 1/50
- Se tomó 1 mL de la muestra o estándar diluido
- Se añadió 4 mL de agua destilada.
- A tiempo cero se añadió 0.3 mL de NaNO₂ al 5 %.
- Después de 5 minutos se añadió 0.3 mL de AlCl₃ al 10 %
- Se esperó 6 minutos y se añadió 2 mL de NaOH 1M.
- Se mezcló y se dejó en reposo por 5 minutos a temperatura ambiente bajo sombra
- Se realizó la lectura de absorbancia de la mezcla caracterizada por un color rosado a 510 nm.
- Se trazó la curva de calibración (concentración vs absorbancia) (M, Sayadi & M. 2012)

Los flavonoides totales se expresan como gramo equivalente de quercetina (QE) por 100 gramos de muestra seca

Expresión de resultados

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

Dónde:

X= g/100g de flavonoides totales expresados como quercetina

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

B= Volumen de redisolución (10 mL)

C= Factor de dilución de los diferentes extractos

Se calculó el porcentaje de flavonoides totales de hojas y flores obtenidos en cada extracto.

2.5.6. Preparación de la muestra para HPLC

Se realizó la curva de calibración con los diferentes estándares apigenina, luteolina, quercetina en distintas concentraciones de 0.1, 0.5, 1.5 y 10 ppm y se inyectó la muestra preparada de hojas y flores de *P. quadrangularis* según el siguiente esquema.

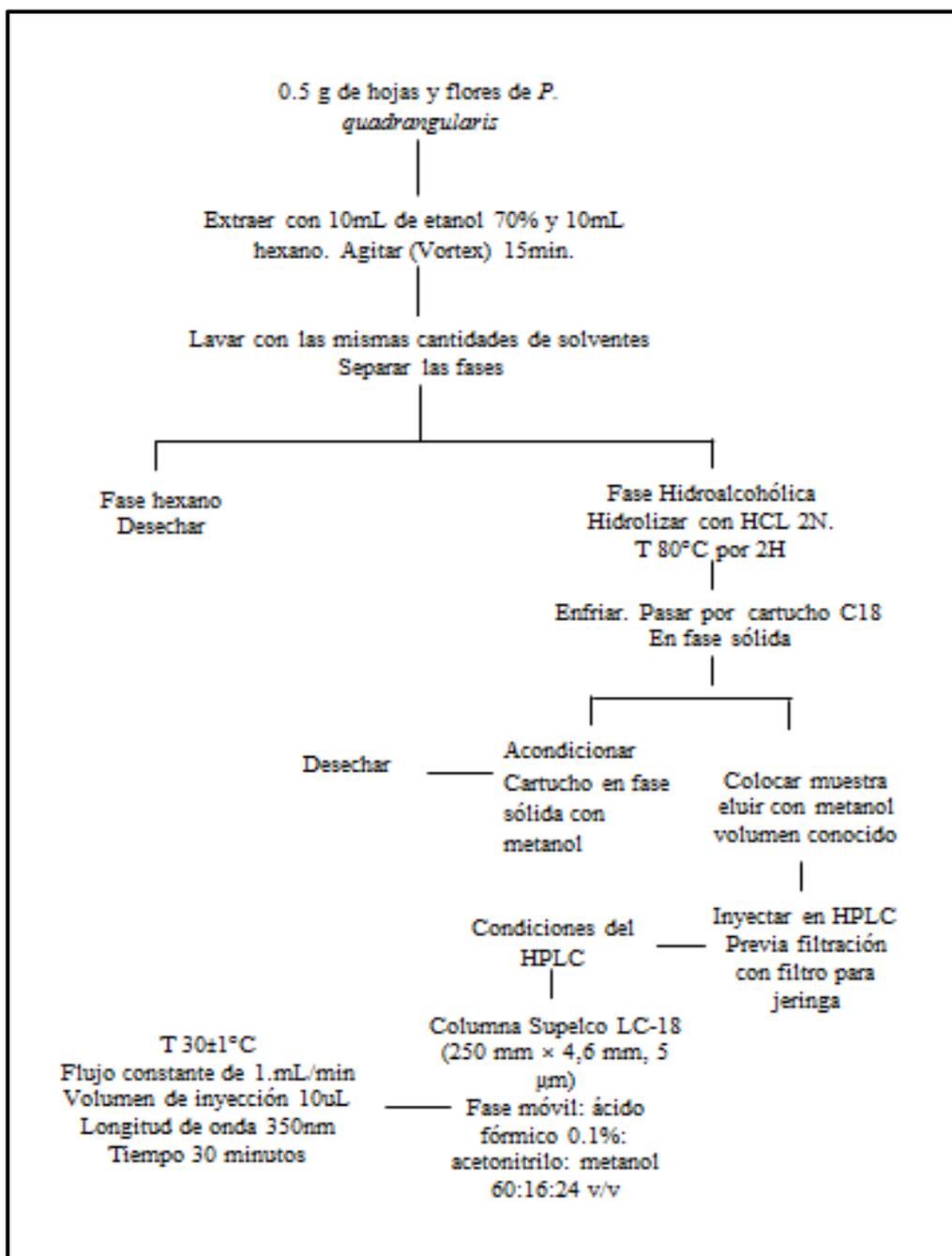


Figura 6-2: Preparación de la muestra para HPLC

Realizado por: Diana Muñoz, 2015

Fuente: (Zhongjian Chen 2012)

Extracción de Glicósidos y Agliconas

- La extracción se realizó a partir de 0.5g de materia vegetal.
- Se colocó en un tubo de vidrio borosilicato 3.3 roscado con tapón de rosca y arandela de butilo (100*26mm) con capacidad de 20mL.
- Se adicionó 10 mL de una solución de etano al 70 % y 10 mL de hexano.
- Se cerró el tubo con su respectivo tapón, se agitó vigorosamente mediante un agitador magnético vórtex por 15 min.
- Se filtró y se enjuagó el residuo con un volumen adicional de hexano y etanol al 70 % (10 mL de cada uno)
- La solución obtenida se trasladó a un embudo de separación, se dejó reposar por 5 minutos y se separó las fases. La fase hidroalcohólica contiene los compuestos flavónicos. (Oyvind & Kenneth 2005)
- Se realizó la hidrólisis con HCl 2N a una temperatura de 80 °C
- Se acondicionó el cartucho en fase sólida C18 con metanol grado HPIC.
- Se colocó la muestra hidrolizada y se eluyó con 25 mL de metanol grado HPLC.

Cuantificación de flavonoides

- Para el análisis de agliconas mediante HPLC se utilizó las siguientes condiciones cromatográficas Columna Pelco LC-18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm) Fase móvil: ácido fórmico 0.1%: acetonitrilo: metanol 60:16:24 v/v, Temperatura 30±1°C, flujo constante de 1 mL/min, volumen de inyección 10 μL, longitud de onda 350nm, tiempo 30 minutos (Zhongjian Chen 2012)
- La fase móvil fue desgasificada y la muestra filtrada en filtro para jeringa.
- Este tratamiento fue aplicado a hojas y flores de *P. quadrangularis*

2.5.7. Capacidad Captadora de radicales libres DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)

Este método fue propuesto por Blois (1958) en el cual se demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH• para aceptar un átomo de hidrógeno H• proveniente de una molécula de cisteína.

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual

la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm. (Ojha H. & N.K. 2012)

Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno como se muestra en la siguiente figura, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes, la literatura ha revelado que la mayoría de los estudios están basados en un tiempo de reacción de 20-30 min en vez de un tiempo de reacción total de 120 minutos requerido para alcanzar el estado estacionario y completar la reacción. (Ojha H. & N.K. 2012)

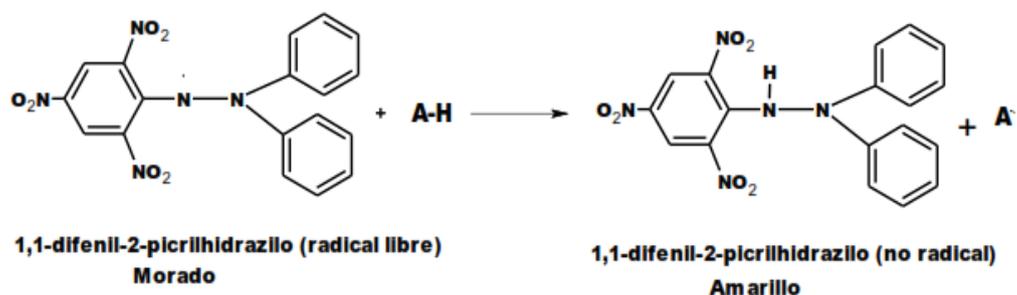


Figura 7-2: Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante

Fuente: (Alam Md. N. & Bristi N.J. 2012)

Para la determinación de la capacidad antioxidante se elaboró los extractos de hojas y flores, la solución DPPH y se procedió el ensayo según el siguiente esquema:

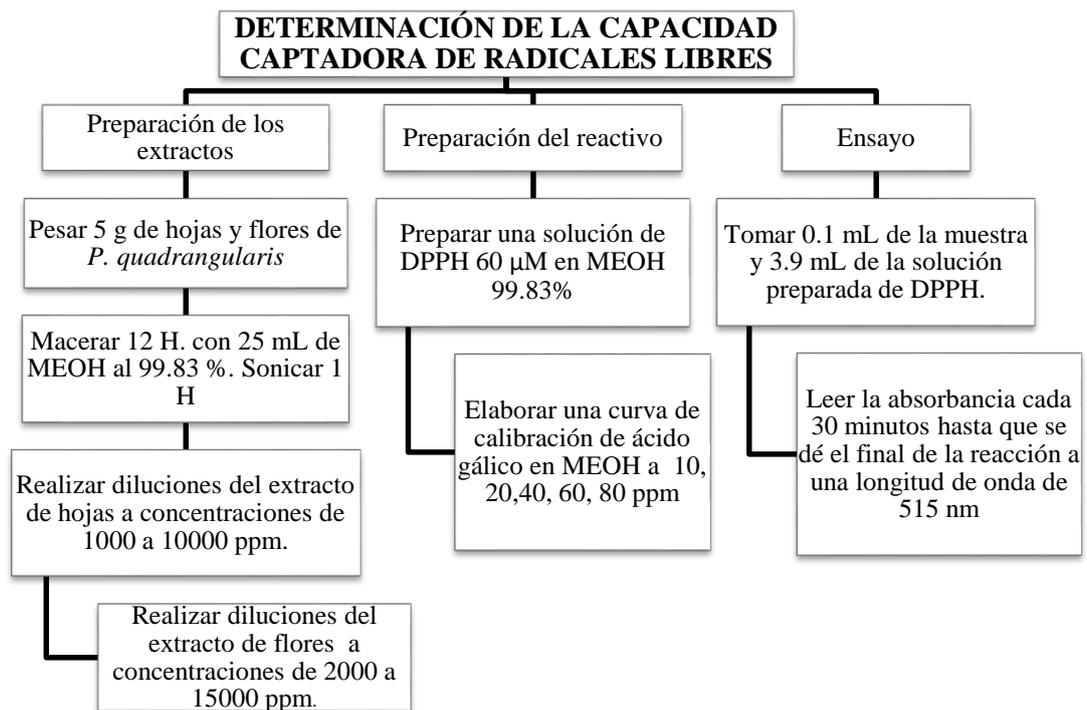


Figura 8-2: Determinación de la capacidad antioxidante

Realizado por: Diana Muñoz, 2015

Fuente: (W. Brands Williams & Berset 1994)

Preparación de la muestra para determinar la actividad antioxidante

- Para realizar los extractos se procedió a pesar 5 g de hojas y flores de *P. quadrangularis*, se maceró durante 12 horas con 25 mL de metanol y se sonicó por 1 hora.
- Para la determinación de la actividad antioxidante se preparó una solución 60 µM del reactivo DPPH en metanol al 99.83%.
- Se elaboró una curva de calibración a concentraciones de 10, 20,40, 60, 80 ppm de ácido gálico en metanol.
- Se realizó una curva de calibración del extracto metanólico 99.83% de hojas de *P. quadrangularis* a concentraciones de 1000 a 10000ppm.
- Se elaboró una curva de calibración del extracto metanólico 99.83% de flores de *P. quadrangularis* a concentraciones de 2000 a 15000 ppm.
- Para realizar el ensayo se tomó 0.1mL de la muestra y 3.9mL de la solución preparada de DPPH.
- Se efectuó las lecturas cada 30 minutos hasta que se dé el final de la reacción a una longitud de onda de 515nm (W. Brands Williams & Berset 1994)

Los resultados se expresan como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria IC50, definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración

inicial de DPPH al 50%. Este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto. Un valor IC50 menor indica una mayor actividad antioxidante.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Después de realizar los diferentes análisis a la droga seca descritos en el capítulo anterior se obtuvieron los siguientes resultados:

3.1. Control de calidad de la materia vegetal

TABLA 1-3: Control de calidad de las hojas y flores secas de *P. quadrangularis*

PARÁMETRO	HOJAS DE <i>P. quadrangularis</i>	FLORES DE <i>P. quadrangularis</i>	ESPECIFICACIONES (USP #28)
Contenido de Humedad (%)	8.09±0.04	8.71±0.06	7-14%
Contenido de Cenizas Totales (%)	8,43±0.07	8,06±0.10	Hasta 12%
Contenido de Cenizas Solubles en Agua (%)	4,60±0.15	3,61±0.10	Hasta 7%
Contenido de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico	4,63±0.07	3,81±0.06	Hasta 5%

Realizado por: Diana Muñoz, 2015

Todos los parámetros de control de calidad analizados de hojas y flores de *P. quadrangularis*, como humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua, cenizas insolubles en ácido clorhídrico, se encuentran dentro de las especificaciones de la USP #28 y también de la Norma Ecuatoriana de Fitoterápicos, (NEFT) (Rea 20014).

Es decir que la materia prima se encontró en buenas condiciones, asegurando la estabilidad de la misma, por lo tanto, los procedimientos de recolección y almacenamiento fueron los adecuados interpretando según los resultados una menor cantidad de minerales, metales pesados, alcalinos, contaminación con sílice, descartando de esa manera cualquier contaminante proveniente de la área de recolección haciéndola apta para el siguiente estudio.

3.2. Tamizaje fitoquímico

CONCENTRACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES Y % DE EXTRACCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS Y FLORES DE *P. quadrangularis*

TABLA 2-3: Concentración de sólidos totales de los extractos de hojas de *P. quadrangularis*

EXTRACTOS DE HOJAS	CONCENTRACIÓN g/MI	% DE EXTRACCIÓN
ETEREO	9.1±0.0005	53%
ALCOHÓLICO 98%	22.6±0.0012	70%
ACUOSO	27.4±0.018	34%

Realizado por: Diana Muñoz

TABLA 3-3: Concentración de sólidos totales de los extractos de flores de *P. quadrangularis*

EXTRACTOS DE FLORES	CONCENTRACIÓN g/mL	% DE EXTRACCIÓN
ETEREO	9.8±0.0002	20%
ALCOHÓLICO 98%	67.5±0.0784	80%
ACUOSO	19.1±0.0019	69%

Realizado por: Diana Muñoz

Mediante este parámetro se determinó el porcentaje de extracción de los diferentes sub-extractos, demostrando que el mejor solvente para la extracción tanto de hojas como de flores de *P. quadrangularis* es alcohol 98% dando como resultado un 70 y 80% respectivamente; siendo los valores más altos que de los solventes etéreo y acuoso. En cambio en lo que respecta a sólidos totales la mayor concentración se obtuvo en el extracto acuoso 27.4±0.018 mg/mL de hojas y en flores en el extracto alcohólico 67.5±0.0784 mg/mL. Indicativos que después de la evaporación donde se queda mayor cantidad de residuos son en estos extractos.

TABLA 4-3: Tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso de hojas de *Passiflora quadrangularis*

Ensayo	Metabolito	Ex. Etéreo	Ex. Alcohólico	Ex. Acuoso
Sudán	Aceites y grasas	+++		
Dragendorff	Alcaloides	-	+	+
Mayer	Alcaloides	-	+	+
Wagner	Alcaloides	-	+	+
Baljet	Lactonas y Cumarinas	-	++	
Liebermann-Buchard	Triterpenos y/o esteroides	+++	++	
Catequinas	Catequinas		-	
Resinas	Resinas		-	
Fehling	Azúcares reductores		-	-
Espuma	Saponinas		+++	+++
Cl ₃ Fe	Taninos		++ Coloración verde intensa	+++ Coloración verde intensa
Borntrager	Quinonas		-	
Shinoda	Flavonoides		++ Coloración amarilla	++ Coloración Amarilla
Antocianidina	Flavonoides		++	
Mucílagos	Mucílagos			-
Principios Amargos	Principios amargos			+

Realizado por: Diana Muñoz, 2015. Negativo (-), Posible presencia de metabolito (+), Modera presencia (++), Alta presencia(+++)

TABLA 5-3: Tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso de flores de *Passiflora quadrangularis*

Ensayo	Metabolito	Ex. Etéreo	Ex. Alcohólico	Ex. Acuoso
Sudán	Aceites y grasas	+++		
Dragendorff	Alcaloides	-	+	+
Mayer	Alcaloides	-	+	+
Wagner	Alcaloides	-	+	+
Baljet	Lactonas y Cumarinas	-	-	
Liebermann-Buchard	Triterpenos y/o esteroides	+++	++	
Catequinas	Catequinas		+	
Resinas	Resinas		-	
Fehling	Azúcares reductores		-	+
Espuma	Saponinas		+	++
Cl ₃ Fe	Taninos		++ Coloración rojo vino	+++ Coloración rojo vino
Bortrager	Quinonas		-	
Shinoda	Flavonoides		+++ Coloración roja	+++ Coloración roja
Antocianidina	Flavonoides		+++	
Mucílagos	Mucílagos			-
Principios Amargos	Principios amargos			++

Realizado por: Diana Muñoz, 2015. Posible presencia de metabolito (+), Modera presencia (++), Alta presencia (+++)

TABLA 6-3: Glicósidos cianogénicos

GLICÓSIDOS CIANOGENICOS	
HOJAS	NEGATIVO
FLORES	POSITIVO

Realizado por: Diana Muñoz, 2015.

El tamizaje fitoquímico consiste en identificar la presencia o ausencia cualitativamente de grupos funcionales o metabolitos secundarios apreciados colorimétricamente o por precipitación. Método de gran importancia que se realizó por medio de extracciones con solventes de polaridad creciente como son éter, alcohol 98% y agua.

En los extractos de hojas se puede identificar en mayor cantidad la presencia de aceites, grasas, lactonas, cumarinas, triterpenos, saponinas, taninos, flavonoides y menor cantidad o casi nula la presencia de alcaloides. En los extractos de flores se puede identificar metabolitos secundarios tales como aceites, grasas, triterpenos, taninos, flavonoides y la presencia de glicósidos cianogénicos; en cantidades más pequeñas alcaloides, catequinas, saponinas y azúcares reductores.

Estos resultados se comprobaron bibliográficamente con varios estudios realizados de la especie *Passiflora quadrangularis* donde (Medina JE 1977) realizando un tamizaje fitoquímico de las partes aéreas evidencia la presencia de fenoles, saponinas, terpenos, taninos, (Koch H 1980) da a conocer la presencia de cumarinas; (Okamoto Y 1994) observa flavonoides y específicamente en flores Billot (J 1974) indica flavonoides con actividad sedante. Resultados del tamizaje fitoquímico realizado en hojas de *P. quadrangularis* por Pollyanna Celso y colaboradores evidencia la presencia de flavonoides, taninos, saponinas, triterpenos y esteroides. (Castro, Silva & Mendes 2007). Se encontró un estudio realizado de las partes aéreas de esta especie por (Ventura 2003) donde se corrobora la presencia de flavonoides y no se identifica la presencia de alcaloides.

Un trabajo de estudios fitoquímicos y farmacológicos de catorce especies de *Passiflora* realizado por (BIRK 2005) indica la presencia de saponinas y flavonoides. Otro estudio realizado por (Kamaldeep, Dahan & Sharma 2004) indica de manera general que las hojas del género *Passiflora* poseen alcaloides, saponinas, polifenoles, compuestos cianogénicos.

De esa manera se comprueba cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios que probablemente serán los responsables de la actividad terapéutica del presente estudio.

3.3. Cromatografía en Capa Fina de la fracción glicosilada

Se realizó la cromatografía en capa fina del extracto glicosilado de hojas y flores de *P. quadrangularis* utilizando las siguientes fases:

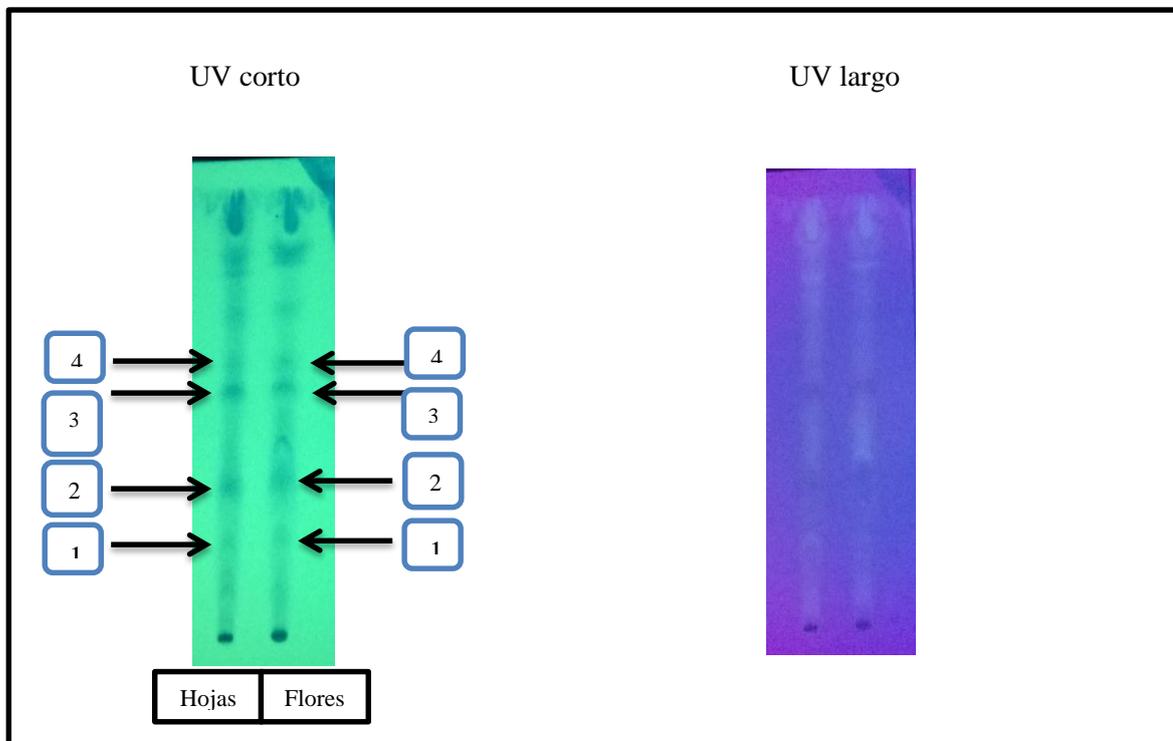


Figura 1-3: Cromatografía en capa fina de la fracción flavónica glicosilada de hojas y flores de *P. quadrangularis*

Realizador por: Diana Muñoz, 2015

Adsorbentes: Sílica gel con fluorescencia indicador 254nm, sílica gel matrix L*W 5cm *10 cm

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

Revelador: UV λ larga λ corta

Los resultados obtenidos del cálculo del factor retención según la distancia de la solución de prueba y distancia del frente del solvente se indican en la siguiente tabla:

TABLA 7-3: Resultados de la determinación del Factor de Retención de la cromatografía en capa fina de la fracción flavónica de hojas y flores de *P. quadrangularis*

Rf Hojas	Rf flores	Rf referencia	
0.12	-	-	
0.23	0.24	1. Vitexin -2 "O'Glucósido	0,28
0.35	0,36	2. Vitexin 2" O ramnosido	0.37
0.55	0.57	3. Orientina	0.57

0.62	0.62	4. Vitexina	0.62
0.72	0.71	-	
0.85	0.86	-	

Realizado por: Diana Muñoz, 2015

Fuentes: Rf. (H. Wagner 1996)

Calculo de la constante dieléctrica

$$\epsilon_r = \frac{(6.02 \cdot 100) + (6.15 \cdot 11) + (58 \cdot 11) + (80.1 \cdot 26)}{148} = 22.9$$

La constante dieléctrica de la fase móvil: Acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua 100:11:11:26 utilizada para separar compuestos glicosilados es 22.9, al calcular el factor de retención según la referencia bibliográfica de Wagner se encontró en el extracto metanólico de hojas y flores de *P. quadrangularis* la posible presencia de Vitexin -2 "O'Glucósido, Vitexin 2" O ramnosido, Orientina y Vitexina; el cual coincide con un estudio realizado por (Gesion & Gazola 2013) en hojas de *P. quadrangularis* indicando la presencia de Vitexin 2" O ramnosido; el estudio realizado por (H. Wagner 1996) indica la presencia de flavonoides C-glicosidos en *P incarnata* encontrando vitexina, isovitexina orientina, isorientina; (Kamaldeep Dhawan 2004) reporta de manera general que puede ser encontrado en hojas de Passiflora flavonoides C – glicosidos tales como vitexina, isovitexina, orientina, isoorientina y apigenina.

3.4. Cromatografía en Capa Fina de la fracción hidrolizada

Con la finalidad de comprobar la posible presencia de flavonoides tipo agliconas se realizó la cromatografía de la fracción flavónica hidrolizada con los respectivos estándares se utilizó:

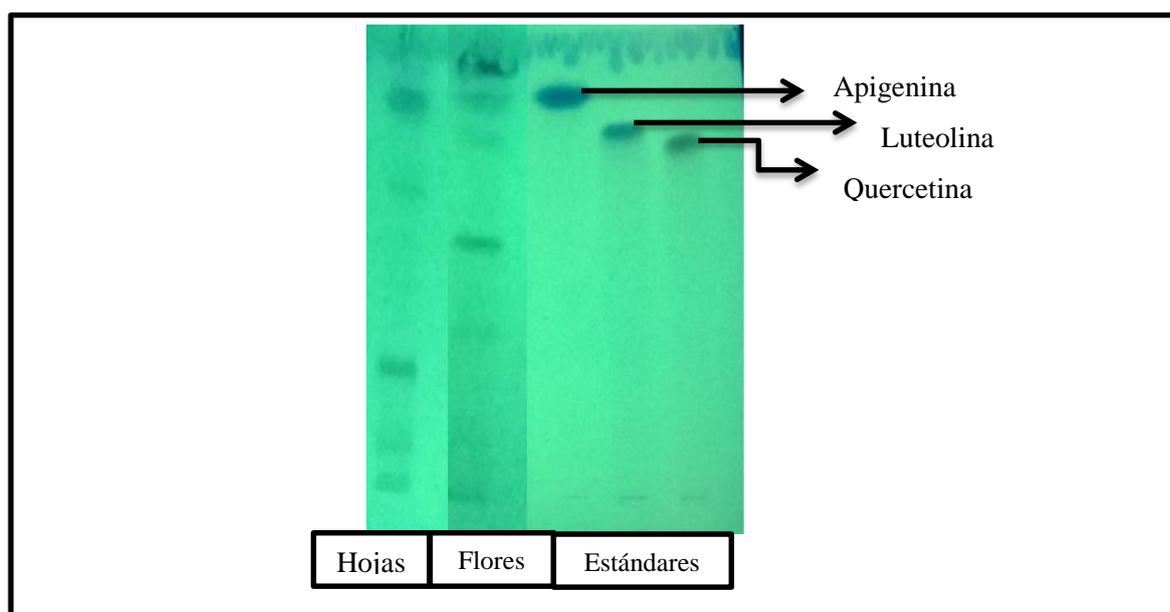


Figura 2-3: Cromatografía en capa fina de la fracción flavónica hidrolizada de hojas y flores de *P. quadrangularis* con los respectivos estándares

Realizador por: Diana Muñoz, 2015

Adsorbentes: Sílica gel con fluorescencia indicador 254nm, sílica gel matrix L*W 5cm *10 cm

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

Revelador: UV λ larga λ corta

Calculo de la constante dieléctrica

$$\epsilon_r = \frac{(4.8*40)+(33.6*9)+(80.1*1)}{50} = 11.49$$

Se realizó la cromatografía de la fracción flavónica hidrolizada en un sistema de solventes polar Cloroformo-metanol-agua 40:9:1 con una constante dieléctrica 11.9 y también los estándares de apigenina, luteolina y quercetina a una concentración de 200 ppm disueltos en metanol y etanol, indicando la posible presencia de apigenina en el extracto de hojas con propiedades farmacológicas como anti inflamatorias, antioxidantes, antiangiogénicas y antialérgicas que podrían reducir el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer como los de mama, estómago, piel y próstata. (Toxicology 2013). Además presenta propiedades ansiolíticas en modelos de conducta en ratones con escasa actividad sedante y miorelajante. (Estrada-Reyes, Ubaldo-Suárez & Araujo-Escalona 2012) Y en el extracto de flores apigenina y luteolina este último posee actividades farmacológicas demostradas en estudios preclínicos como antioxidantes, antiinflamatorias, antibióticas y para combatir el cáncer. (Fundación CANNA n.d.)

3.5. Cuantificación de Fenoles y Flavonoides mediante espectrofotometría

El cuadro 8-3 indica el porcentaje de rendimiento de los diferentes extractos realizado a hojas y flores de *P. quadrangularis* para la cuantificación de fenoles y flavonoides totales.

TABLA 8-3: Porcentaje de rendimiento de los diferentes extractos

EXTRACTOS	% RENDIMIENTO	
	HOJAS	FLORES
Acetato de etilo 100%	1.038	1.046
Metanol 98%	18.73	20.30
Etanol 70%	20.31	27.40

Realizado por: Diana Muñoz, 2015

El mejor agente de extracción presenta el extracto hidroalcohólico al 70% con mayor porcentaje de rendimiento, seguido de metanol al 98% y acetato de etilo al 100% para hojas y

flores; indicativo que existe mayor concentración de flavonoides de alta polaridad y muy pocos de mediada polaridad en el caso del acetato de etilo.

3.5.1. Cuantificación de fenoles

Se elaboró la curva de calibración de fenoles a diferentes concentraciones de ácido gálico en metanol al 98% como indica en la siguiente tabla, para la posterior cuantificación de los extractos de acetato de etilo al 100%, sub-extracto de metanol al 98% y extracto etanólico al 70% de hojas y flores de *P quadrangularis* mediante el método de Folin-Ciocalteu.

TABLA 9-3: Curva de calibración de ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu.

CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO	
Concentración ppm	Absorbancia
20	0.074
40	0.085
60	0.098
80	0.111
100	0.123

Realizado por: Diana Muñoz, 2015

Se realizó diferentes diluciones de los extractos a una concentración en la cual el contenido de fenoles se encontraba dentro del intervalo de la curva patrón; el ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresaron en mg/g de ácido gálico, se obtuvo la ecuación de la recta $y=0.0006x + 0.061$ con un coeficiente de correlación $R^2=0.9992$; como indica el Anexo F, tomando en cuenta la dilución de los diferentes extractos y sub-extractos, el volumen de redisolución y la concentración se encontró los siguientes datos:

TABLA 10-3: Resultados de la Cuantificación de fenoles totales de los diferentes extractos de hojas y flores de *P. quadrangularis*

CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES EXPRESADOS COMO ÁCIDO GÁLICO						
EXTRACTO	ACETATO DE ETILO 100%		METANOL 98%		ETANOL 70%	
	mg/g	%	mg/g	%	mg/g	%
HOJAS	65±1.67	6.5±0.17	57.77±0.98	5.78±0.092	131.11±1.93	13.11±0.19
FLORES	56.64±1.67	5.66±0.17	28.61±0.48	2.83±0.046	72.5±1.18	7.25±0.11

Realizado por: Diana Muñoz, 2015.

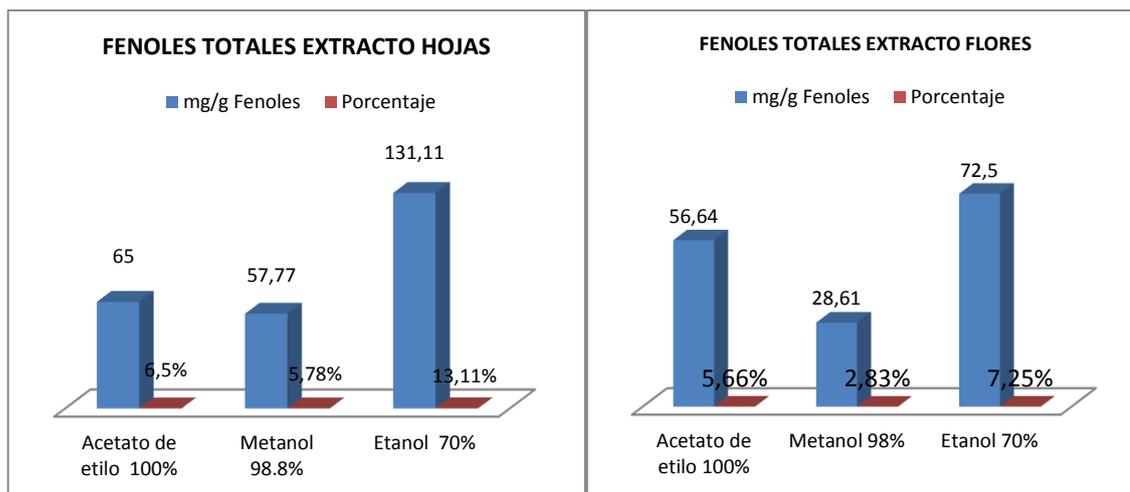


Figura 3-3: Representación gráfica de Fenoles totales de hojas y flores en los diferentes extractos

Realizado por: Diana Muñoz, 2015

En las figuras anteriores se puede visualizar claramente que el extracto etanólico al 70% presenta un contenido de fenoles más alto que el extracto de acetato de etilo al 100% y metanol al 98% en hojas y flores comparando con un estudio realizado por el mismo método del fruto de *P. quadrangularis* (tumbo costeño) realizado en Perú en un extracto etanólico al 60% indica un contenido de 14.78 mg de ácido gálico/g de muestra. (Ana María Muñoz Jáuregui 2007); otro estudio realizado de la evolución de fenoles totales en el extracto metanólico de hojas de *P. quadrangularis* indica 21.7 mg/g de muestra y alrededor de un 2.7% de fenoles totales (Ramaiya, Bujang & Zakaria 2014); lo que quiere decir que las partes aéreas de *P. quadrangularis* según los extractos analizados indican un contenido mayor de fenoles totales; podría deberse a que hojas y flores (compuestos flavonoides) actúan como agentes protectores frente a patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa a condiciones de estrés, tales como infecciones, radiaciones UV, entre otros.

3.5.2. Cuantificación de flavonoides

Se elaboró la curva de calibración de flavonoides a diferentes concentraciones de quercetina en metanol al 98% como indica en la posterior tabla; para la cuantificación de los extractos de acetato de etilo al 100%, metanol al 98% y etanol al 70% de hojas y flores de *P. quadrangularis* mediante el método de tricloruro de aluminio.

TABLA 11-3: Concentraciones de la Curva de calibración de quercetina por el método de tricloruro de aluminio

CURVA DE CALIBRACIÓN DE QUERCETINA	
Concentración ppm	Absorbancia
20	0.046
40	0.067
60	0.090
80	0.113
100	0.138

Realizado por: Diana Muñoz, 2015

Se realizó diferentes diluciones de los extractos a una concentración en la cual el contenido de flavonoides se encontraba dentro del intervalo de la curva patrón; el ensayo se efectuó por triplicado y los resultados se expresaron en mg/g de quercetina, se obtuvo la ecuación de la recta $y=0.0012x + 0.0218$ con un coeficiente de correlación $R^2=0.9991$; como indica el Anexo G tomando en cuenta la dilución de los diferentes extractos y sub-extractos, el volumen de redisolución y la concentración se encontró los siguientes datos:

TABLA 12-3: Resultados de la Cuantificación de flavonoides totales de los diferentes extractos de hojas y flores de *P. quadrangularis*

CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES EXPRESADOS COMO QUERCETINA						
EXTRACTO	ACETATO DE ETILO 100%		METANOL 98%		ETANOL 70%	
	mg/g	%	mg/g	%	mg/g	%
HOJAS	3.16±0.32	0.32±0.00	4.88±0.04	0.48±0.00	11.76±0.0	1.18±0.01
FLORES	2.57±0.02	0.26±0.005	2.46±0.023	0.25±0.005	5.46±0.051	0.54±0.005

Realizado por: Diana Muñoz, 2015

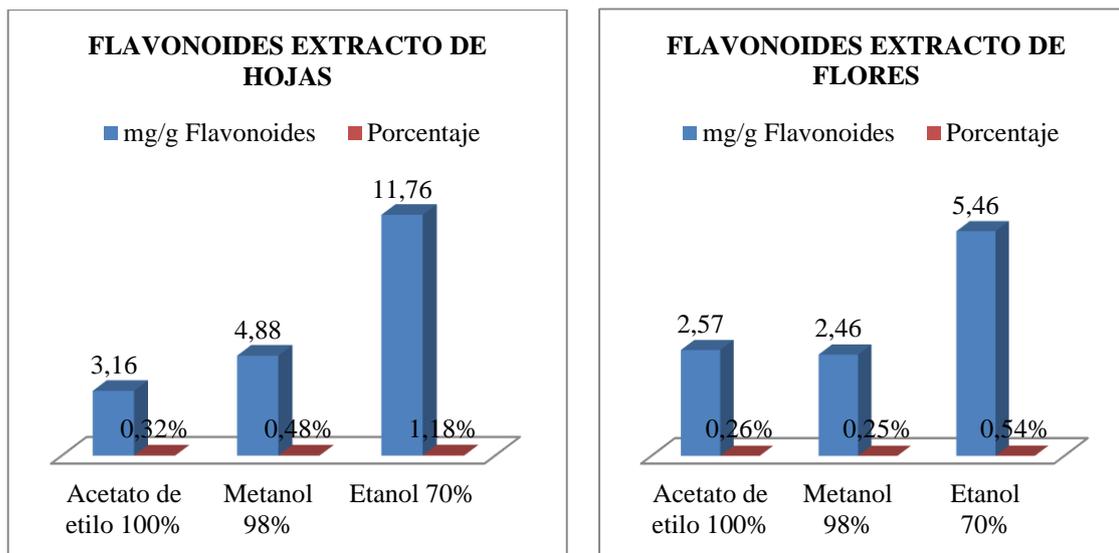


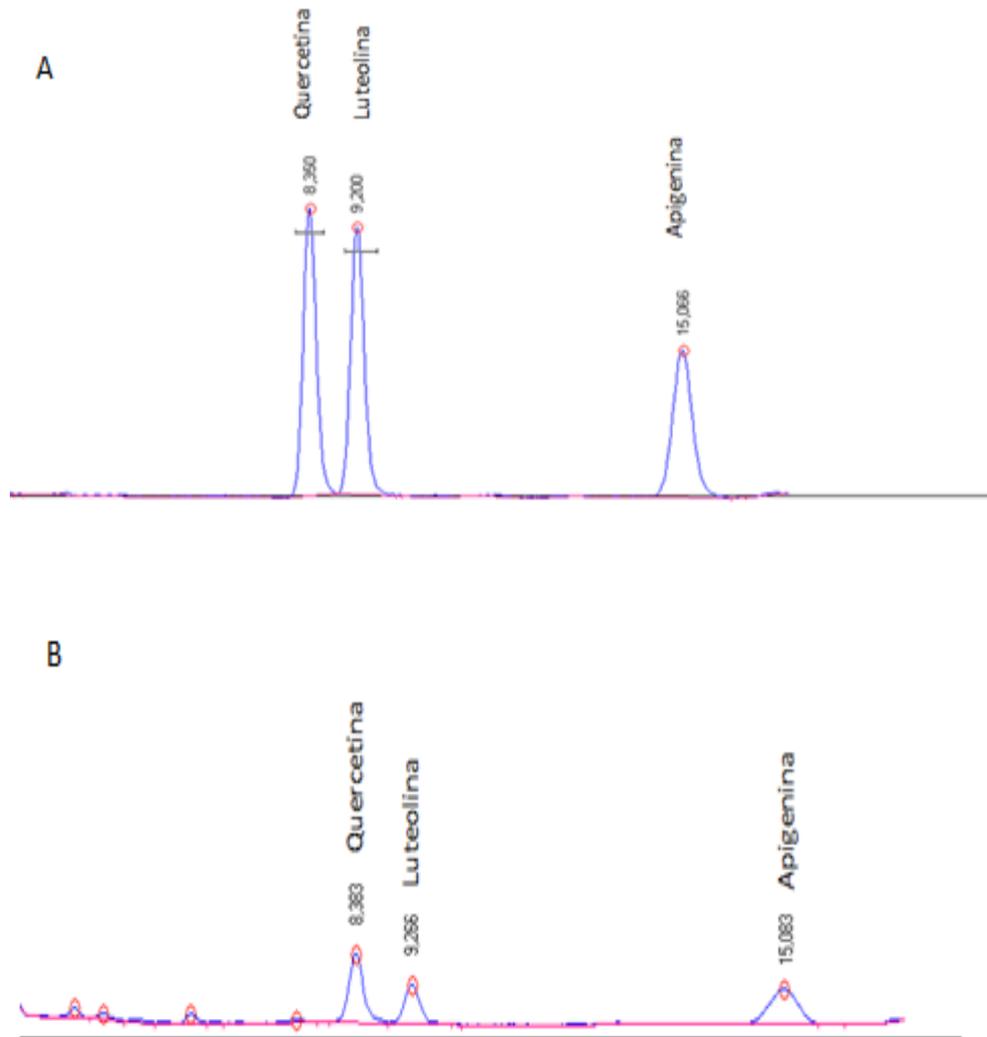
Figura 4-3: Representación gráfica de Flavonoides de los diferentes extractos de hojas y flores
Realizado por: Diana Muñoz, 2015

La mayor concentración de flavonoides totales expresados como quercetina contiene los extractos de etanol al 70%; $11.76 \pm 0.098 \text{ mg/g}$ de la planta seca y alrededor de 1.18% para hojas y $5.46 \pm 0.051 \text{ mg/g}$ de planta y alrededor de 0.54% para flores de *P. quadrangularis* en relación con los extractos de acetato de etilo al 100% y metanol al 98%. Este porcentaje se podría corroborar bibliográficamente con una publicación de Hernández indicando que las partes aéreas secas de *P. incarnata* deben contener al menos 0,3% a 0,4% de flavonoides expresados como hiperósidos (compuesto químico, es la 3 - O - galactósido de quercetina) o al menos 0,8% de flavonoides expresados como vitexina; es una especie muy estudiada y usada para la intranquilidad nerviosa, insomnio moderado, trastornos gastrointestinales nerviosos. (Hernández 2006). Según los análisis realizados en la especie *P. incarnata* por (H. Wagner 1996) presenta del 0.4% al 1.2% de flavonoides C-glicosidos. Por lo que se podría decir que las concentraciones de flavonoides que se encontró en los diferentes extractos de *P. quadrangularis* se encuentra muy cercano a la de esta especie ya estudiada.

La concentración de flavonoides en las partes de la planta analizadas es baja debido a que la altitud en la que se encuentra es a 400msnm, dónde las radiación UV no es tan elevada disminuyendo de esa manera la concentración de estos metabolitos; sin embargo es en las hojas donde se evidencia mayor cantidad de flavonoides esto se debe a que son las partes más expuesta por tal razón incrementa la concentración de estos metabolitos como mecanismo de defensa que le protege de las mismas radiaciones, depredadores, patógenos, nematodos, hongos, bacterias para mejorar el crecimiento y consistencia de la planta (Valares 2011).

3.6. Identificación y cuantificación mediante HPLC

Se inyectaron 10 μL en el HPLC de estándares de quercetina 10 $\mu\text{g/mL}$, luteolina 5 $\mu\text{g/mL}$, apigenina 5 $\mu\text{g/mL}$ y la muestra hidrolizada de hojas y flores de *P. quadrangularis* contenidas en un volumen de 25 mL preparadas en metanol grado HPLC.



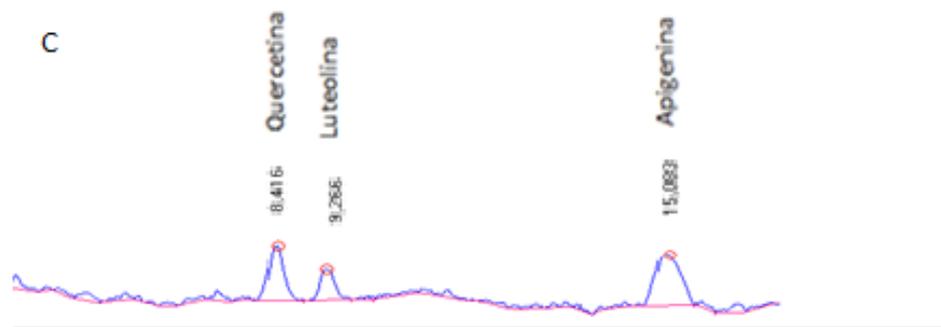


Figura 5-3: Cromatograma HPLC (A) estándar de quercetina, luteolina apigenina (B) Muestra hidrolizada de extracto metanólico de hojas. (C) Muestra hidrolizada del extracto metanólico de flores
Realizado por: Diana Muñoz, 2015

Comparando los tiempos de retención de dichos estándares con los que se detectó en hojas y flores de *P. quadrangularis* los tiempos coinciden por lo que se puede decir que en la especie en estudio existe la presencia de los tres compuestos en cantidad muy pequeña; para la cual se realiza la cuantificación de los mismos. Este dato se puede comparar con un estudio realizado en el pericarpio de *P. quadrangularis* donde indican la presencia de apigenina y posiblemente le atribuyen un efecto sedativo a este compuesto ya que realizaron estudios *in vivo* pero quedó pendiente corroborar con estudios *in vitro*. (Gazola, Costa & Castellanos 2015)

Cuantificación de quercetina, luteolina y apigenina

Para cuantificar quercetina, luteolina y apigenina en hojas y flores de *P. quadrangularis* se elaboró la curva de calibración a diferentes concentraciones de los estándares de quercetina, luteolina y apigenina como se indica en el Anexo I-L, obteniendo los siguientes datos:

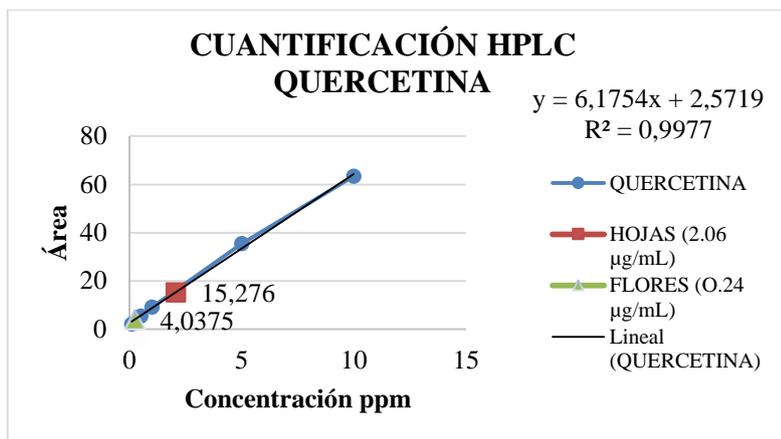


Figura 6-3: Cuantificación de Quercetina
 Realizado por: Diana Muñoz, 2016

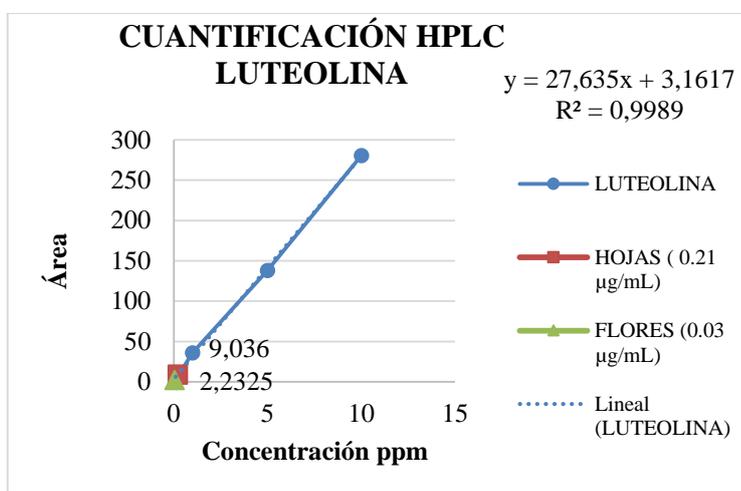


Figura 7 -3: Cuantificación de Luteolina
 Realizado por: Diana Muñoz, 2016

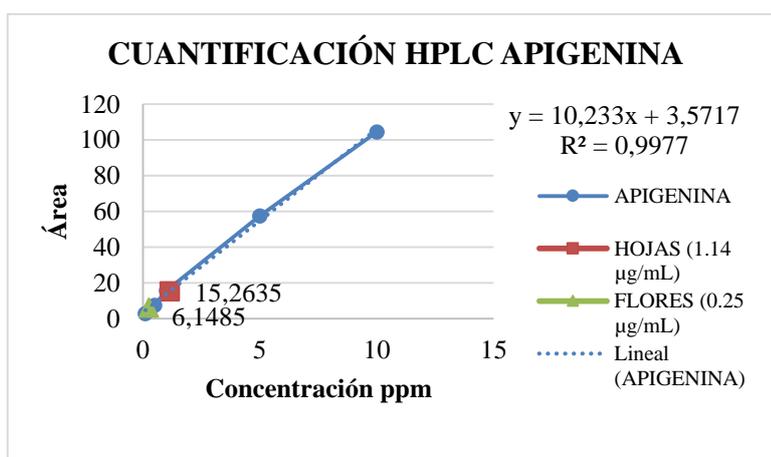


Figura 8 -3: Cuantificación de Apigenina
 Realizado por: Diana Muñoz, 2016

Según la concentración que se obtuvo en las diferentes curvas de calibración, se tomó en cuenta el volumen de la fracción flavónica 25 mL y se encontró el siguiente porcentaje.

TABLA 13-3: Resultados de la concentración de Flavonoides de hojas y flores de *P. quadrangularis*

CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES				
Flavonoides	Hojas		Flores	
	<i>mg/100g de hojas secas</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>mg/100g de flores secas</i>	<i>Porcentaje</i>
Flavonoides (exp. Quercetina)	10.3	0.0103	1.2	0.0012
Flavonoides (exp. Luteolina)	1.05	0.00105	0.15	0.00015
Flavonoides (exp. Apigenina)	5.7	0.0057	1.25	0.00125

Realizado por: Diana Muñoz, 2016

Mediante cromatografía líquida de alta eficiencia se cuantificó en la fracción flavónica hidrolizada de hojas de *P. quadrangularis* 5.7 mg/100g de apigenina, 1.05 mg/100g de luteolina y 10.3 mg/100g de planta seca de quercetina; y en flores de *P. quadrangularis* se cuantificó 1.25 mg/ 100g de apigenina, 0.15 mg/100g de luteolina y 1.2 mg/100g de quercetina.

Confirmando de esa manera según los compuestos separados en cromatografía en capa fina la presencia de apigenina en hojas y luteolina y apigenina en flores. Analizando estos datos con los obtenidos en el ensayo espectral las concentraciones son menores, esto se puede deber al hecho que solamente se analizaron por HPLC 3 flavonoides, respecto todos los que podrían existir en la mezcla analizada por espectrometría.

Además, se observó la mayor concentración presente en las hojas, lo cual concuerda con los datos de cuantificación de fenoles totales y de flavonoides totales con estándar de quercetina por espectrometría.

3.7. Determinación de la actividad antioxidante

Se realizó la curva de calibración como indica el Anexo M a diferentes concentraciones de ácido gálico 10, 20, 40, 60, 80 ppm, mediante el cual se pudo obtener el porcentaje de inhibición.

Para el cálculo del % de inhibición se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{\text{Absorbancia blanco 30min} - \text{Absorbancia muestra 30min}}{\text{Absorbancia blanco 30min}} * 100$$

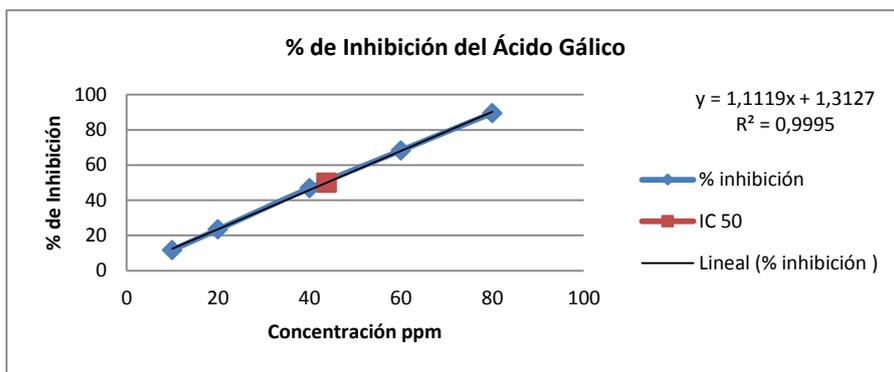


Figura 9 -3: Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el método DPPH de ácido gálico en metanol al 99.83%

Se elaboró la curva de calibración del extracto metanólico de hojas como se evidencia en el Anexo N a diferentes concentraciones de 1000 a 10000 ppm; se midió la absorbancia cada 30 minutos, al final de la reacción se dio al transcurrir una hora mediante el cual se calculó el porcentaje de inhibición como se indica a continuación:

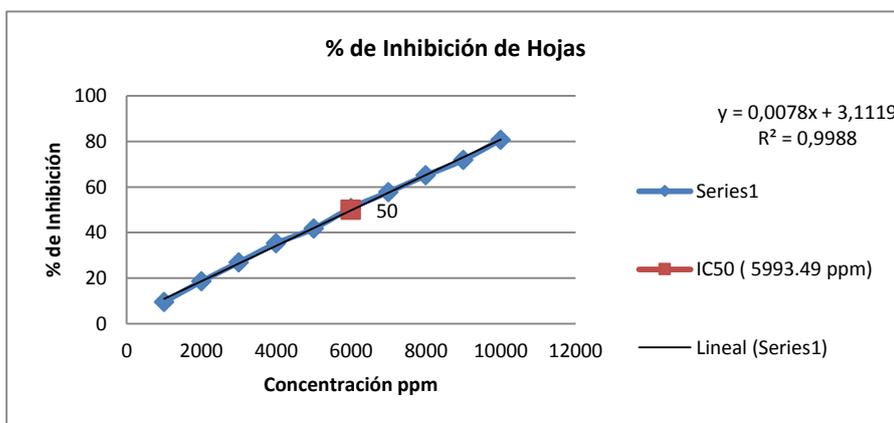


Figura 10 -3: Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el método DPPH del extracto metanólico al 99.83% de hojas

Realizado por: Diana Muñoz, 2016

Se realizó diferentes diluciones del extracto metanólico de flores como se indica en el anexo O desde 2000 hasta 15000 ppm, se midió las absorbancias cada 30 minutos el final de la reacción se dio al transcurrir una hora; con los datos obtenido se graficó el porcentaje de inhibición.

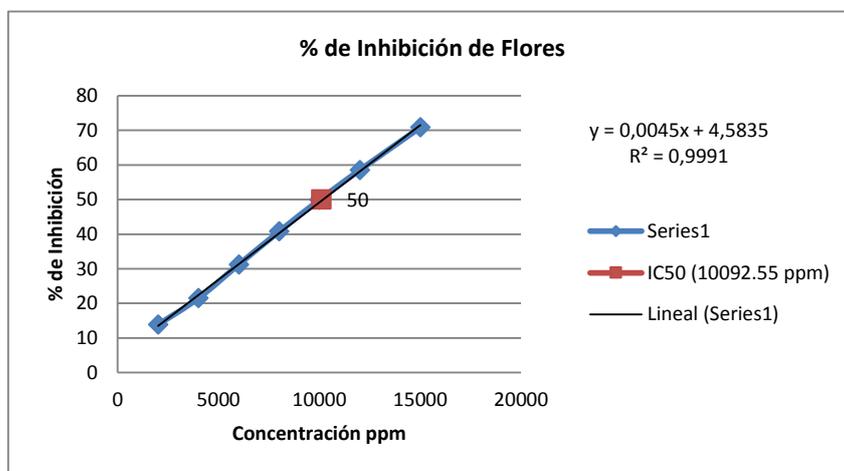


Figura 11 -3: Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el método DPPH del extracto metanólico al 99.83% de flores

Realizado por: Diana Muñoz, 2016

El ensayo se realizó por triplicado obteniendo como capacidad captadora de radicales libres para hojas a $5993.49 \pm 3.6 \mu\text{g/mL}$ y para flores a $10092.55 \pm 2.8 \mu\text{g/mL}$.

Esto quiere decir que el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria IC50 del extracto metanólico al 99.83% de hojas de *P. quadrangularis* es $5993.49 \pm 3.6 \mu\text{g/mL}$ y el IC50 del extracto metanólico al 99.83% de flores de *P. quadrangularis* es $10092.55 \pm 2.8 \mu\text{g/mL}$ cantidades necesarias para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%. Se calculó el IC50 del ácido gálico en metanol al 99.83% obteniendo $43.79 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$, dato que no es comparable con el obtenido en hojas y flores de la especie en estudio al ser un compuesto puro, en cambio en los extractos existe mezcla de compuestos que pueden interactuar entre si logrando producirse efectos sinérgicos o inhibitorios.

Por la tal razón se comparó con un estudio realizado sobre la evaluación de fenoles totales, actividad antioxidante y antibacterianos del extracto metanólico de hojas de *P. quadrangularis*, recogidos en la granja fruta de la pasión en Universidad Putra Malasia Bintulu Sarawak donde se obtiene $785.2 \pm 1.8 \mu\text{g/mL}$ de capacidad captadora de radicales libres, tomando en cuanto que el ensayo realizado fue similar variando en tres condiciones: la concentración del DPPH 100 μM , el volumen de la solución 3 mL y del extracto 1 mL, realizando los cálculos pertinentes los valores significativamente se relacionan con el obtenido en hojas de la especie en estudio. (Ramaiya, Bujang & Zakaria 2014)

CAPITULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

1. Se determinó la calidad de hojas y flores de *P. quadrangularis* de manera que todos los parámetros analizados: humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico se encuentra dentro de los límites establecidos. De forma cualitativa se identificaron metabolitos secundarios: flavonoides, taninos, grasas, lactonas, cumarinas, triterpenos y saponinas en los extractos de hojas; encontrando en flores aceites, grasas, triterpenos, taninos, flavonoides y la presencia de glicósidos cianogénicos.
2. Se identificó la presencia de flavonoides glicosidos mediante cromatografía en capa fina en hojas y flores de *P. quadrangularis*. Con el sistema de solvente de acetato de etilo: ácido acético, ácido fórmico, agua (100:11:11:26) se separaron flavonoides glicosilados, posiblemente de tipo: vitexina -2 "O'Glucósido, vitexin 2" O ramnosido, orientina y vitexina. En la fracción flavónica hidrolizada se confirmó mediante la fase móvil cloroformo, metanol, agua (40:9:1) la presencia de apigenina en hojas; apigenina y luteolina en flores.
3. Se cuantificaron fenoles totales por espectrofotometría, de los tres extractos el mejor solvente de extracción es etanol al 70 %, se encontró en hojas 131.1 mg/g y para flores 72.5 mg/g de fenoles totales expresados como ácido gálico. En la cuantificación espectrofométrica de flavonoides el extracto con mejores resultados es el etanólico al 70%, tanto para hojas como flores representando 11.76 mg/g y 5.46 mg/g respectivamente de flavonoides totales expresados como quercetina. Mediante cromatografía líquida de alta eficiencia se cuantificó en la fracción flavónica hidrolizada de hojas de *P. quadrangularis* apigenina 5.7 mg/100g, luteolina 1.05 mg/100g y 10.3 mg quercetina/100g de hojas secas; y en flores se cuantificó apigenina 1.25 mg/100g, luteolina 0.15 mg/100g y de quercetina 1.2 mg/100g de flores secas.

4. Se evaluó la capacidad captadora de radicales libres obteniendo, la concentración máxima de la media inhibitoria IC50 del extracto metanólico al 99.83% de hojas de *P. quadrangularis* $5993.49 \pm 3.6 \mu\text{g/mL}$ y el IC50 del extracto metanólico al 99.83% de flores de *P. quadrangularis* $10092.55 \pm 2.8 \mu\text{g/mL}$ cantidades necesarias para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%.

4.2. Recomendaciones

1. Se recomienda adquirir un regulador de voltaje para las instalaciones eléctricas del laboratorio de productos naturales; debido a que los cambios de intensidad de energía que se producen pueden dañar los equipos o en su defecto arrojar datos erróneos de los diferentes ensayos.
2. Se recomienda controlar en los diferentes ensayos de cuantificación diversas condiciones como son volúmenes, tiempos exactos de medición y la presencia de luz; para de esa manera obtener datos más fiables.
3. Se recomienda modificar las concentraciones del DPPH para determinar cómo es la capacidad captadora de radical libre y del antioxidante frente a diversas concentraciones de DPPH.
4. Continuar este estudio con la finalidad de probar la actividad ansiolítica en animales de experimentación tomando en cuenta los resultados obtenidos de los diferentes metabolitos encontrados; y probar la actividad ansiolítica de extractos frente a compuestos puros.
5. Se recomienda realizar un estudio de todas las partes de esta especie, con la finalidad de encontrar donde existe la mayor concentración de metabolitos de interés.
6. Se recomienda un estudio sobre la inducción de la producción de flavonoides por la radiación UV -B en *Passiflora quadrangularis* en cultivos de callos; ya que existen estudios de cultivos de tejidos que han perdido la capacidad para producir flavonoides glicósidos que puede recuperar esta capacidad mediante el tratamiento con inductores.

BIBLIOGRAFÍA

1. **A, BENDINNI. M.** Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of *Passiflora* spp. extracts. 2006, Eur. Food. Res. Technol.
2. **A, GEISON AND AC, GAZOLA.** Vitexin derivatives as chemical markers in the differentiation of the closely related species *passiflora alata curtis* and *Passiflora quadrangularis* linn. Octubre 2013, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, Vol. 36, pp. 1697-1707.
3. **A., LAB. MERCK S.** Quercetina. [Online] [Cited: Enero 18, 2016.] <http://dietcan.net/docs/QUERCETINALabMerck.pdf>
4. **A., VILLAR.** Farmacognosia general. 1994, p. pp. 74.
5. **ADMINISTRATION, FOOD AND DRUG.** Phytotoxicity of *Passiflora incarnata* extracts on germination and growth of *Hordeum vulgare* and *Raphanus sativus*. U.S.A : FDA Staff, 2013.
6. **ALAM MD. N. AND BRISTI N.J., RAFIQUZZAMAN MD.** Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. 2012, Saudi Pharmaceutical Journal, Vol. 21, pp. 143-152.
7. **ALONSO, JORGE.** Fitomedicina_Medicina Naturista. [Online] [Cited: Enero 18, 2016.] <http://remediosnaturales.org/Noticias/NoticiaMuestra.asp?Id=59>.
8. **ANA MARÍA MUÑOZ JÁUREGUI, D. FERNANDO RAMOS-ESCUDERO, CARLOS ALVARADO-ORTIZ.** EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN RECURSOS. 3, 2007, Sociedad Química de Perú, Vol. 73, pp. 142-149.
9. **AYRES.** Comparative central effects of the aqueous leaf extract of two populations of *Passiflora edulis*. Junio 2015, Revista Braiselira de Farmacognosia, Vol. 30.

10. **BIRK, C.** TLC de la huella digital de flavonoides y saponinas de. 14, 2005, Revista de Cromatografía Líquida y Tecnologías relacionadas, Vol. 28, pp. 2285-2291.
11. **CASTRO, POLLYANNA CELSO F. DE, SILVA, JAIR CAMPOS DA AND MENDES, FÚLVIO RIELI.** Possible Anxiolytic Effect of Two Extracts of *Passiflora quadrangularis* L. in Experimental Models . 2007, Phytotherapy Research, Vol. 21, pp. 481-484.
12. **CECONI C, BORASO A, CARGNONI A, FERRARI R.** Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact.. 2, 2003, BiochemBiophys, Vol. 420.
13. **CHRISTOPHER, JIMÉNEZ,** Flavonoides y sus acciones antioxidantes. 2, 2009, Medhigrapic Artemisa, Vol. 52, pp. 1-3.
14. **CORFO-CHILE.** Portal-antioxidantes. [Online] 2015. [Cited: Septiembre Sábado, 2015.] <http://www.portalantioxidantes.com/antioxidantes/>.
15. **CORREA, PIO.** Diccionario das plantas uteis do Brasil e das exoticas cultivadas. Brasil : Impresona Nacional: Rio de Janeiro, 1978.
16. **COSTA, GEISON.** VITEXIN DERIVATIVES AS CHEMICAL MARKES AND DIFFERENTIATION SPECIES PASSIFLORA. 12, Octubre 2013, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, Vol. 36.
17. **CR, PACE-ASCIAC, S, HAHN AND EP, DIAMANDIS.** The red wine phenolics trans-resveratrol and quercitin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease. 1995, Clin Chim Acta, Vol. 235, pp. 207-219.
18. **DUQUE C, MORALES A.** El aroma frutal de Colombia. Colombia : Ilustrada ed., 2005, pp. pp 107-130.
19. **DURAN, ASTRID.** Definiciones y Conceptos de Fitoquímica 2011. [Online] 2011. [Cited: Enero 18, 2016.] <https://es.scribd.com/doc/65662024/Definiciones-y-Conceptos-de-Fitoquimica-2011>.

20. **ESTRADA-REYES, ROSA, UBALDO-SUÁREZ, DENISSE AND ARAUJO-ESCALONA, ANA GABRIELA.** Flavonoids and Central Nervous System. 5, 2012, Salud Mental, Vol. 35.
21. **EXPRESS, DIETETICA.** Club Salud Natural. [Online] 2016. [Cited: Enero 18, 2016.] <http://www.clubsaludnatural.com/profiles/blogs/el-apio>.
22. **FUNDACIÓN CANNA.** [Online] [Cited: Enero 18, 2016.] <http://www.fundacion-canna.es/flavonoides>.
23. **GALLEANO, MÓNICA.** Antioxidant actions of flavonoids: Thermodynamic and kinetic analysis. February 2010, Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 501.
24. **GAZOLA ANDRÉS, COSTA GEISON, CASTELLANOS LEONARDO.** Involvement of GABAergic pathway in the sedative activity of. Marzo 2015, Revista Brasileira de Farmacognosia, Vol. 109, pp. 1-6.
25. **GFK MIEMBROS DE INVESTIGACIÓN.** El estrés afecta al 10% de familias ecuatorinas., 2012, Diario.
26. **H. WAGNER, S BLADT.** Plant Drug Analysis. Segunda edición. Munich : Springer, 1996.
27. **HEALTH, DEPARMENT OF.** Medicines for Treating Depression. 12, Julio 2012, Agency for Healthcare Research and Quality, Vol. 12.
28. **HERNÁNDEZ, MASTER DORIS.** phytomedChile. [Online] 2006. [Cited: Enero 07]
29. **HERRERA, NATALIA.** Fenoles Naturales. [Online] 2011. [Cited: Enero 18, 2016.] https://q-organicauce.wikispaces.com/file/view/fenoles_NATURALES_NCHP.pdf.
30. **HUA, S., & TEIK, L.** Quantidication of polyphenolic content and bioactive constituents of some commercial rice varieties in Taiwan. 22, 2012, Journal of Food and Analysis, Vol. 1, pp. 122-127.

31. **J, BILLOT.** Anthocyanin Pigments in the Flowers of *Passiflora quadrangularis*. 1974, *Phytochemistry*, Vol. 13, pp. 2886-2887.
32. **J, LEÓN.** 3ra Ed. San José. *Botánica de los cultivos Tropicales*. Costa Rica : Editorial IICA, 2010, pp. 138-139.
33. **KAMALDEEP DHAWAN, SANJU DHAWAN, ANUPAM SHARMA.** *Passiflora: a review update*. Junio 2004, *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 94.
34. **KAMALDEEP, D. DAHUAN, S. AND SHARMA, A.** *Passiflora: a review update*. J. 2004, *Ethnopharmacol.* , Vol. 94, pp. 1-23.
35. **KOCH H, STEINEGGER E.** Investigations of the Alkaloids and Flavonoids of the *Passiflora* Species. 1980, *Planta Medicinal*, Vol. 38, pp. 210-211.
36. **KORBUT R, ROBAK J, SWIES J Y GRYGLEWKI RJ.** On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. 1987, *Biochem Pharmacol*, Vol. 36.
37. **LUCK, OLGA.** *Investigación Fitoquímica*. Primera. Perú : Fondo de la Pontificia Universidad Católica del Perú, 1988.
38. **M, BOUKHRIS, SAYADI, SIMMONDS M AND M., BOUAZIZ.** Chemical composition and biological activities of polar extracts and essential oil of rose-scented geranium, *Pelargonium graveolens*. 1, 2012, *Phytotherapy research*, Vol. 1, pp. 1-8.
39. **M. GALLEANO, P.I. OTEIZA, C.G. FRAGA, J.** *Pharmacol Cardiovasc*. 2009, Vol. 54.
40. **MAST, M.T.** *Sabetodo.org*. [Online] [Cited: Septiembre Miércoles, 2015.] <http://www.sabelotodo.org/agricultura/enredaderas/granadillareal.html>.
41. **MEDINA JE, RONDINA VD, COUSSID JD.** *Phytochemical Screening of Argentine Plants With Potential Pharmacological activity (Part VII)*.1977, *Planta Medical*, Vol. 31, pp. 136-140.

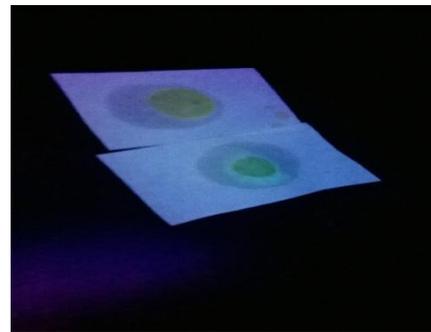
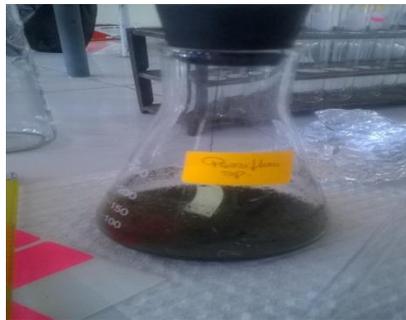
42. **MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO.** Guía de Práctica Clínica para el Manejo de Pacientes para el Trastorno de la Ansiedad. 2006, GUÍAS DE PRÁCTICA CLÍNICA EN EL SNS.
43. **MIRANDA.** Drogas crudas Extractos y Tinturas. Minsap : NRSP, 2006, pp. 31-47, 309-311-312.
44. **MJ, ALCÁZAR MJ Y JIMÉNEZ.** Flavonoids as antiinflammatory. 1988, Fitoterapia, Vol. 59.
45. **MORALES, MIGUEL.** FITOMEDICINA Y FITOTERAPIA. [Online] 2006. [Cited: Enero 18, 2016.] <http://phytomedchile.blogspot.com/2006/04/fitomedicina-y-fitoterapia.html>.
46. **OJHA H., MISHRA K. AND N.K., CHAUDHURY.** Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH: A critical review and results. 2012, Food Chemistry, Vol. 130, pp. 1036–1043.
47. **OKAMOT Y, YOSHIKAWAT.** Angiotensing-Converting Enzyme Inhibitors and Aldose Reductasa Inhibitors Containing Passiflora quadrangularis Extracts of Vitexin. 1994, Patent Japan Kokai Tokkyo Koho , Vol. 6, pp. 4-9.
48. **OMS,** Organización Mundial de la Salud. [Online] 2015.
49. **OMS.** [Online] 2012. [Cited: Septiembre Lunes, 2015.] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/es/>.
50. **OSORIO, EDISON.** Aspectos Básicos de Farmacognosia. 2009, Universidad de antoquia.
51. **OYVIND, ANDERSEN AND KENNETH, MARKHAM.** Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications. 2005, CRC Press, pp. 1-10.
52. **PEREIRA. A** HPTLC Densitometric Determination of Flavonoids of Passiflora alata, P edulis, P incarnata, P caerulea anda comparison with HPLC method. 2004, Phytochemical Analysis, Vol. 15.

53. **PLANT WORLD SEEDS.** *Passiflora quadrangularis*. [Online] 1985. [Cited: Septiembre Miercoles, 2015.] http://www.plant-world-seeds.com/store/view_seed_item/3841.
54. **RAMAIYA, SHIAMALA DEVI, BUJANG, JAPAR SIDIK AND ZAKARIA, AND MUTA HARAH.** Assessment of Total Phenolic, Antioxidant, and Antibacterial Activities of *Passiflora* Species. 2014, *The Scientific World Journal*, Vol. 2014, p. 10.
55. **REA, VIVIANA.** Evaluación del efecto ansiolítico del extracto hidroalcohólico de flor de badea (*Passiflora quadrangularis*) en ratones (*Mus musculus*). Tesis de Grado. Bioquímica y Farmacia. Riobamba : ESPOCH, 2014.
56. **REYES, LAURA.** El estrés como un factor de riesgo en la salud: análisis diferencial entre docentes de universidades públicas y privadas. *Revista Digital Universitaria*. [Online] 2010. [Cited: Noviembre 12, 2015.] <http://www.revista.unam.mx/vol.13/num7/art78/#up>.
57. **RODRIGUEZ, ALBERTO.** Fitoterapia. Bases científicas y legales para su aplicación. 4, Mayo 2005, *Boletín Latinomericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, Vol. 4.
58. **RUÍZ, ANA.** Trastornos de ansiedad en la infancia y la adolescencia. [ed.] AEPaP. Actualización Pediatría. Primera. Madrid : Exlibris, 2005, pp. 265-280.
59. **SA, AHERNE AND NM., O'BRIEN.** Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism.. 2002, *Nutrition*, Vol. 18, pp. 75-81.
60. **SANTOS K, Y COL.** Sedative and anxiolytic effects of methanolic extract from the leaves of *Passiflora actinia*. 4, 2006, *Braz. Arch. Biol. Technol*, Vol. 49.
61. **SCHIFFMAN, J. E.** Medicamentos para la ansiedad. *Anti-Anxiety Medications Explained*. [Online] 2011 Noviembre. [Cited: Septiembre Lunes, 2015.] <http://www.rinconpsicologia.com/2012/04/los-medicamentos-para-la-ansiedad.html>.
62. **SECRETARÍA NACIONAL DE PLANIFICACIÓN Y DESARROLLO.** Buen Vivir Plan Nacional. [Online] 2013-2017. [Cited: Septiembre Sábado, 2015.]

- 63. SHANMUGAM SARAVANAN, KARUPPUSAMY ARUNACHALAM, THANGARAJ PARIMELAZHAGAN.** In vitro Antioxidant, Passiflora ligularis, Passiflora subpeltata leaves. Junio 2014, Industrial Crops and Products, Vol. 54.
- 64. SILVA, GISLÁINE C.** 1072954, Junio 2014, Critical Reviews in Analytical Chemistry, Vol. 10.
- 65. SILVA, GISLÁINE.** Analyses of Passiflora compounds by chromatographic. 1072954, Junio 2014, Critical Reviews in Analytical Chemistry.
- 66. SO-MI KWON, SUJI KIM, NO-JOON SON.** Anti-adipogenic and pro-osteogenic effects of luteolin, a major dietaryflavone, are mediated by the induction of DnaJ (Hsp40) Homolog, Subfamily. 2015, The Journal of Nutritional Biochemistry, Vol. 15, pp. 1-33.
- 67. SV, JOVANOVIC, S, STEENKEN AND MG, SIMIC.** Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. [ed.] Rice Evans C. Flavonoids in health and disease. Nueva York : Marcel, 1998, pp. 137-161.
- 68. SWIES J, Y COL.** Antiaggregatory effects of flavonoids in vivo and their influence on lipoxygenase and cyclooxygenase in vitro. . 1984, Pol J Pharmacol Pharm,, Vol. 36.
- 69. T., LIM.** [ed.] 4ta. Ed. Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants. New York : Springer, 2012, pp. 183-186.
- 70. TOXICOLOGY, FOOD AND CHEMICAL.** Actualidad médica. [Online] 2013. [Cited: Enero 18, 2015.] http://www.medicina21.com/Actualidad/V3805-El_apio_y_las_alcachofas_contienen_flavonoides_que_ayudan_a_combatir_el_cancer_de_pancreas.html.
- 71. VALARES, CRISTINA.** Tesis. Doctora en Ciencias. Variación del Metabolismo Secundario en Plantas Debida al Genotipo y al Ambiente. Badajoz : s.n., 2011.
- 72. VENTURA, MELISSA.** Equiparación fitoquímica entre cuatro especies de Passifloraceae usada Medicinalmente en Guatemala . [ed.] Ventura Ochoa. Informe Final Tesis. Guatemala : Universidad San Carlos, 2003.

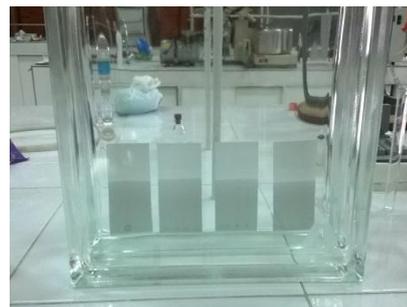
- 73. VERPOORTE, R.** Pharmacognosy in the New Millennium. 2000, Biotechnology. J. Pharm. Pharmacol., Vol. 52.
- 74. W. BRANDS WILLIAMS, M.E. CUVELIER AND BERSET, C.** Use of free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. 1994, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, Vol. 28, pp. 25-30.
- 75. ZERAIK, MARIA.** Maracujá: um alimento funcional. 3, Junio/Julio 2010, Revista Brasileira de Farmacognosia, Vol. 20.
- 76. ZHANG, DRA. XIAORUI. OMS.** Medicina tradicional, Medicamentos Esenciales y Política Farmacéutica (EDM) . [Online] 2016. [Cited: Enero 18, 2016.] http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/.
- 77. ZHONGJIAN CHEN, SISI KONG, FEIFENG SONG, LIPING LI, HUIDI JIANG.** Pharmacokinetic study of luteolin, apigenin, chrysoeriol and diosmetin after oral administration of Flos Chrysanthemi extract in rats. 8, 2012, Fitoterapia, Vol. 83, pp. 1616-1622.
- 78. ZURAIK, MARIA.** 3, Junio/Julio 2010, Revista Brasileira de Farmacognosia, Vol. 20.

ANEXO C: Tamizaje fitoquímico

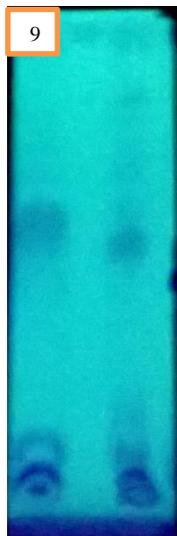
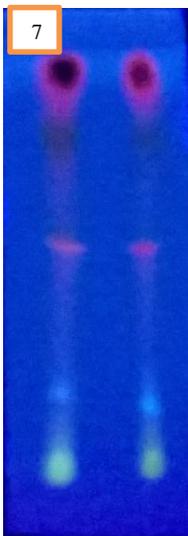
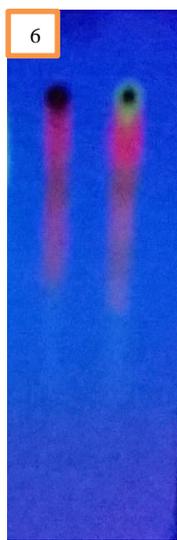


Fuente: Diana Muñoz, 2015

ANEXO D: Cromatografía en capa fina



Fuente: Diana Muñoz, 2015

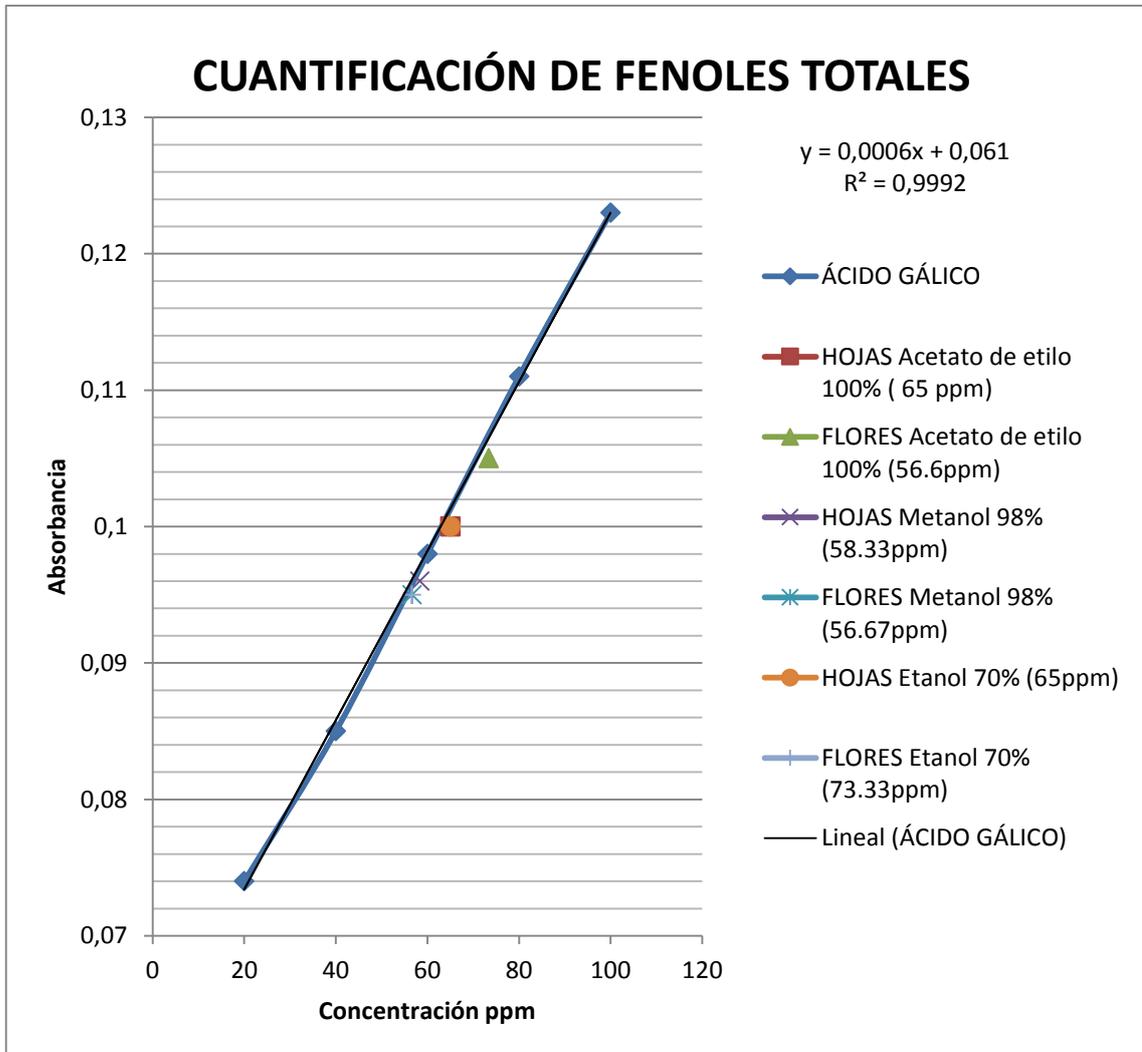


ANEXO E: Cuantificación por espectrofotometría UV de fenoles y flavonoides y de los diferentes extractos



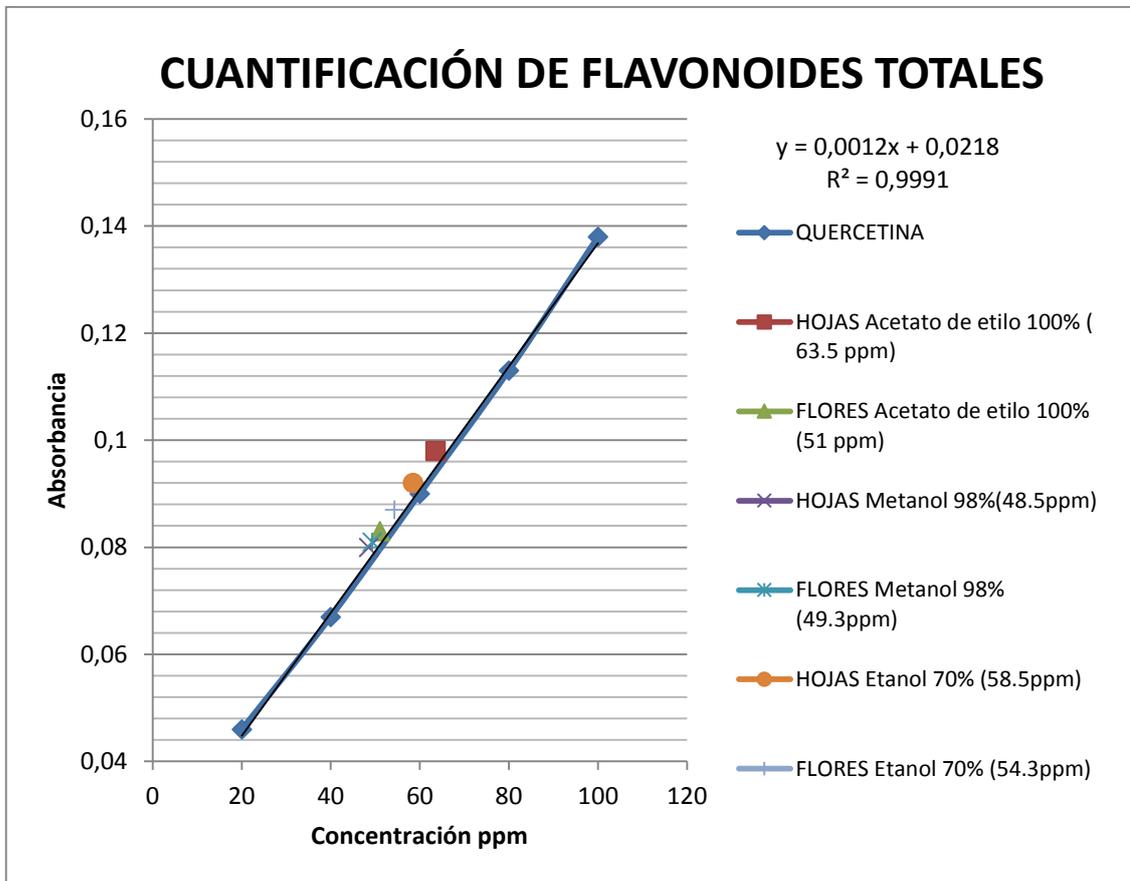
Fuente: Diana Muñoz, 2015

ANEXO F: Cuantificación de fenoles por espectrofotometría UV en los diferentes extractos de hojas y flores



Fuente: Diana Muñoz, 2015

ANEXO G: Cuantificación de flavonoides por espectrofotometría UV en los diferentes extractos de hojas y flores



Fuente: Diana Muñoz, 2015

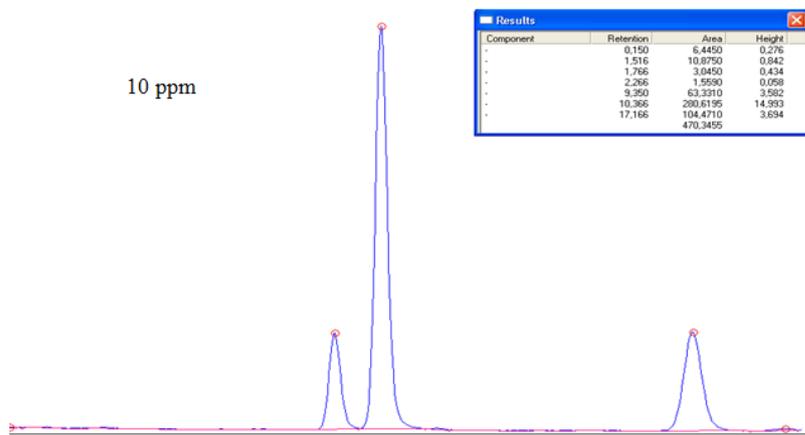
ANEXO H: Cuantificación de flavonoides mediante HPLC de la fracción hidrolizada de hojas y flores de *P. quadrangularis*





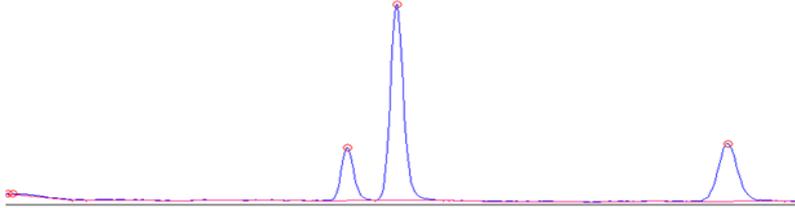
Fuente: Diana Muñoz, 2015

ANEXO I: Cromatograma de las diferentes concentraciones para la cuantificación de quercetina, luteolina y apigenina



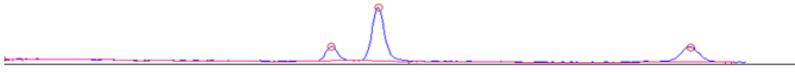
5 ppm

Component	Retention	Area	Height	External
-	0.066	2.3050	0.247	0.0000
-	1.516	7.0190	0.767	0.0000
-	1.765	2.9495	0.406	0.0000
-	2.400	2.4210	0.040	0.0000
-	2.500	2.1120	0.026	0.0000
-	9.366	36.4010	1.369	0.0000
-	10.366	138.1240	7.333	0.0000
-	17.150	61.4180	2.158	0.0000
-		251.6465		0.0000



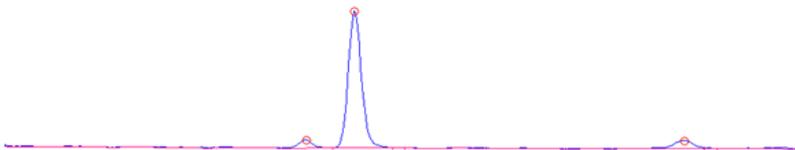
1 ppm

Component	Retention	Area	Height	External	Unit
-	0.066	2.8290	0.245	0.0000	
-	1.533	6.8470	0.754	0.0000	
-	1.766	2.3360	0.422	0.0000	
-	2.150	1.2030	0.074	0.0000	
-	9.366	9.1800	0.517	0.0000	
-	10.363	36.0860	1.871	0.0000	
-	17.216	15.6270	0.526	0.0000	
-		74.7680		0.0000	



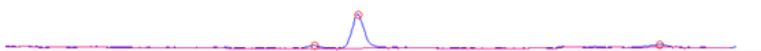
0.5 ppm

Component	Retention	Area	Height	External	Unit
-	0.063	3.0590	0.245	0.0000	L
-	1.516	6.6880	0.730	0.0000	
-	1.750	2.9510	0.425	0.0000	
-	2.250	1.6390	0.079	0.0000	
-	9.400	6.3015	0.276	0.0000	
-	10.400	85.5010	4.490	0.0000	
-	17.250	7.5010	0.254	0.0000	
-		112.7205		0.0000	



0.1 ppm

Component	Retention	Area	Height	External
-	0.150	2.4070	0.159	0.0000
-	1.516	6.8820	0.710	0.0000
-	1.766	2.9770	0.431	0.0000
-	9.466	2.0675	0.100	0.0000
-	10.466	22.3650	1.154	0.0000
-	17.260	2.7380	0.082	0.0000
-		39.4375		0.0000



ANEXO J: Concentraciones de la Curva de Calibración de Quercetina

CURVA DE CALIBRACIÓN DE QUERCETINA	
CONCENTRACIÓN (µg/mL)	ÁREA
10	63.331
5	35.401
1	9.18
0.5	5.3915
0.1	2.0675

Realizado por: Diana Muñoz, 2016

ANEXO K: Concentraciones de la Curva de Calibración de Luteolina

CURVA DE CALIBRACIÓN LUTEOLINA	
CONCENTRACIÓN (µg/mL)	ÁREA
10	280.6195
5	138.124
1	36.086
0.1	2.739

Realizado por: Diana Muñoz, 2016

ANEXO L: Concentraciones de la Curva de Calibración de Apigenina

CURVA DE CALIBRACIÓN APIGENINA	
CONCENTRACIÓN (µg/mL)	ÁREA
10	104.471
5	57.386
1	15.627
0.5	7.501
0.1	2.739

Realizado por: Diana Muñoz, 2016

ANEXO M: Concentración y % de Inhibición de ácido gálico por el método DPPH

Concentración ppm (ácido gálico)	Media Absorbancia	Media % Inhibición
80	0.0585	89.6092
60	0.1785	68.2948
40	0.299	46.8917
20	0.431	23.4458
10	0.4965	11.8117

Realizado por: Diana Muñoz, 2016

ANEXO N: Concentración y promedio del % de Inhibición del extracto de hojas por el método DPPH

Concentración ppm (extracto metanólico 99.83%)	Media Absorbancia	Media % Inhibición
10000	0.113	80.750
9000	0.165	71.891
8000	0.205	65.077
7000	0.248	57.751
6000	0.289	50.767
5000	0.342	41.738
4000	0.380	35.264
3000	0.429	26.917
2000	0.478	18.569

1000	0.531	9.540
------	-------	-------

Realizado por: Diana Muñoz, 2016

ANEXO O: Concentración y media del % de Inhibición del extracto de flores por el método DPPH

Concentración ppm (extracto metanólico 99.83%)	Media ABS	Media % Inhibición
15000	0.156	70.841
12000	0.222	58.505
10000	0.268	49.907
8000	0.317	40.748
6000	0.368	31.215
4000	0.42	21.495
2000	0.461	13.832

Realizado por: Diana Muñoz, 2016

ANEXO P: Capacidad Captadora de radicales libres mediante DPPH



Fuente: Diana Muñoz, 2015