



**ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA**

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

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORA: MONSERRATH ALEXANDRA LEMA FERNÁNDEZ**

**TUTORA: DRA. SUSANA ABDO**

Riobamba-Ecuador

2016

©2016, Monserrath Alexandra Lema Fernández

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 del 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 tripartita*”, de responsabilidad de la señorita Monserrath Alexandra Lema Fernández, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

**FIRMA**

**FECHA**

Dra. Susana Abdo

**DIRECTORA DE TRABAJO  
DE TITULACIÓN**

Lic. Karen Acosta M.Sc

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

**DOCUMENTALISTA**

**SISBIB ESPOCH**

**NOTA DEL TRABAJO**

**DE TITULACIÓN**

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Monserrath Alexandra Lema Fernández, 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, 05 de Febrero del 2016

---

MONSERRATH ALEXANDRA LEMA FERNÁNDEZ  
CI: 060584982-7

## **DEDICATORIA**

“No te rindas, aún estás a tiempo de alcanzar y comenzar de nuevo. Aceptar tus sombras, enterrar tus miedos, liberar el lastre, retomar el vuelo. No te rindas que la vida es eso, continuar el viaje, perseguir tus sueños” (Mario Benedetti).

Dedico el presente trabajo de titulación a Dios, el constructor del universo, quien ha sido mi guía y mi apoyo en momentos trascendentales, sus bendiciones me han permitido conocer a personas maravillosa y vivir experiencias inolvidables.

A mis padres, que con su constante sacrificio y esfuerzo, me han apoyado en mi deseo de superación. A mis hermanos y familiares, por estar a mi lado brindándome su apoyo, comprendiendo y respetando mis decisiones, a todos ellos por ofrecerme consejos para hacer de mí una mejor persona.

Monse

## AGRADECIMIENTO

“No dejes que termine el día sin haber crecido un poco, sin haber sido feliz, sin haber aumentado tus sueños. No te dejes vencer por el desaliento. No abandones las ansias de hacer de tu vida algo extraordinario.” (Walt Whitman)

Mis más sinceros agradecimientos a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a la Facultad de Ciencias y a mi querida Escuela de Bioquímica y Farmacia, por ser esa alma mater generadora de sueños y metas, por contribuir además en la formación profesional y personal de los estudiantes. Al grupo GRIPRONAF por sus conocimientos, orientaciones, paciencia y motivación, fueron quienes guiaron con inteligencia y experiencia la presente investigación.

A mis amigos y a todos aquellos que me brindaron su apoyo incondicional, mil gracias a todos ellos por haber colaborado para la culminación de esta etapa, mi eterno afecto y cariño para ustedes.

Monse

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.-Lista de equipos empleados en las diferentes determinaciones cualitativas cuantitativas	22
Tabla 2.- Lista de reactivos empleados en la investigación .....	23
Tabla 3.-Control de calidad de hojas y flores secas de <i>Passiflora tripartita</i> . .....	35
Tabla 4.- Sólidos totales concentraciones de los extractos de hojas de <i>P. tripartita</i> .....	36
Tabla 5.- Tamizaje Fitoquímico de extractos de hojas y flores de <i>Passiflora tripartita</i> .....	37
Tabla 6.- Rf de estándares glucósidos, extracto hidrolizado y no hidrolizado de hojas y flores de <i>Passiflora tripartita</i> . .....	41
Tabla 7.- Cuantificación de flavonoides en extractos de hojas y flores de <i>Passiflora tripartita</i> , por el método de AlCl <sub>3</sub> .....	42
Tabla 8.- Cuantificación de hojas y flores de <i>Passiflora tripartita</i> , por el método de Folin-Ciocalteu. ....	43
Tabla 9.- Cuantificación de hojas y flores de <i>Passiflora tripartita</i> , por HPLC .....	44
Tabla 10.- Determinación de la capacidad captadora de radicales libres mediante método de DPPH. ....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Síntesis de Flavonoides .....	12
Figura 2.- Estructura básica de un flavonoide.....	12
Figura 3.- Clasificación de flavonoides.....	13
Figura 4.- Estructura de compuestos con actividad hepatoprotectora .....	15
Figura 5.- Estructura compuesto actividad antibacteriana .....	16
Figura 6.- Estructura compuesto con actividad anti cáncer.....	17
Figura 7.- Preparación de extractos por gradiente para análisis-Tamizaje Fitoquímico .....	26
Figura 8.- Ensayos cualitativos para identificación de metabolitos secundarios .....	27
Figura 9.-Esquema análisis cromatografía en capa fina TLC .....	28
Figura 10.- Cuantificación de flavonoides y Fenoles totales mediante AlCl <sub>3</sub> y Folin-Ciocalteu	30
Figura 11.- Cuantificación de extractos hidrolizados por HPLC .....	32
Figura 12.- Esquema de evaluación de capacidad de captación de radicales libres. DPPH.....	33
Figura 13.- Placas cromatográficas de extractos no hidrolizados de flores y hojas de <i>P.tripartita</i> .	39
Figura 14.- Placas cromatográficas de estándares y extractos hidrolizados de flores hojas de <i>P tripartita</i> . .....	40
Figura 15.- Cromatogramas HPLC (A) mezcla de estándares de apigenina (5ug/mL), luteolina (5ug/mL) y quercetina (10ug/mL), (B) muestra metanólica hidrolizada de flores, (C) muestra metanólica hidrolizada de hojas. ....	45



## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A.- Representación gráfica de sólidos totales de diferentes solventes de extracción. ....	
Anexo B.- Cromatografía en capa fina: sistemas de solventes que no presentaron buenos resultados .....	
Anexo C.- Curva de calibración de quercetina por el método de tricloruro de aluminio.....	
Anexo D.- Curva de calibración de ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu.....	
Anexo E.- Curva de calibración de apigenina, luteolina y quercetina para analisis HPLC. ....	
Anexo F.- Determinación de capacidad captadora de radicales libres DPPH - curva de IC50.....	
Anexo G.- Secado de la materia vegetal .....	
Anexo H.- Control de calidad de materia vegetal .....	
Anexo I.- Tamizaje Fitoquímico .....	
Anexo J.- Sólidos Totales.....	
Anexo K.- Cuantificación de flavonoides y fenoles.....	
Anexo L.- Análisis HPLC muestras hidrolizadas .....	
Anexo M.- Determinación de capacidad captadora de radicales libres.....	

# Contenido

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

## CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Medicina Convencional.....	5
1.1.1. Definición.....	5
1.1.2. Medicamento.....	5
1.2. Medicina Alternativa.....	6
1.2.1. Definición.....	6
1.2.2. Tipos de medicina alternativa .....	6
1.2.3. Fitoterapia .....	6
1.3. Uso de medicamentos.....	7
1.3.1. Efectos adversos a medicamentos .....	7
1.4. TAXO ( <i>Passiflora tripartita</i> ).....	8
1.4.1. Descripción taxonómica.....	8
1.4.2. Nombres Populares. ....	9
1.4.3. Historia .....	9
1.4.4. Descripción Botánica. ....	9
1.4.5 Habitat.....	9
1.4.6. Parte utilizada.....	10
1.4.7. Composición química.....	10
1.4.8 Acciones farmacológicas.....	10
1.5. Flavonoides .....	11
1.5.1. Síntesis absorción y metabolismo .....	11
1.5.2 Química de los flavonoides .....	12
1.5.3. Actividad farmacológica .....	14
1.6. Ansiedad.....	17
1.6.1. Manifestaciones clínicas. ....	17
1.6.2. Causas de los trastornos de ansiedad.....	18
1.6.3. Tipos de Ansiedad.....	18
1.6.4. Tratamiento de la ansiedad.....	18
1.2. Antecedentes de la Investigación. ....	19

## CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO .....	21
2.1. Lugar de recolección del material vegetal.....	21
2.2. Lugar de investigación .....	21
2.3. Criterios de Selección de la Muestra.....	21
2.4. Tratamiento de la muestra .....	21
2.5. Equipos y Reactivos .....	22
2.5.1. Equipos.....	22
2.5.2. Reactivos .....	23
2.6. Técnicas y Métodos.....	24
2.6.1. Parámetros de control de calidad .....	24
Expresión de los resultados:.....	25
2.5.3. Tamizaje fitoquímico .....	26
2.5.4. Análisis TLC .....	27
4.5.5. Cuantificación de flavonoides y fenoles .....	29
4.5.6. Análisis HPLC .....	30
4.5.7. Determinación de la capacidad captadora de radicales libres mediante método de DPPH32	

## CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS HIPOTESIS Y OBJETIVOS. ....	34
3.1. Parámetros de control de calidad .....	34
3.2. Sólidos totales de hojas y flores .....	35
3.3. Tamizaje Fitoquímico .....	36
3.3. Análisis TLC .....	39
3.4. Cuantificación de flavonoides y fenoles .....	41
3.4.1. Cuantificación flavonoides.....	41
3.4.2. Cuantificación fenoles.....	42
3.5. Análisis HPLC .....	43
3.6. Determinación de la capacidad captadora de radicales libres mediante método de DPPH..	45
CONCLUSIONES .....	47
RECOMENDACIONES .....	48
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo realizar un estudio fitoquímico y evaluación in vitro de la capacidad captadora de radicales libres de hojas y flores de Taxo (*Passiflora tripartita*), para ello se realizó la recolección y secado de la materia vegetal, a la que se efectuó el control de calidad; tamizaje fitoquímico para identificación de principales metabolitos secundarios, análisis por cromatografía en capa fina (TLC) de compuestos tipo glicósidos y agliconas, se efectuó además la cuantificación mediante espectrofotometría de flavonoides por el método tricloruro de aluminio y fenoles totales por Folin-Ciocalteu, usando como estándares quercetina y ácido gálico respectivamente; la cuantificación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se realizó en extractos hidrolizados de hojas y flores de *Passiflora tripartita*, los analitos de interés fueron apigenina, luteolina y quercetina; mientras que la actividad antioxidante se determinó usando el ensayo de DPPH (1,1-difenil -2-picrylhydrazyl). Los resultados obtenidos en el control de calidad fueron satisfactorios, en el TLC se identificaron fitoconstituyentes tipo flavónicos: glicósidos (vitexina, isoorientina, vitexin-2''-O-Glucosido, orientina) y agliconas (apigenina, luteolina y quercetina), la cuantificación de flavonoides y fenoles fue mayor en extractos hidroalcohólicos y en hojas más que en flores, mientras que por HPLC, quercetina fue el analito mayoritario, en hojas  $0.61 \pm 0.096$  ppm de quercetina y en flores  $1.43 \pm 0.058$  ppm de quercetina; en la actividad antioxidante el ensayo de DPPH indicó que el potencial antioxidante de *Passiflora tripartita* no es muy alta, ya que los extractos de hojas y flores estimadas con una prometedora actividad presentaron valores de  $408.5 \pm 4.923$  ug/mL para hojas y  $735.7 \pm 6.113$  ug/mL para flores. Se concluye que hojas y flores de *Passiflora tripartita*, presentan una variedad y cantidad de compuestos flavónicos con importancia farmacológica y si bien su actividad antioxidante no es muy alta se recomienda realizar un estudio más íntegro sobre los constituyentes flavónicos presentes en esta especie y su actividad biológica.

**Palabras clave:** <ANÁLISIS FITOQUÍMICO >, <TAXO [*Passiflora tripartita*]>,<CUANTIFICACIÓN ANALITOS>,<FLAVONOIDES>.< ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE >, <FITOQUÍMICA>.

## ABSTRACT

The present paper objective is to carry out a phytochemistry study and evaluation in vitro of the capacity to catch free radicals of Taxo leaves and flowers (*Passiflora tripartita*). The following steps were carried out: collection and drying of the vegetal matter with a quality control, phytochemistry screening in order to identify the main secondary metabolites, analysis per thin-layer chromatography (TLC) of components type glycosides and aglyconas. Quantification by flavonoid spectrophotometry was also carried out with the method aluminum trichloride and total tar acids per Folin-Ciocalteu reagent by using as standards quercetin and gallic acid respectively; the quantification per High-performance liquid chromatography (HPLC) was carried out in hydrolyzed extracts of leaves and flowers of *Passiflora tripartita* and the analytes analyzed were apigenin, luteolin and quercetin. Antioxidant activity was determined by using DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl) assay. The results gotten in the control of quality were satisfactory. Phytoconstituents type flavonoids were identified by TLC: glycosides (vitexin, issoorientin, vitexin-2''-O-Glycoside, orientin) and aglyconas (apigenin, luteolin and quercetin), the quantification of flavonoids and higher tar acids was higher in hydro alcoholic extract and in leaves than in flowers. By using HPLC quercetin was the highest analyte: in leaves  $0.61 \pm 0.096$  ppm of quercetin and in flowers  $1.43 \pm 0.058$  ppm of quercetin. In the antioxidant activity the assay of DPPH showed that antioxidant potential of *Passiflora tripartita* is not very high since leaf and flower extracts with an activity showed values of  $408.54 \pm 4.923$  ug/mL for leaves and  $735.7 \pm 6.113$  ug/mL for flowers. It is concluded that leaves and flowers of *Passiflora tripartita* showed a variety and quantity of flavonoid components very important in pharmacology and despite its activity is not very high it is recommended to carry out a deep study about flavonoid constituents of this specie and its biological activity.

**Key words:** <PHYTO CHEMISTRY ANALYSIS >,<TAXO [*Passiflora tripartita*]>,<ANALYTE QUANTIFICATION>,<FLAVONOIDS>,<ANTIOXIDANT ACTIVITY>, <PHYTO CHEMISTRY>.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la ansiedad es parte de la vida de los seres humanos, por lo general, causada por un impulso que genera esta sensación, desapareciendo cuando finaliza este impulso. Sin embargo, para algunas personas empeora la ansiedad y se convierte en un trastorno que se presenta comúnmente. Casi siempre las crisis de ansiedad aparecen después de un periodo de grandes tensiones emotivas, de problemas graves, de cansancio físico o mental o de la típica sobrecarga que dan los problemas sin resolver. Los tipos de trastornos psíquicos son: trastorno de pánico, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno de estrés postraumático, fobias y trastorno de ansiedad generalizada (NIH, 2013).

Es así, que este conjunto de trastornos se encuentran entre los problemas de salud mental más comunes del mundo, siendo la tercera patología psiquiátrica más frecuente, después de abuso de sustancias y depresión, afectando a personas de todas las edades sin discriminación de raza y color, interfiriendo en el día a día y en la felicidad del individuo (Lyness, 2014) (Fernández, 2015).

Stefan Hofmann, presidente de la Asociación Internacional de Psicoterapia Cognitiva, en el décimo Congreso de la Asociación Latinoamericana de Psicoterapias Cognitivas (Alapco), indicó acerca de la ansiedad: “Si bien su prevalencia no ha cambiado en el tiempo, lo que sí se ha modificado es la preocupación por ella. Antes era una patología estigmatizada de la que no se podía hablar; hoy estamos más abiertos a reconocerla”. Los trastornos psíquicos del sistema nervioso, en el mundo actual, se han convertido en un fenómeno masivo y en un problema social, incluso en los países más desarrollados (Guzmán, 2015) (Pérez, 2014).

Según el Instituto de Salud Mental de los Estados Unidos, más de 20 millones de personas en EE.UU padecen de depresión, 40 millones trastornos de ansiedad y 6 millones de pánico, mientras que en nuestro país no hay datos concretos sobre esta realidad (IEMS-OMS, 2007). Por otro lado también se encuentran los problemas relacionados con el estrés oxidativo, la generación de especies reactivas de oxígeno y otros radicales es un proceso normal durante el metabolismo celular, sin embargo el medio ambiente, ejercicio excesivo, contaminantes y patologías pueden generar una acumulación y exceso de radicales resultando en el estrés oxidativo, situación que puede dañar los constituyentes celulares e inducir muerte celular, además el estrés oxidativo se ha vinculado con patologías cardiovasculares, neurodegenerativas, envejecimiento, diabetes y cáncer, adquiriendo relevancia esta última patología ya que el cáncer a nivel mundial es una de las causas principales de muerte alrededor del mundo, en 2012, hubo 14 millones de casos nuevos y 8,2 muertes relacionadas con el cáncer. Además se estima que el

número de casos nuevos de cáncer aumentará a 22 millones en las siguientes dos décadas y más del 60 por ciento de los nuevos casos de cáncer en el mundo tendrán lugar en África, Asia, Sudamérica y Centroamérica; 70 por ciento de las muertes por cáncer en el mundo también ocurren en estas regiones (NIH, 2012). En Ecuador quince de cada cien muertes en el país se producen a causa del cáncer, nos encontramos a nivel medio en la escala mundial y regional. Según GLOBOCAN 2012 se estimó que la incidencia de cáncer en hombres fue de 162 por 100.000 habitantes, por encima de países como Perú o Venezuela. Según información de la OPS, el 20% de las muertes por cáncer en hombres y el 15% de las muertes en mujeres son por cáncer de estómago, la mortalidad por cáncer colorrectal y por cáncer de mama también se ha incrementado (Cueva, 2015).

La realización del estudio fitoquímico y evaluación de actividad antioxidante *in vitro* de hojas y flores de *Passiflora tripartita* intenta resolver una problemática de actualidad, y brindar alternativas terapéuticas a través de fitomedicamentos para aquellas personas que padecen trastornos de ansiedad y que han encontrado efectos adversos en el uso de medicamentos sintéticos como los barbitúricos y benzodiazepinas. El tipo de investigación empleada para determinar la actividad antioxidante de los metabolitos activos de *P. tripartita*, es de tipo experimental enfocada en la línea de productos naturales con actividad biológica.

Estudios demuestran que *Passiflora tripartita* posee metabolitos con actividad farmacológica, estos compuestos poseen una amplia gama de actividades entre las que destacan sus propiedades antioxidantes, las cuales les confieren capacidad de proteger a las células del estrés oxidativo. El conocer las características estructurales necesarias para sus efectos sobre los receptores GABA<sub>A</sub> es un desafío para el desarrollo de agentes específicos con el fin de lograr la producción de nuevos fármacos más selectivos y con menos efectos colaterales, útiles en la terapéutica de las disfunciones cerebrales y los trastornos mentales (Estrada et al., 2012, pp. 375-384) (Simirgiotis et al., 2013, pp. 1672-1692).

Aunque los resultados de diferentes estudios han demostrado que los flavonoides pueden actuar como prooxidante a muy altas dosis, la mayoría de las investigaciones han informado de actividades antiinflamatoria, antiviral, efectos antialérgicos y protección en las enfermedades del corazón, cáncer y patologías diferentes. Por ello, es importante realzar mediante esta investigación la capacidad de los polifenoles para actuar como antioxidantes en sistemas biológicos, hecho que ya ha sido reconocido; aunque el mecanismo antioxidante fue ignorado en gran medida hasta hace poco, los flavonoides poseen una actividad amplia farmacológica, pueden unirse a enzimas, transportadores hormonales y el ADN, etc.; además catalizar el transporte de electrones y depuración de radicales libres (Martínez et al., 2002, pp. 271-278).

Varias especies del género *Passiflora* han sido estudiadas y se han sugerido como fuentes potenciales de metabolitos con actividad farmacológica relevante, es así que se han evaluado propiedades ansiolíticas de extracto de *Passiflora* en el que se ha identificado por HPLC homoorientina, orientina, vitexina, isovitexina como compuestos principales y causantes de esta actividad (Grundmann et al., 2008, pp. 1769-1773). La actividad antioxidante muestra una correlación con la cuantificación de isoorientina en los extractos de *Passiflora*, sugiriéndolas como una posible fuente de flavonoides naturales (Zeraik et al, 2011, pp. 259-265). Además, las hojas de varias especies de *Passiflora* se emplean principalmente en la medicina popular como ansiolítica y sedante mostrando actividad las fracciones con presencia de isovitexina (Santos et al., 2006). La fruta de la pasión (*Passiflora tripartita*), por su contenido de compuestos fenólicos y flavonoides posee capacidad antioxidante, se ha identificado flavonoides C-glucósidos y O-glucósido que están estructuralmente relacionados con el derivado 4 'orientin-metoxi-luteolina-8-C- (6 "acetilo), junto con schaftosida, vicenina II, orientina y vitexina, los cuales muestran una buena capacidad antioxidante (Simirgiotis et al., 2013, pp. 1672-1692).

Los flavonoides proporcionan protección UV y color, al tener un sistema de anillo condensado pueden dividirse en varias clases en función de su estructura, en el SNC varios flavonas se unen al sitio de benzodiazepina en el receptor GABA<sub>A</sub> dando como resultado sedación, efectos ansiolíticos o anti-convulsivos. Flavonoles, flavanonas y antocianidinas tienen efectos protectores que impiden los procesos inflamatorios, los flavonoides parecen capaces de influir en la salud y el estado de ánimo (Jäger, 2011, pp. 1471-1485).

El gran campo de aplicación farmacológica que poseen los flavonoides predispone a las plantas que poseen estos compuestos a ser objeto de estudio con el fin de obtener tratamientos más seguros y eficaces que no perjudiquen el estilo de vida de un paciente sino, por al contrario, la mejore.

En los últimos años, en el mundo se han incrementado los casos de pacientes con resistencia a medicamentos especialmente a los sintéticos, han aparecido efectos no deseados y el precio elevado de muchos medicamentos también se ha visto en ascenso. Ante este contexto, este tema de investigación intenta proponer una alternativa de tratamiento natural a través de la identificación, extracción y purificación de metabolitos de flores y hojas con actividad ansiolítica y antioxidante del taxo (*Passiflora tripartita*).



## **OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **Objetivo General.**

Estudiar la composición fitoquímica y capacidad captadora de radicales libres *in vitro* de extractos de hojas y flores de taxo (*Passiflora tripartita*).

### **Objetivos Específicos.**

- 1.** Determinar la calidad de la materia vegetal seca y la composición fitoquímica de las hojas y flores del taxo (*Passiflora tripartita*) mediante control calidad y el tamizaje fitoquímico.
- 2.** Identificar mediante cromatografía en capa delgada (CCD) componentes de tipo flavónicos en los extractos de hojas y flores de *Passiflora tripartita*.
- 3.** Cuantificar el contenido de fenoles totales y flavonoides en hojas y flores de *P. tripartita* mediante espectrofotometría y HPLC.
- 4.** Evaluar la capacidad captadora de radicales libres *in vitro* de extractos de hojas y flores de *Passiflora tripartita* a través del ensayo 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH).

# CAPITULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Medicina Convencional

#### *1.1.1. Definición*

Es el conjunto de saberes y técnicas utilizadas para recobrar, aliviar y preservar el estado de salud de los seres humanos, a través de la prevención y protección de enfermedades, su objetivo es mejorar la calidad de vida del paciente, se conoce como medicina alópata, biomedicina, occidental, ortodoxa. Este conjunto ha ido evolucionando y progresando con el tiempo y su práctica está basada en evidencia (Evicancer, 2012).

Con este tipo de medicina los profesionales de la salud tratan signos y síntomas de las enfermedades frenando el progreso de las mismas, los métodos utilizados son industriales entre ellos estas los medicamentos, radiación, quimioterapia o cirugías. La medicina natural en cambio es aquella que utiliza remedios tradicionales no industriales y métodos de diagnóstico diferentes. La mayoría basados en costumbres indígenas de hecho la medicina natural utilizada en la fitoterapia tienen los mismos principios activos que contiene un medicamento utilizado en la medicina convencional, con la diferencia que estos han sido obtenidos por maceración, reflujo, concentración o infusión y los otros por procedimientos industriales respectivamente (Gavin, 2013).

#### *1.1.2. Medicamento*

Los medicamentos son la unión de un principio activo, excipientes y material de acondicionamiento, presenta propiedades curativas y preventivas frente patologías, porque ayuda a recuperar el equilibrio del cuerpo, a los medicamentos se los puede conocer por su nombre registrado o marca comercial y por su nombre científico (Collegi de Farmacèutics de Barcelona).

**Medicamento esencial**, son aquellos que abordan la mayoría de necesidades prioritarias de la población, su elección se realiza analizando la prevalencia y morbimortalidad de las enfermedades, costo-eficacia, eficiencia y seguridad (OMS). La OMS en 1985 define el **uso**

**racional de medicamentos** como la adecuada entrega de fármacos hacia los pacientes, en dosis, cantidad, para un tiempo determinado y a un precio accesible; considerando los requerimientos individuales del paciente (OMS, 1985).

## **1.2. Medicina Alternativa**

### ***1.2.1. Definición***

La medicina alternativa es aquella que proviene de diversos lugares del mundo, estas técnicas no son reconocidas por la medicina occidental, no son utilizadas en situaciones de alta complejidad, utilizan similares remedios para tratar una patología con la diferencia de que la medicina alternativa se aplica en vez de la medicina convencional, mientras que en la complementaria se utilizan ambas, ninguna sustituye a la otra. Esta medicina utiliza compuestos que se obtienen directamente de la naturaleza y las usan en forma de gotas, cremas, ungüentos e incluso formas farmacéuticas como píldoras, sus técnicas son no invasivas como la meditación y relajación, trabaja en las emociones pues se cree que muchas de las enfermedades se originan por el estrés de la rutina diaria (Zhang, Xiaorui).

### ***1.2.2. Tipos de medicina alternativa***

Existen 5 tipos de medicina alternativa según el centro nacional de medicina complementaria y alternativa (NCCAM) de los Estados Unidos.

- Terapias biológicas: uso de las diversas partes de plantas medicinales según tradiciones o creencias.
- Enfoques sobre la mente y el cuerpo: capacidad de la mente para afectar la función y síntomas corporales
- Métodos para manipular el cuerpo: masajes corporales para calmar el dolor y relajación.
- Sistema medico alternativo: sistema completo de teoría y práctica
- Terapias sobre la base de la energía como impulsos eléctricos, magnéticos entre otros (Cardoso, Freddy).

### ***1.2.3. Fitoterapia***

La fitoterapia es la medicina a base de hierbas, el conocimiento mundial sobre esta alternativa de tratamiento ha ido incrementando lo que ha impulsado la pesquisa de información científica

sobre los metabolitos secundarios de las plantas, para demostrar que su uso es eficaz y seguro. Las plantas al igual que los medicamentos pueden provocar reacciones adversas, interacciones e intoxicaciones por sobredosis, sin embargo, una hierba contiene muchos ingredientes activos a diferencia de la única sustancia química en una droga o medicamento, y puede tener varias acciones de apoyo a la salud del cuerpo. Fitoterapia se basa en el sistema más antiguo y más universal de la medicina (Zeylstra, 2015) (Bone, K.; Mills, S, 2013).

### **1.3. Uso de medicamentos**

Antes de que existiera la medicina de hoy en día y sus farmacopeas de drogas sintéticas, había plantas, y las civilizaciones antiguas sabían cómo usarlos estratégicamente para tratar dolencias comunes y las enfermedades, incluso mortales. Hoy en día, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 80 por ciento de la población mundial todavía utiliza remedios tradicionales, incluyendo las plantas, mientras tanto, la mayoría de los nuevos medicamentos (70 por ciento) se derivan de productos naturales, principalmente plantas, aunque por desgracia el uso de plantas medicinales en la vida cotidiana en gran parte se ha perdido (Mercola, 2014).

El uso irracional de los medicamentos es un problema importante en todo el mundo. La OMS estima que más de la mitad de todos los medicamentos se prescriben, dispensan o venden de forma inapropiada, y que la mitad de todos los pacientes no toman correctamente. El uso excesivo, insuficiente o mal uso de medicinas resultados en el despilfarro de los escasos recursos y riesgos para la salud generalizados (OMS, 2009).

Los ansiolíticos son un tipo de medicamento con receta utilizado para tratar los síntomas de la ansiedad aguda, estos medicamentos tienden a trabajar más rápidamente. Sin embargo, pueden provocar dependencia y por lo general se prescriben para el uso a corto plazo. Los ansiolíticos no son recomendables para las personas con un historial de abuso de sustancias (Krucik, 2013).

Los ansiolíticos y sedantes (hipnóticos) incluyen las benzodiazepinas, barbitúricos y medicamentos relacionados. Las dosis altas pueden causar estupor y depresión respiratoria, el beneficio terapéutico de ansiolíticos y sedantes está bien establecido (O'Connor, 2008).

#### ***1.3.1. Efectos adversos a medicamentos***

La OMS considera como efecto adverso a cualquier respuesta nociva o no intencionada del cuerpo a un fármaco que se produce a dosis normales para el tratamiento diagnóstico o profilaxis. Unas reacciones de medicamento se presentan en todos los pacientes mientras que

otras solo en ciertas poblaciones. Todos los medicamentos tienen efectos secundarios debido a su forma de trabajar, los más comunes son erupciones, picazón, náuseas, vómitos, diarrea (o en ocasiones estreñimiento), letargo, dolores de cabeza y visión borrosa (OMS, 2014). Muchos fármacos interactúan de alguna manera con otros, por ello algunas interacciones pueden llegar a ser muy graves aunque muchos son sólo 'advertencias'.

#### *1.3.1.1. Efectos secundarios causados por medicamentos utilizados para la ansiedad*

Uno de los efectos más comunes que exhiben las personas que han estado medicándose con ansiolíticos son los problemas de memoria, también generan sueño, enlentecimiento motor y cognitivo, en raras ocasiones impotencia, y en otros casos aumento de peso, aunque el efecto secundario más peligroso es el potencial adictivo del fármaco, ya que el cuerpo consigue una elevada tolerancia y cada vez se requiere más dosis del ansiolítico para percibir los efectos de éste. En el caso de los menores la mayoría de los médicos prefieren usar medicamentos que han sido muy estudiados en niños, y comienzan el tratamiento con medicamentos que causan menos efectos secundarios, es así que se utilizan medicamentos inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRIs) que se toman sólo una vez al día, no son adictivos y usualmente tienen pocos efectos secundarios; otros menos utilizados son las benzodiazepinas para tratar la ansiedad aguda, los cuales son recetados por unos pocos meses porque producen tolerancia (Understood.Org, 2014) (Blasco, 2015).

### **1.4. TAXO (*Passiflora tripartita*)**

#### *1.4.1. Descripción taxonómica*

**Familia:** Passifloraceae

**Género:** Pasionaria

**Especie:** tripartita var. mollissima

**Sinónimo:** *Passiflora mollissima* (Garden, 2010)

El género *Passiflora* incluye plantas trepadoras con flores espectaculares. Reciben su nombre del hecho de que los misioneros jesuitas en América del Sur la utilizaban para representar la Pasión de Cristo a los nativos, la flor, su pistilo, los diseños de su corola y varias partes florales se asemejan una corona de espinas, martillo y clavos de la crucifixión (Francófonos Hit-Parade).

#### ***1.4.2. Nombres Populares.***

Se conoce como curuba, curuba de Castilla, o curuba sabanera blanca (Colombia); taxo, tagso, tauso (Ecuador); parcha, taxo (Venezuela), tumbo o curuba (Bolivia); tacso, tumbo, tumbo del norte, trompos, tintín o purpur (Perú). (Garden, 2010)

#### ***1.4.3. Historia.***

Es nativo y se encuentran comúnmente en el medio silvestre en los valles andinos de Venezuela y el este de Colombia, Bolivia y Perú. Se cree que fue domesticado poco antes de la conquista española. Hoy en día se cultiva comúnmente y los frutos se venden regularmente. En 1920, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos recibió semillas de Guayaquil, Ecuador (SPI No. 51.205), y de Bogotá, Colombia (SPI No. 54399). El taxo se cultiva en California como ornamental bajo el nombre "pasiflora softleaf"; se cultiva en cierta medida en Hawai y el Estado de Madras, India. El clima de Nueva Zelanda parece muy adecuado para ello y ha crecido allí, más o menos desde hace varias décadas (Morton, 1987).

#### ***1.4.4. Descripción Botánica.***

Es un trepador vigoroso aproximadamente 6.7 metros, tallos casi cilíndrica densamente recubierto con pelos amarillos. Sus hojas profundamente lobuladas de 3 a 4 pulgadas (7.5-10 cm) de largo y 2 - 6 cm de ancho, son finamente dentada y vellosas, en la parte anteriormente son grisáceo o amarillento-aterciopelado. Las estípulas son cortos, delgado y curvo. La flor atractiva tiene un tubo de 3 a 4 en (7,5 a 10 cm) de largo, de color verde, corola con 5 sépalos y pétalos oblongos, color rosa con un ancho de 5-7.5 cm; con corona púrpura. El fruto es oblonga o alargada ovoide, 5-12 cm de largo, 2 – 4 cm de ancho. La corteza es gruesa, correosa, blanquecino o amarillo, pulpa muy aromática (arilos), de color salmón, sub-ácido a ácido y rico en sabor, rodea a las pequeñas semillas reticuladas planas, negras, elípticas y envueltas en mucílago (Morton, 1987) (Francófonos Hit-Parade).

#### ***1.4.5 Habitat***

Esta especie está en alturas entre 6.000 y 7.200 pies (1,800-3,200 m) en los Andes, y se ha adaptado bien a altitudes de 4,000 a 6,000 pies (1,200-1,800 m) en Hawai y Nueva Zelanda. Puede tolerar breves descensos de temperatura de 28.4° F (-2° C) (Morton, 1987).

#### ***1.4.6. Parte utilizada***

**FRUTO:** De forma ovalada, con la piel de color amarillo brillante y pulpa color naranja. La pulpa es comestible y muy sabroso, aunque por lo general no es tan apreciado como el maracuyá púrpura. A menudo se utiliza en la elaboración de jugo. En Bolivia, el jugo, combinado con aguardiente y azúcar, se sirve como un cóctel antes de la cena. Colombianos utilizarlo en los postres de gelatina, en Ecuador, la pulpa se convierte en helado; el Departamento de Agricultura ha desarrollado recetas tentadoras para fomentar el cultivo y la utilización de la pulpa sin semillas como relleno y también para hacer tarta de merengue, salsa, condimento, jalea, mermelada y otras conservas, como se menciona en la base de datos de Trade Winds Fruit, 2013.

#### ***1.4.7. Composición química***

*Passiflora tripartita* a través de métodos cromatográficos se ha realizado la identificación de los principales compuestos fenólicos en muestras por HPLC-DAD y HPLC-MS. El análisis permitió la detección de dieciocho flavonoides C-glucósidos y cuatro derivados O-glucósido, varios de los C-glucósidos detectados fueron estructuralmente relacionados con la orientina derivado de 4'-metoxi-luteolin-8-C- (6 "acetilo) - $\beta$ -D-glucopiranosido, junto con schaftosida, vicenina II, orientina y vitexina (Simirgiotis et al., 2013).

#### ***1.4.8 Acciones farmacológicas.***

La literatura etnobotánica también ha indicado que la planta *Passiflora* contiene una variedad de compuestos, incluyendo alcaloides, fenoles, flavonoides, glicósidos cianogénicos y derivados. El extracto de hoja de especies de *Passiflora* se ha demostrado que poseen actividad sedante y ansiolítico, así como también para el tratamiento de diabetes, hipertensión, anti-inflamatoria, antioxidantes, antibacteriano y propiedades anti fúngicas. En apoyo de estas afirmaciones, un estudio realizado por Birner y Nicolls ha informado el aislamiento de un compuesto antibacteriano y antimicótico llamado Passicol de *P. edulis*. (Ramaiya et al., 2014)

Para frenar los estados de ansiedad y cansancio el jugo de esta fruta andina, posee un efecto sedante debido a su contenido de pasiflora, esta fruta rica en vitamina C no solo funciona como calmante, sus usos medicinales permiten aliviar otras dolencias a través de la utilización de su planta y sus hojas. Héctor Sisalema, comunero de Condoragua, en la provincia de Tungurahua, considera que esta planta calma y regula los ciclos menstruales al mezclarla con culantrillo. Además, indica que sirve para afecciones del corazón y molestias durante el posparto. Las hojas

de la planta se usan también para combatir golpes e hinchazones en la piel. En cambio, los habitantes de la provincia de Imbabura emplean la flor machacada en infusión para blanquear la cara y curar el espanto (Ministerio de Agricultura y Patrimonio, 2015)

## **1.5. Flavonoides**

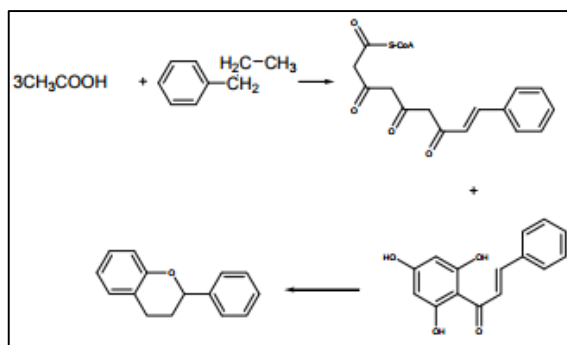
Los flavonoides están presentes en casi todas las plantas terrestres, en las que proporcionan protección UV y el color. Los flavonoides tienen un sistema de anillo condensado que consta de un anillo aromático y un anillo de benzopirano con un sustituyente fenilo. Los flavonoides se pueden dividir en varias clases en función de su estructura (Jäger et al.,2011) (Kumar et al., 2011).

Los flavonoides están presentes en los alimentos y plantas medicinales y por lo tanto son consumidos por los seres humanos. Se encuentran en las plantas como glucósidos. Antes de la absorción oral, los flavonoides se someten a desglicosilación ya sea por lactasa hidrolasa floridzina o citosólica  $\beta$ -glucocidase. La aglicona absorbida se conjuga a continuación, por metilación, sulfatación o glucuronidación. Tanto las agliconas y los conjugados pueden pasar la barrera hematoencefálica. En el SNC varias flavonas se unen al sitio de benzodiazepinas en el receptor GABAA que resulta en sedación, efectos ansiolíticos o anti-convulsivos. Los flavonoides de varias clases son inhibidores de la monoamina oxidasa A o B, trabajando de ese modo como antidepresivos o para mejorar las condiciones de los pacientes de Parkinson. Flavonoles, flavanonas y antocianidinas tienen efectos protectores que impiden los procesos inflamatorios que conducen a la lesión del nervio. Los flavonoides parecen capaces de influir en la salud y el estado de ánimo (Jäger et al.,2011) (Kumar et al., 2011).

### ***1.5.1. Síntesis absorción y metabolismo***

Los flavonoides se sintetizan en las plantas y participan en la fase dependiente de luz de la fotosíntesis, durante la cual catalizan el transporte de electrones, su formación tiene lugar a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina y también de unidades de acetato. La fenilalanina y la tirosina dan lugar al ácido cinámico y al ácido parahidroxicinámico, que al condensarse con unidades de acetato, originan la estructura cinamol de los flavonoides. Posteriormente se forman los derivados glicosilados o sulfatados. El metabolismo de los flavonoides es intenso y una parte importante se excretan por la orina. La transformación de los flavonoides tiene lugar en dos localizaciones: en primer lugar en el hígado, por medio de reacciones de biotransformación de fase I en las que se introducen o exponen grupos polares; en segundo lugar en el colon mediante reacciones de biotransformación de fase II, en las que los microorganismos degradan los flavonoides no absorbidos (Martínez et al.,2002) (Kumar et al., 2011).

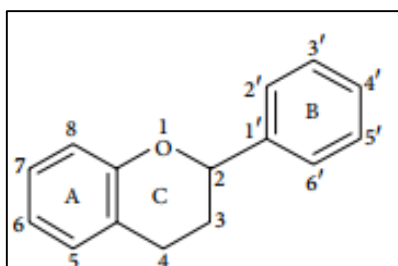




**Figura 1.-** Síntesis de Flavonoides  
Fuente: Harleen Kaur Sandhar, 2011

### 1.5.2 Química de los flavonoides

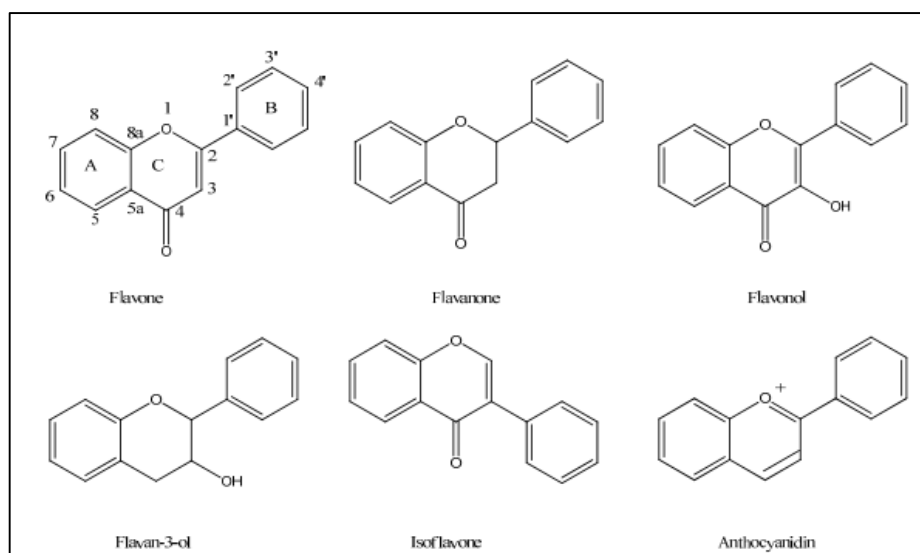
Químicamente los flavonoides se basan en un contenido de quince carbonos que consta de dos anillos bencénicos (A y B como se muestra en la Figura) unido a través de un anillo de pirano heterocíclico CO. Estos se pueden dividir en una variedad de clases, tales como flavonas (por ejemplo, flavona, apigenina y luteolina), flavonoles (por ejemplo, quercetina, kaempferol, miricetina y fisetina), flavanonas (por ejemplo, flavanona, hesperetina, y naringenina), y otros (Cartaya et al., 2001).



**Figura 2.-** Estructura básica de un flavonoide  
Fuente: Harleen Kaur Sandhar, 2011

Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C.

1. Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C (Jäger et al., 2011) (Kumar et al., 2011).



**Figura 3.-** Clasificación de flavonoides

Fuente: Saaby y col, 2011

Las diversas clases de flavonoides difieren en el nivel de oxidación y el patrón de sustitución del anillo C, mientras que los compuestos individuales dentro de una clase, difieren en el patrón de sustitución de los Anillos A y B. Los flavonoides se originan como agliconas, glucósidos y derivados metilados, la estructura básica es la aglicona. . La posición del sustituyente bencenoide divide la clase flavonoide en flavonoides (2 posiciones) e isoflavonoides (3 posiciones), mientras que los flavonoles difieren de flavanonas por grupo hidroxilo en la posición 3 y un doble enlace C2-C3. Cuando se forman los glucósidos, el enlace glicosídico normalmente se encuentra en las posiciones 3 o 7 y el hidrato de carbono puede ser L-ramnosa, D-glucosa, glucorhamnose, galactosa, o rabinosa, pero antes de la absorción en la circulación sistémica estos glucósidos deben someterse a desglicosilación. Este proceso se produce predominantemente en el lumen intestinal, principalmente a través de la acción de dos enzimas: hidrolasa floridzina lactasa (LPH) y citosólica  $\beta$ -glucosidasa (CBG). (Cartaya et al., 2001) (Grotewold, 2006)

#### 1.5.2.1. Características espectrales de flavonoides.

Estudios sobre flavonoides por espectroscopia han revelado que la mayoría de las flavonas y flavonoles presentan dos bandas de absorción principales: Banda I (320 a 385 nm) representa la absorción anillo B, mientras Banda II (250-285 nm) corresponde a la absorción anillo A. Los grupos funcionales unidos a la cadena de flavonoide puede causar un cambio en la absorción tales como de 367 nm en kaempferol, 371 nm en quercetina y a 374 nm en miricetina, lo que indica que a mayor número de sustituyentes hidroxilo la longitud de onda incrementa (Kumar et al., 2011).

### ***1.5.3. Actividad farmacológica***

#### *1.5.3.1. Actividad antioxidante*

Los flavonoides poseen muchas propiedades bioquímicas, pero la propiedad mejor descrita de casi todos los grupos de flavonoides es su capacidad para actuar como antioxidantes, esta depende de la disposición de grupos funcionales sobre la estructura nuclear, la configuración, la sustitución, y el número total de grupos hidroxilo influyen sustancialmente en varios mecanismos de la actividad antioxidante, tales como captación de radicales y la capacidad de quelación de iones metálicos. La configuración hidroxilo del anillo B es el determinante más importante de la compactación de las especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que donan hidrógeno y un electrón a hidroxilo, peroxilo, y a los radicales peroxinitrito, estabilizándolos y dando lugar a un radical flavonoides relativamente estables. Los flavonoides también inhiben la generación de radicales libres, la quercetina, en particular, es conocida por sus propiedades de estabilizador quelante de metales, la epicatequina y la rutina son fuertes eliminadores de radicales e inhibidores de la peroxidación lipídica *in vitro*. La literatura muestra que los flavonoides que tiene un enlace insaturado 2-3 en la conjugación con una función 4-oxo son los antioxidantes más potentes que los flavonoides que carecen de una o ambas características, la conjugación entre los anillos A y B permite un efecto de resonancia del núcleo aromático que proporciona estabilidad al radical flavonoide. El heterociclo de flavonoides contribuye a la actividad antioxidante al permitir la conjugación entre los anillos aromáticos y la presencia de un 3-OH libre. Se propone que el anillo B y grupos OH forman enlaces de hidrógeno con el 3-OH, alineando el anillo B con el heterociclo y un anillo. Debido a este enlace de hidrógeno intramolecular, la influencia de un 3-OH se ve reforzada por la presencia de un 3', 4'-catecol, por lo que se justifica la actividad antioxidante potente de flavan-3-oles y flavon-3-oles que poseen esta última característica. Generalmente O-metilación de los grupos hidroxilo de los flavonoides disminuye su capacidad de captación de radicales (Kumar et al., 2011) (Pérez, 2003).

La posición, la estructura, y el número total de restos de azúcar en flavonoides (flavonoides glucósidos) juegan un papel importante en la actividad antioxidante. Agliconas son antioxidantes más potentes que sus correspondientes glicósidos (Tapas et al., 2008) (Pietta, 2000).

##### *1.5.3.1.1. Antioxidantes*

Los antioxidantes son sustancias químicas que protegen a las células mediante la neutralización de las fuerzas externas (tales como daños causados por el sol, la contaminación, el viento y temperatura) y factores internos (por ejemplo, las emociones, el metabolismo, y la presencia de

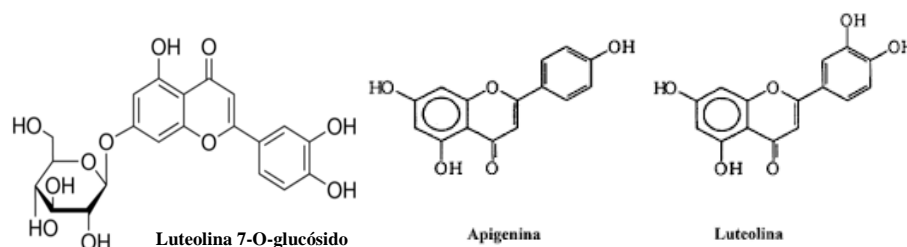
exceso de oxígeno). Los antioxidantes son necesarios porque luchar contra los radicales libres. Los radicales libres son subproductos que se forman cuando el oxígeno es utilizado por el cuerpo, estos tienen un electrón desapareado en su orbital exterior, haciendo que la molécula este inestable, por lo que intentan obtener un electrón (Reilly, 1996)

#### 1.5.3.1.2. Radicales libres

El oxígeno es esencial para la vida, pero a medida que nuestro cuerpo utiliza el oxígeno, que generan subproductos conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS) o, más comúnmente, los radicales libres. Algunas fuerzas que causan los radicales libres son la contaminación del aire, la luz del sol, el alcohol y el humo del cigarrillo. Otro factor es el estrés; el estrés produce productos relacionados con la adrenalina, que no sólo restringe el flujo de sangre a la piel, sino que también genera radicales libres destructivos potentes. Según la teoría de los radicales libres, el envejecimiento es causado por la oxidación acumulativo lenta de los tejidos del cuerpo durante toda la vida (Gutteridge, 1994). Los antioxidantes neutralizan los efectos de los radicales libres, pero la actividad pueden ser limitados a los antioxidantes específicos. Las plantas producen cientos de antioxidantes para su propia protección algunos que también pueden ser útil para nosotros.

#### 1.5.3.2. Actividad hepatoprotectora.

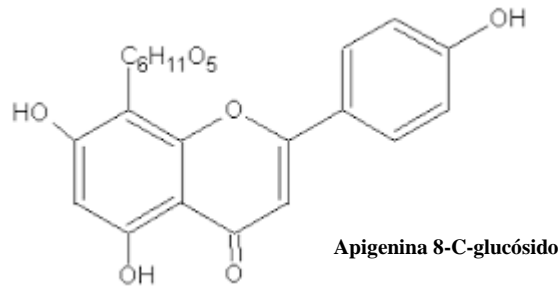
Flavonoides como catequina, apigenina, quercetina, naringenina, rutina, indican actividad hepatoprotector. Las antocianinas han llamado la atención cada vez más demostrando que la antocianina cianidina-3-O- $\beta$ -glucósido (C3G) aumenta GCLC hepática resultando en una disminución en los niveles de ROS. Además, el tratamiento C3G reduce la peroxidación lipídica hepática, inhibe la liberación de citoquinas proinflamatoria y protege contra el desarrollo de esteatosis hepática. El efecto protector de la luteolina 7-O-glucósido contra la lesión hepática causada por tetracloruro de carbono en ratas ha sido probado (Tapas et al., 2008) (Sandhar et al., 2011).



**Figura 4.-** Estructura de compuestos con actividad hepatoprotectora  
Fuente: Saaby y col, 2011

#### 1.5.3.3. Actividad antibacteriana.

Los flavonoides son conocidos por ser sintetizado por las plantas en respuesta a la infección microbiana; varios flavonoides incluyendo apigenina, galangina, flavonas y flavonoles glucósidos, isoflavonas, flavanonas y chalconas han demostrado que poseen potente actividad antibacteriana. Luteolina 6-C-glucósido (homoorientin) y apigenina 8-C-glucósido (vitexina) contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* (Tapas et al., 2008) (Sandhar et al., 2011).



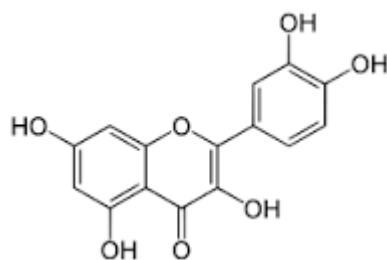
**Figura 5.-** Estructura compuesto actividad antibacteriana  
Fuente: Saaby y col, 2011

#### *1.5.3.4. Actividad antiinflamatoria.*

La inflamación es un proceso biológico en respuesta a la lesión tisular, microbiana, infección por patógenos e irritación química., ciertos miembros de flavonoides afectan significativamente a la función del sistema inmune y células inflamatorias, flavonoides, tales como: hesperidina, apigenina, luteolina y quercetina informan poseer efectos anti-inflamatorios y analgésicos, gran parte del efecto antiinflamatorio del flavonoide está en la biosíntesis de citoquinas que participan en la adhesión de leucocitos circulantes a los sitios de lesión (Tapas et al., 2008) (Sandhar et al., 2011).

#### *1.5.3.5. Actividad anticáncer*

Las frutas y verduras que tienen flavonoides han sido reportadas como quimiopreventivo del cáncer, el consumo de cebolla o manzanas, dos de las principales fuentes de la quercetina se asocia inversamente con la incidencia de cáncer de la próstata, pulmón, estómago y de mama. Además, los bebedores moderados de vino también parecen tener un menor riesgo de desarrollar cáncer del pulmón, endometrio, esófago, estómago y colon (Tapas et al., 2008) (Sandhar et al., 2011).



**Figura 6.-** Estructura compuesto con actividad anti cáncer

Fuente: Saaby y col, 2011

## 1.6. Ansiedad

La ansiedad es una emoción humana normal que todo el mundo experimenta a veces, es un término general para varios trastornos que causan nerviosismo, miedo, temor e intranquilidad, mucha gente se siente ansioso o nervioso, cuando se enfrentan a un problema en el trabajo, antes de tomar una prueba, o tomar una decisión importante. Los trastornos de ansiedad, sin embargo, son diferentes. Pueden causar tal angustia que interfiere con la capacidad de una persona para llevar una vida normal; un trastorno de ansiedad es una enfermedad mental grave. Para las personas con trastornos de ansiedad, la preocupación y el miedo son constantes y abrumador, y puede ser agobiante. Estos trastornos afectan cómo nos sentimos y nos comportamos, en términos generales, la ansiedad se produce cuando una reacción es desproporcionada en relación con lo que podría ser normalmente se espera en una situación (Gutteridge et al, 2014) (Grohol, 2015).

### 1.6.1. Manifestaciones clínicas.

Los síntomas varían dependiendo del tipo de trastorno de ansiedad, pero los síntomas generales incluyen:

- Los sentimientos de pánico, miedo y desasosiego
- Problemas para dormir
- Manos y / o pies fríos o sudorosos
- Dificultad para respirar
- Palpitaciones del corazón
- Una incapacidad para enmudece y calma
- Boca seca
- El entumecimiento u hormigueo en las manos o los pies
- Náuseas
- Tensión muscular, mareos (Gutteridge et al, 2014) (Grohol, 2015)

### ***1.6.2. Causas de los trastornos de ansiedad.***

La causa exacta de los trastornos de ansiedad se desconoce; pero los trastornos de ansiedad como otras formas de enfermedad mental no son el resultado de la debilidad personal, un defecto de carácter, o la mala crianza. Mientras los científicos continúan su investigación sobre la enfermedad mental, está cada vez más claro que muchos de estos trastornos son causados por una combinación de factores, incluyendo cambios en el cerebro y el estrés ambiental, trastornos de ansiedad pueden ser causados por problemas en el funcionamiento de los circuitos cerebrales que regulan el miedo y otras emociones. Por otra parte, ciertos factores ambientales - tales como un trauma o evento significativo pueden desencadenar un trastorno de ansiedad en personas que tienen una susceptibilidad heredada a desarrollar el trastorno (Gutteridge et al, 2014) (Grohol, 2015)

### ***1.6.3. Tipos de Ansiedad***

Hay varios tipos de trastornos de ansiedad incluyendo trastorno de pánico, trastorno de ansiedad social, fobias específicas, y el trastorno de ansiedad generalizada.

- El trastorno de pánico: Las personas con esta afección tienen sentimientos de terror que golpean de repente y en repetidas ocasiones sin previo aviso. Otros síntomas de un ataque de pánico incluyen sudoración, dolor de pecho, palpitaciones (inusualmente fuertes o latidos irregulares del corazón), y una sensación de asfixia, lo que puede hacer que la persona se sienta como él o ella está teniendo un ataque al corazón o "volverse loco".
- Trastorno de ansiedad social: También llamado fobia social, trastorno de ansiedad social implica preocupación abrumadora y la auto-conciencia sobre las situaciones sociales cotidianas. La preocupación se centra a menudo en un miedo a ser juzgado por otros, o comportarse de una forma que podría causar vergüenza o llevar al ridículo.
- Las fobias específicas: Una fobia específica es un miedo intenso de un objeto o situación específica, como serpientes, alturas, o volar. El nivel de temor es generalmente inadecuada a la situación y puede hacer que la persona a evitar situaciones comunes y cotidianas.
- Trastorno de ansiedad generalizada: Este trastorno implica excesiva, preocupación realista y tensión, incluso si hay poca o nada para provocar la ansiedad (Gutteridge et al, 2014) (Grohol, 2015)

### ***1.6.4. Tratamiento de la ansiedad.***

Los trastornos de ansiedad son tratables, a veces una evaluación física es aconsejable para determinar si la ansiedad de una persona se asocia con una enfermedad física, con el tratamiento

adecuado, muchas personas con trastornos de ansiedad pueden llevar vidas normales y plenas, ya que ciertos tipos de terapia cognitiva y conductual y ciertos medicamentos han demostrado ser especialmente útil para la ansiedad. En general, los trastornos de ansiedad se tratan con medicación, tipos específicos de psicoterapia, o ambos. Las opciones de tratamiento dependen del tipo de trastorno, la preferencia de la persona, y la experiencia del médico (Gutteridge et al, 2014) (NIH, 2015).

### **Medicación**

La medicación no cura necesariamente los trastornos de ansiedad, pero a menudo reduce los síntomas. Los principales medicamentos utilizados para los trastornos de ansiedad son antidepresivos, ansiolíticos y bloqueadores beta. La elección de la medicación adecuada, la dosis del medicamento, y el plan de tratamiento debe basarse en las necesidades individuales de la persona y la situación médica, y hecho bajo el cuidado de un experto (Gutteridge et al, 2014) (NIH, 2015).

### **Psicoterapia**

Psicoterapia implica hablar con un médico capacitado, como un psiquiatra, psicólogo, trabajador social o consejero, para entender lo que causó un trastorno de ansiedad y cómo tratar con él (Gutteridge et al, 2014) (NIH, 2015).

### **Terapia cognitivo conductual (TCC)**

TCC puede ser útil en el tratamiento de trastornos de ansiedad. Puede ayudar a las personas a cambiar los patrones de pensamiento que apoyan sus miedos y cambiar la forma en que reaccionan a las situaciones que provocan ansiedad, este es un tratamiento basado en la exposición se ha utilizado durante muchos años para tratar las fobias específicas. La persona se encuentra con gradualmente el objeto o situación que se temía, tal vez en un principio sólo a través de fotografías o cintas, luego cara a cara. La medicación se puede combinar con psicoterapia para los trastornos de ansiedad específicos y el tratamiento de combinación se ha encontrado para ser el mejor enfoque para muchas personas (Grohol et al, 2015) (NIH, 2015).

## **1.2. Antecedentes de la Investigación.**

De la especie *Passiflora tripartita*, se encontró mediante búsqueda bibliográfica un artículo científico publicado en journal molecules, con el título de The *Passiflora tripartita* (Banana Passion) Fruit: A Source of Bioactive Flavonoid C-Glycosides Isolated by HSCCC and



Characterized by HPLC–DAD–ESI/MS/MS, realizado en Chile, en el que se elaboraba extractos metanólicos de la cáscara y el jugo de frutas de *P. tripartita* en los que se analizó la capacidad antioxidante y el contenido de flavonoides y compuestos fenólicos. Los resultados reflejaron que las muestras presentan compuestos fenólicos que por HPLC-DAD y HPLC-MS, correspondieron a dieciocho flavonoides C-glucósidos y cuatro derivados O-glucósido flavonoides, los cuales fueron caracterizados por espectros de UV y el análisis ESI-MS-MS. Varios de los C-glucósidos detectados son estructuralmente relacionados con la orientina derivado de 4'-metoxi-luteolin- 8-C- (6 "acetilo) - $\beta$ -D-glucopiranosido. La pulpa de los frutos mostró una buena capacidad antioxidante ( $12,89 \pm 0,02 \mu\text{g} / \text{ml}$  en el ensayo DPPH). La cáscara presentó el mayor contenido de flavonoides ( $56,03 \pm 4,34 \text{ mg}$  de quercetina /  $100 \text{ g}$  de peso seco) que se relaciona con el más alto poder antioxidante ( $10,41 \pm 0,01 \mu\text{g} / \text{ml}$  en el ensayo DPPH) (Simirgiotis et al., 2013)

A través de la búsqueda bibliográfica se encontró varios estudios y publicaciones realizadas acerca de otras especies que pertenecen a la familia de las *Passifloras*, a continuación se menciona las más relevantes:

Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, investigada por Jun Denga, Yujuan Zhoua, Mengmeng Baia, Hongwei Li a, Li Lic, en este el objetivo de estudio fue evaluar las actividades ansiolíticas y sedantes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. Utilizando extractos en diferentes solventes, los cuales fueron provados en ratones albinos suizos sometidos posteriormente test conductuales y se concluyó que la parte aérea de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* era ansiolítico a dosis bajas pero sedante a altas dosis (Denga et al., 2010, pp.148-153)

## CAPITULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1. Lugar de recolección del material vegetal.

La especie de *Passiflora tripartita* se recogió en el cantón Riobamba, en la Parroquia Yaruquíes, entre Santa cruz y Lluyo zonas ubicadas en la Provincia de Chimborazo, entre 1800 a 3200 msnm.

Punto de recolección

Latitud: -1.703775547585323

Longitud: -78.62380743026733

Altitud: 2713 msnm

#### 2.2. Lugar de investigación

El estudio fitoquímico y de capacidad captadora de radicales libres *in vitro* de hojas y flores de *Passiflora tripartita* se realizó en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, en el Laboratorio de Productos Naturales.

#### 2.3. Criterios de Selección de la Muestra.

Para la selección de la muestra vegetal se consideraron varios parámetros de exclusión e inclusión aplicadas a las hojas y flores de *Passiflora tripartita*:

- Se incluyeron flores y hojas frescas en mejor estado, color apropiado y distintivo, además de aspecto agradable
- Se descartaron los ejemplares que presentaron algún tipo de deterioro por acción mecánica ejercida por el manipulador, la luz solar o deterioro a causa de insectos u otro tipo de animales. Además, se eliminaron las hojas y flores que presenten detrimento o putrefacción de origen microbiológico.

#### 2.4. Tratamiento de la muestra

Una vez recolectada la materia prima se realizó una limpieza procurando eliminar tierra, polvo e insectos. A continuación, se procedió al secado y molienda de la planta, de manera que las hojas y flores de *Passiflora tripartita* fue desecada en una estufa de aire caliente marca MEMMERT a una temperatura de 40°C por aproximadamente 3 días. Una vez verificado que toda la muestra vegetal estuvo seca fue triturada en molino de cuchillas marca ARTHUR H. THOMAS.C.O.PA.USA procurando un tamaño de partícula de 2-3 mm y enfundada en bolsas ziploc para evitar la ingreso de humedad.

## 2.5. Equipos y Reactivos

### 2.5.1. Equipos

**Tabla 1.**-Lista de equipos empleados en las diferentes determinaciones cualitativas cuantitativas

ANÁLISIS	EQUIPOS
<b>Control de calidad materia prima y Tamizaje Fitoquímico</b>	Molino
	Sonicador BRANSON 2510
	Estufa MEMMERT; estufa redLINE by BINDER
	Mufla OPTIC ivymen system SNOL
	Desecador
	Balanza analítica RADWAG
<b>Cromatografía en capa fina (TLC)</b>	Rotavapor R110
	Cámara Ultra Violet products INC. CHROMATO-VUE MODEL CC-20
<b>Extracción y cuantificación de fenoles y flavonoides totales (espectro UV)</b>	Balanza analítica
	Refrigerador
	Espectrofotómetro Cole Parmer S-2150
	Estufa MEMMERT; estufa redLINE by BINDER
	Cronómetro
	Pipetas automáticas BOECO Germany
<b>HPLC</b>	Filtro de jeringa
	Bomba al vacío
	Vórtex
	Equipo de filtración de fases móviles
<b>Capacidad captadora de radicales libres</b>	Espectrofotómetro
	Sonicador
	Bomba al vacío

Realizado por: Monserrath Lema, 2016

### 2.5.2. Reactivos

**Tabla 2.-** Lista de reactivos empleados en la investigación

ANÁLISIS	REACTIVOS
<b>Tamizaje fitoquímico</b>	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 FeCl <sub>3</sub> Reactivo de Borntrager Reactivo de Shinoda Reactivo de Antocianidinas Cloruro férrico Magnesio metálico Cloruro de sodio (polvo)
<b>Cromatografía en capa fina (TLC)</b>	Placas de Silica Acetato de etilo 100% Ácido acético glacial Ácido fórmico Agua bidestilada Metanol Acetato de plomo
<b>Extracción y cuantificación de fenoles y flavonoides totales (espectro UV)</b>	Soluciones de ácido gálico Metanol 98% Etanol 96% 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%

<b>HPLC</b>	Agua bidestilada Ácido fórmico 0.1% Acetonitrilo Metanol Hexano Etanol 70% HCl 2N
<b>Capacidad captadora de radicales libre</b>	Agua bidestilada 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl Metanol

Realizado por: Monserrath Lema, 2016

## 2.6. Técnicas y Métodos

### 2.6.1. Parámetros de control de calidad

#### 2.6.1.1. Determinación del contenido de humedad

El contenido de humedad se determinó mediante el método gravimétrico de la pérdida en masa que muestra una droga después de ser desecada en estufa de aire caliente. (Miranda, 2006)

Expresión de los resultados:

$$Hg = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100$$

Hg = pérdida en peso por desecación (%).

M<sub>2</sub> = masa de la cápsula con la muestra de ensayos (g)

M<sub>1</sub> = masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g)

M = masa de la cápsula vacía.

100 = factor matemático.

Los resultados se aproximan a las décimas

#### 2.5.2.2. Determinación de cenizas totales

El ensayo para determinar cenizas totales se realizó por un método gravimétrico en mufla.

Expresión de los resultados:

$$C = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

C = porcentaje de cenizas totales en base hidratada.

M = masa del crisol vacío (g)

M<sub>1</sub> = masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M<sub>2</sub> = masa del crisol con la ceniza (g)

100 = factor matemático para los cálculos.

Los valores se aproximan hasta las décimas.

#### 2.5.2.3. Determinación de cenizas solubles en agua

El contenido de cenizas solubles en agua se determinó mediante el método de la mufla.

Expresión de los resultados.

$$Ca = \frac{M_2 - Ma}{M_1 - M} \times 100$$

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

M<sub>2</sub> = masa del crisol con las cenizas totales (g).

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

M<sub>1</sub> = masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M = masa del crisol vacío.

100 = factor matemático.

Los valores se aproximan a las décimas.

#### 2.5.2.4. Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

El contenido de cenizas insolubles en ácido clorhídrico se determinó mediante el método de la mufla.

Expresión de los resultados:

$$B = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

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

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

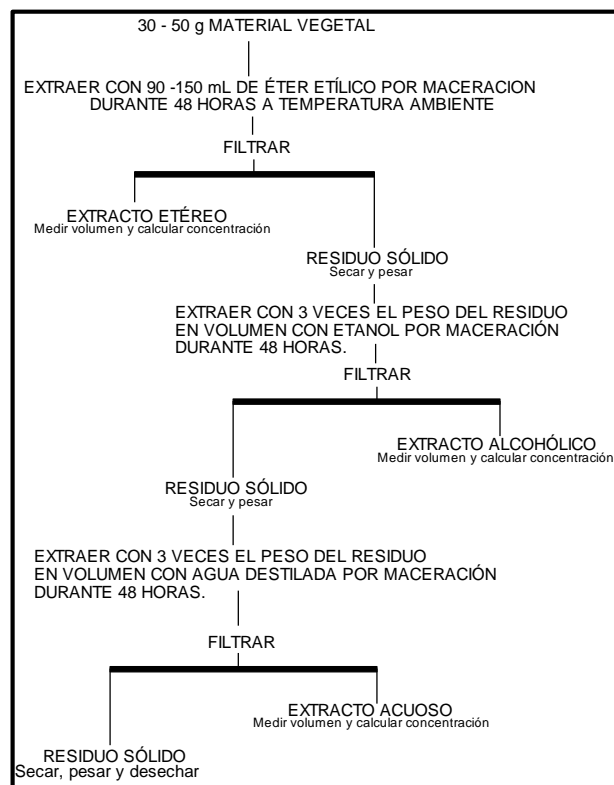
$M_2$ = masa del crisol con la ceniza (g)

100= factor matemático.

Los valores se aproximan hasta las décimas.

### 2.5.3. Tamizaje fitoquímico

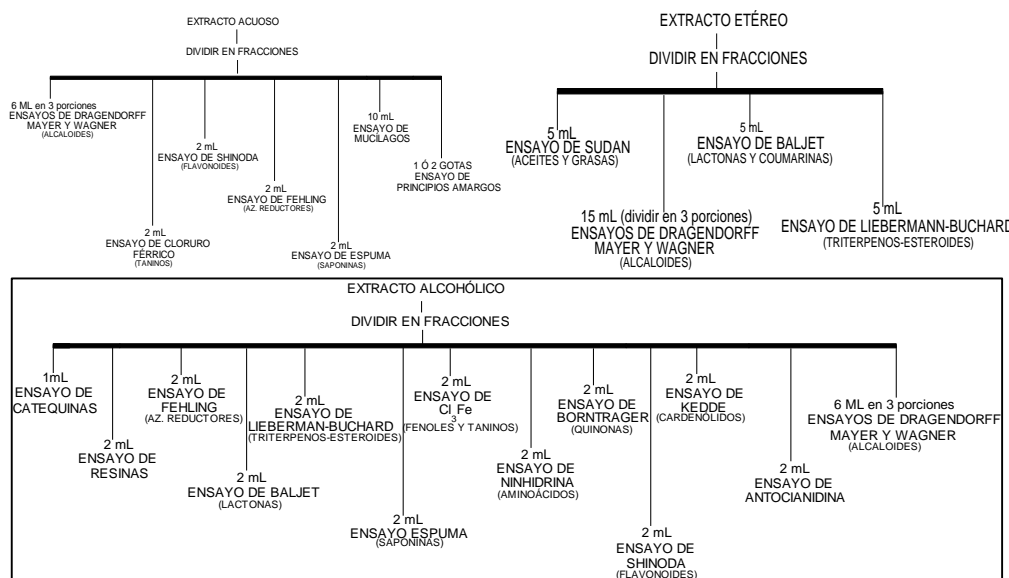
El tamizaje fitoquímico se realizó a través de reacciones químicas de identificación, mediante cambios de color o formación de precipitados, destinadas a determinar la presencia de metabolitos secundarios en la materia vegetal, siguiendo procedimientos especificados en Miranda, M. 2006; de manera que se prepararon tres extractos: etéreo, alcohólico y acuoso según lo que indica el siguiente esquema:



**Figura 7.-** Preparación de extractos por gradiente para análisis-Tamizaje Fitoquímico

Fuente: (Miranda, M. 2006).

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



**Figura 8.-** Ensayos cualitativos para identificación de metabolitos secundarios  
Fuente: (Miranda, M. 2006).

## 2.5.4. Análisis TLC

### 4.5.4.1. Preparación de la muestra glicosilada

El siguiente procedimiento se realizó para flores como para hojas:

1. Se pesó en balanza analítica 1 gramo de materia seca y pulverizada de *Passiflora tripartita*
2. Se extrajo con 10 ml de metanol al 98% mediante baño de agua por 5 minutos a una temperatura no mayor de 60 °C.
3. Se filtró el extracto y se separó las clorofilas con una solución de acetato de plomo 4% y ácido acético 0.5%.
4. Se centrifugo por 5 minutos y se separó el sobrenadante.
5. De 10 a 30 microlitros del sobrenadante se usó para siembra en placa de silica gel. (Wagner, 2001)

### 4.5.4.2. Sistema de solvente y revelador

El sistema de solvente que presentó mejor resolución con el extracto de glucósidos fue el expuesto en WAGNER, Hidebert; 2001, el cual consiste en: acetato de etilo, ácido acético, ácido fórmico, agua en proporciones 100:11:11:26, respectivamente. Se corrió la parte glicósida en una placa de silica gel con fluorescencia indicador 254nm, silica gel matrix L\*W 5 cm \*10 cm

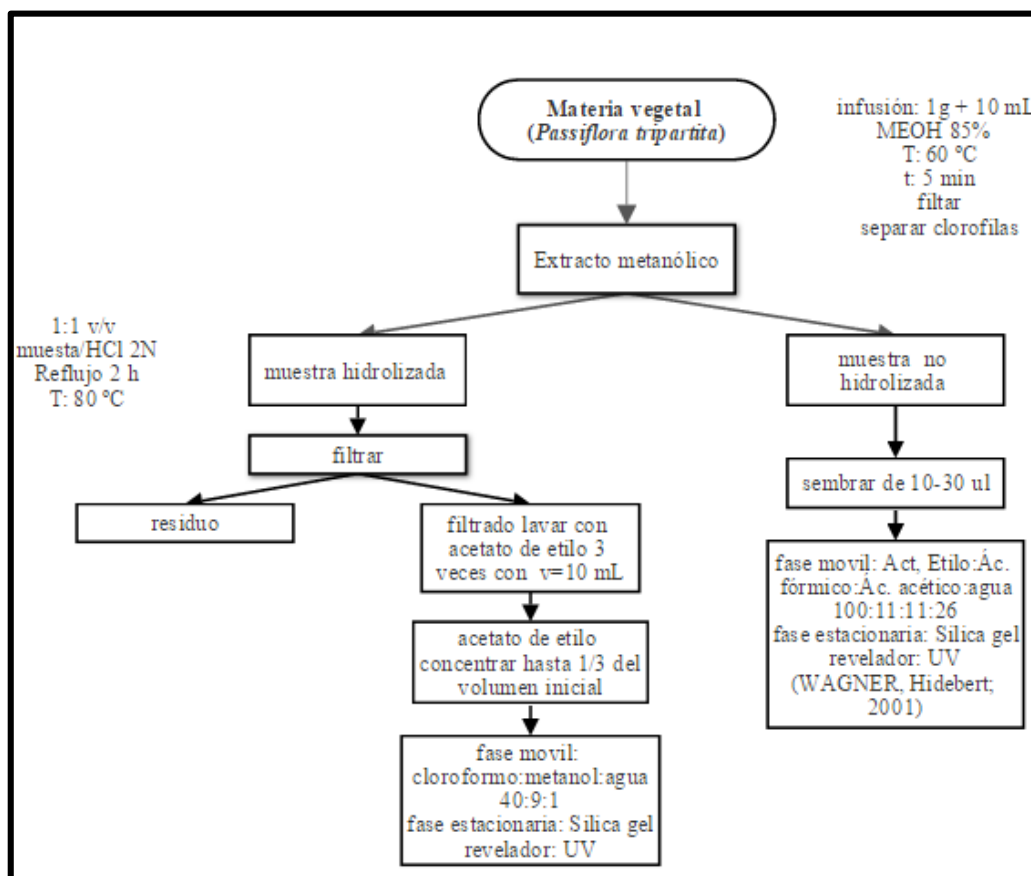


#### 4.5.4.3. Preparación de la muestra hidrolizada

Se sometió a reflujo la mitad del extracto durante 2 horas con HCl 2 N en una relación 1:1 y a una temperatura no mayor a los 85 °C. Se filtró con una bomba de pistón GAST; y al filtrado se realizó 3 lavados en embudo de separación con 10 mL de acetato de etilo y finalmente se concentró los lavados hasta 1/3 del volumen inicial.

#### 4.5.4.4. Sistema de solventes TLC extracto hidrolizado

El sistema de solvente utilizado para el extracto hidrolizado fue: cloroformo, metanol, agua en proporciones 40:9:1, respectivamente. Para la siembra se utilizaron 30 µL de muestra de extracto hidrolizado. La placa se reveló al UV. Los estándares para el análisis y comparación fueron: luteolina, apigenina (pureza >98%) y quercetina (pureza >96%), adquiridos de Shaanxi Huike Botanical Development Co., Ltd.



**Figura 9.**-Esquema análisis cromatografía en capa fina TLC

Realizado por: Monserrath Lema, 2016

#### ***4.5.5. Cuantificación de flavonoides y fenoles***

##### *4.5.5.1 Preparación de la muestra*

Se realizaron extractos de diferente polaridad con acetato de etilo 100 %, metanol 98% y etanol 70% en proporciones 1:5 w/v, por maceración durante 12 horas y posterior sonicación una hora. Se filtró al vacío y el filtrado se concentró a sequedad en un rotavapor R110. Para el análisis de flavonoides y fenoles totales el extracto seco se redisolvió con un volumen conocido de metanol 98%.

##### *4.5.5.2. Cuantificación de fenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu*

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

- Tomar 2mL de muestra o estándar diluido
- Añadir 0.5mL de reactivo Folin-Ciocalteu 20%
- Después de 5 minutos añadir 0.5 mL de solución de carbonato de sodio saturado (75 g/L)
- Inmediatamente añadir 5 mL de agua destilada
- Dejar reposar la mezcla por una hora bajo sombra a temperatura ambiente
- Efectuar las lecturas a una longitud de onda de 765 nm
- Trazar la curva de calibración (concentración vs absorbancia).

Los resultados se expresan como miligramos equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramos de muestra seca. (Huang et al., 2010, pp. 122-127) (Gracia, 2007)

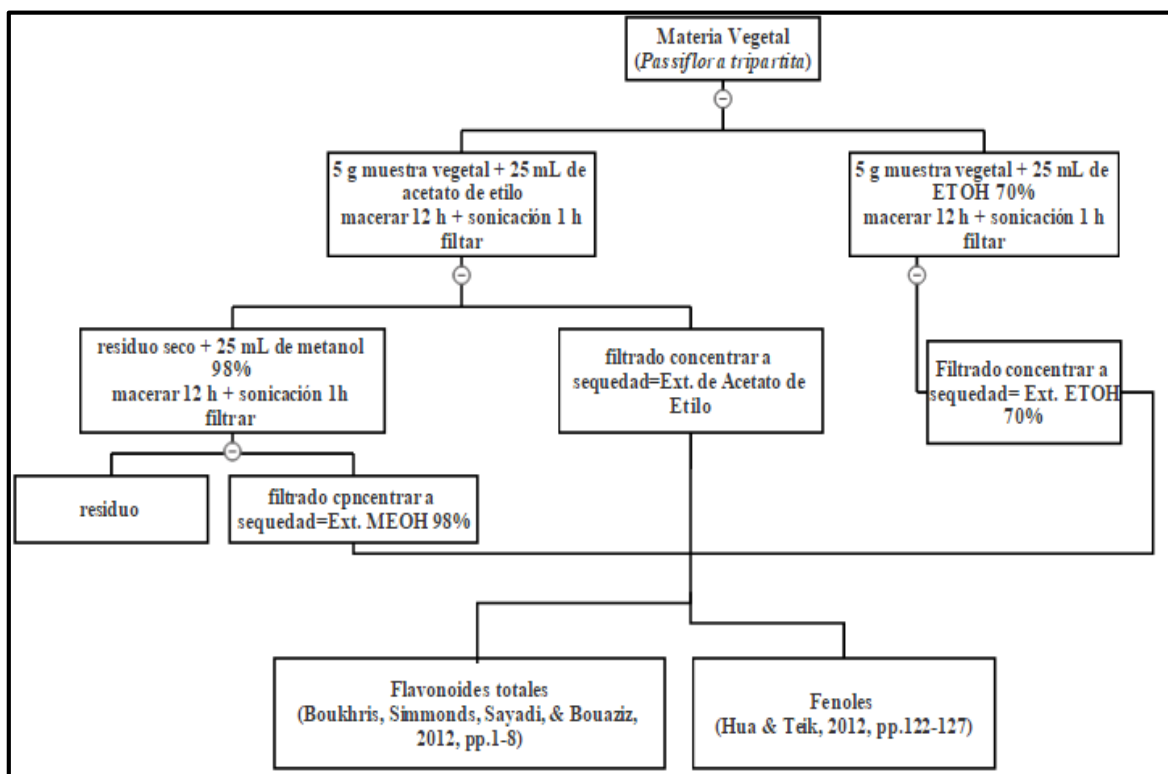
##### *4.5.5.3. Cuantificación de flavonoides totales mediante método colorimétrico*

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

- Tomar 1 mL de la muestra o estándar diluido
- Añadir 4 mL de agua destilada.
- A tiempo cero añadir 0.3 mL de NaNO<sub>2</sub> al 5%.
- Después de 5 minutos añadir 0.3 mL de AlCl<sub>3</sub> al 10%
- Esperar 6 minutos y añadir 2 mL de NaOH 1 M.

- Mezclar y dejar en reposo por 5 minutos a temperatura ambiente bajo sombra
- Leer la absorbancia de la mezcla caracterizada por un color rosado a 510 nm.
- Trazar la curva de calibración (concentración vs absorbancia) (Boukhris, Simmonds, Sayadi, & Bouaziz, 2012, pp.1-8)

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



**Figura 10.-** Cuantificación de flavonoides y Fenoles totales mediante AlCl<sub>3</sub> y Folin-Ciocalteu

Realizado por: Monserrath Lema, 2016

#### 4.5.6. Análisis HPLC

##### 4.5.6.1. Preparación de la muestra

La extracción se realizó a partir de 0.5 g de materia vegetal seca, la cual fue colocada en un tubo de vidrio con tapa de rosca y adicionado 10 ml de etanol al 70% junto con 10 ml de hexano, el tubo con su contenido se agitó vigorosamente mediante un agitador vórtex por alrededor de 15 minutos, posteriormente se filtró y se lavó el residuo con un volumen adicional de hexano y etanol 70%, de la solución filtrada obtenida se separó la fase hidroalcohólica (contiene los componentes flavónicos) ayudados de un embudo de separación (Øyvind et al., 2006) (Jiang et al., 2015, pp. 30-25).

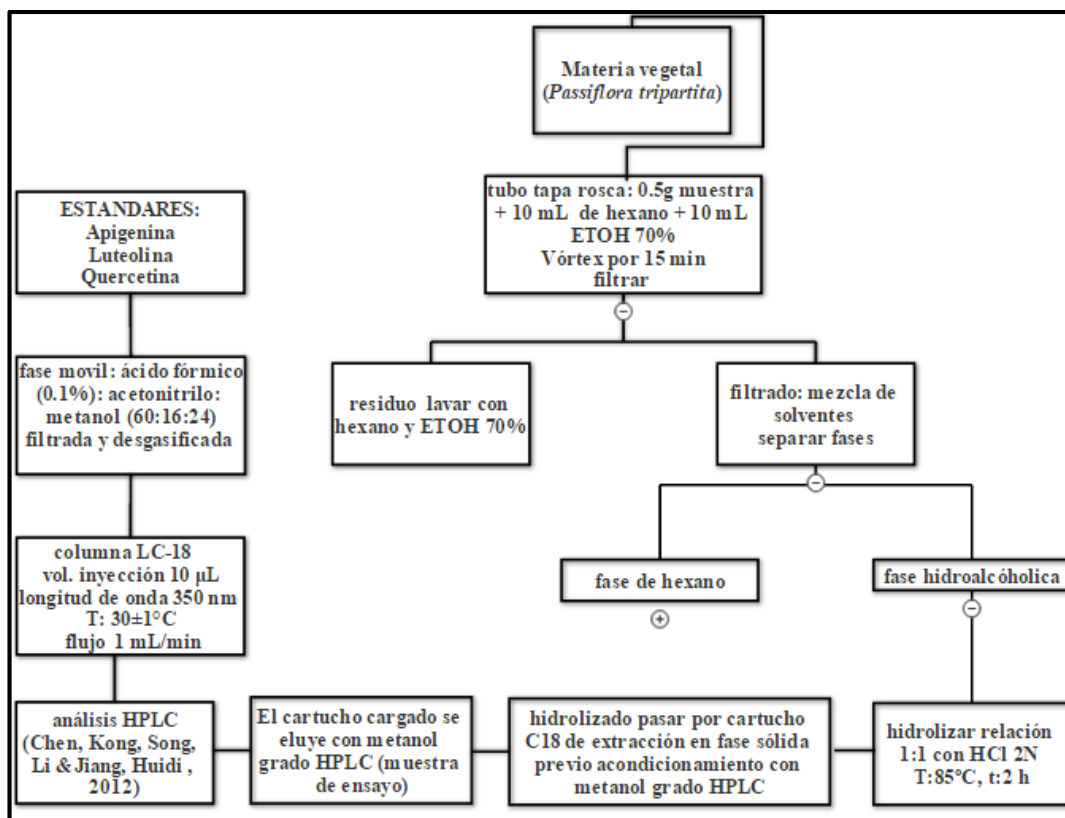
La fase hidroalcohólica contiene en su mayoría glucósidos por lo que se optó por hidrolizarlos para extraer las agliconas e indirectamente determinar si se trata de glucósidos susceptibles de hidrólisis; se dividió la fase hidroalcohólica en la mitad y se añadió HCl 2 N en relación 1:1 v/v, la mezcla se reflujo durante 2 horas con una temperatura no mayor a 85 °C. Una vez frío el hidrolizado se pasó por cartucho C18 para extracción en fase sólida previamente acondicionado con metanol grado HPLC, enseguida se cargó el hidrolizado y se eluyó con metanol grado HPLC cuya muestra se inyectara en Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (Zhang et al., 2007, pp. 484-494) (Alok et al, 2012, pp. 8523-8538).

#### *4.5.6.2. Condiciones y parámetros*

El análisis HPLC se realizó en una columna Supelco LC-18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) con una fase móvil de ácido fórmico (0.1%): acetonitrilo: metanol (60:16:24) v/v/v, a 30±1°C con un flujo de 1 mL/min. El volumen de inyección utilizado es 10 µL, a una longitud de onda de 350 nm para el análisis cuantitativo, la proporción de los componentes de la fase móvil es tomada del estudio realizado por Chen, Kong, Song, Li & Jiang, Huidi en el año 2012. Los reactivos empleados, tanto ácido fórmico y metanol tienen grado ACS, mientras el reactivo acetonitrilo fue grado HPLC (Chen et al., 2012, pp. 1616-1622).

#### *4.5.6.3. Preparación de las soluciones de trabajo*

Las soluciones patrón de estándares externos de apigenina, luteolina (aproximadamente 0.5 mg/mL) y quercetina (aproximadamente 1 mg/mL) son preparadas disolviendo las cantidades pertinentes de las referencias en metanol, respectivamente. A partir de la solución madre se elabora soluciones patrón de 5 µg/mL para apigenina y luteolina y de 10 µg/mL para el estándar interno, quercetina. Para la curva las concentraciones realizadas van de 0.1 a 10 µg/mL.



**Figura 11.-** Cuantificación de extractos hidrolizados por HPLC

Realizado por: Monserrath Lema, 2016

#### 4.5.7. Determinación de la capacidad captadora de radicales libres mediante método de DPPH

##### 4.5.7.1. Preparación de la muestra

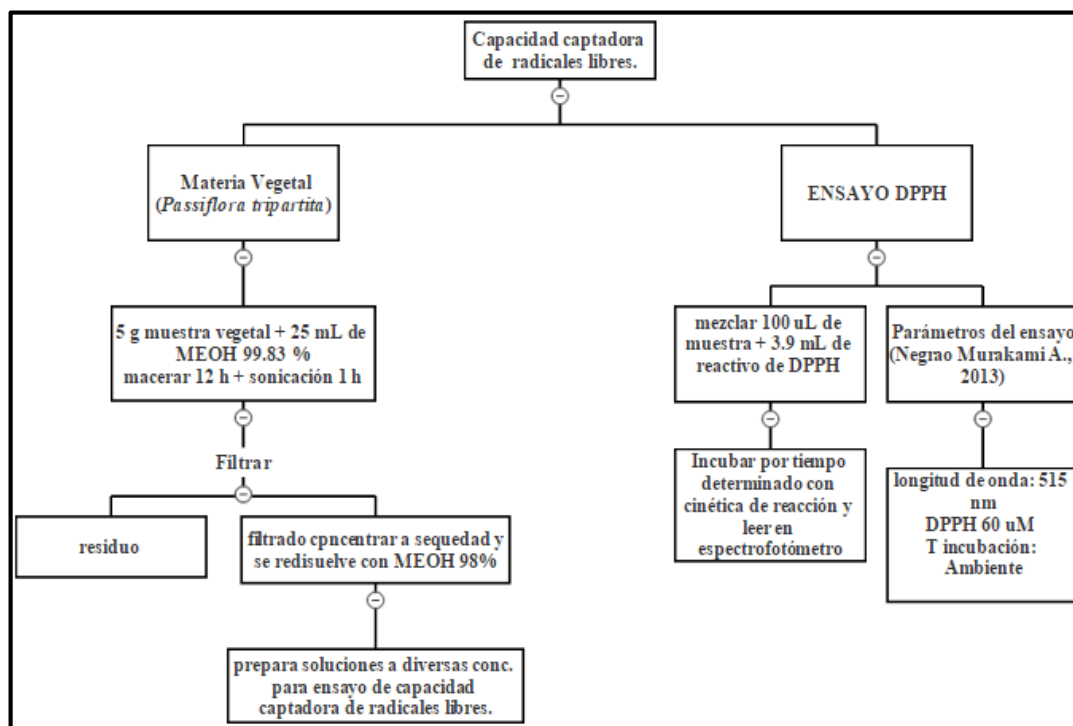
Para la realización de la muestra utilizada para el ensayo se maceró con metanol al 99.83% y durante 12 horas la droga vegetal en proporción 5:1 v/w respectivamente, seguido de sonicación por 1 hora. Se filtró y el filtrado se concentró a sequedad en rotavapor hasta sequedad el mismo que se redisolvió con metanol 99.85% con lo que se preparó soluciones de diferentes concentraciones desde 100 hasta 5000 ppm para las muestras estudiadas y de 10 a 80 para el estándar de ácido gálico (Medini et al., 2014, pp. 216-224) (Mishra et al., 2011, Pp. 1036-1043).

Alícuotas de 100 µl de diversas concentraciones de extractos en metanol se mezclaron con 3.9 ml de solución metanólica de DPPH 60 µM, lo cual después de un período de incubación de 60 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad, se lee la absorbancia con el control a 515 nm. La inhibición (IC<sub>50</sub>) del radical libre DPPH (IC<sub>50</sub>%) se calcula en porcentaje: (Williams et al., 1995, pp. 25-30) (Murakami et al., 2013, pp. 60-65)

$$IC50\% = [(A_{blanco} - A_{muestra}) / A_{blanco}] \cdot 100,$$

Dónde: **Ablanco**: es la absorbancia de la reacción de control (que contiene todos los reactivos excepto el extracto de ensayo), **Amuestra**: es la absorbancia del extracto de prueba.

La concentración del extracto de ensayo proporciona una inhibición del 50% (IC50, expresada en mg / ml) se calcula a partir de la gráfica trazada entre porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto. El reactivo antioxidante de ácido gálico se utilizó como control positivo, mientras que el blanco para encerrar el espectro consistió únicamente en metanol 99.83% y el blanco para calcular el IC50 contiene todos los reactivos excepto el extracto de ensayo; todas las pruebas se llevan a cabo por triplicado. (Gribés et al., 2013).



**Figura 12.-** Esquema de evaluación de capacidad de captación de radicales libres. DPPH  
Realizado por: Monserrath Lema, 2016

## CAPITULO III

### 3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS HIPOTESIS Y OBJETIVOS.

Realizados los diferentes ensayos cualitativos y cuantitativos en extractos de flores y hojas de *Passiflora tripartita*, se obtuvieron los siguientes resultados.

#### 3.1. Parámetros de control de calidad

Se realizó las especificaciones nombradas en el texto de MIRANDA M., 2006; para determinar la calidad de la materia vegetal seca previo a su utilización en las diversos ensayos fitoquímico cualitativos y cuantitativos, a fin de que la droga vegetal a utilizarse garantice eficacia e inocuidad, del mismo modo hay que tener presente que las plantas sirven como materia prima para la obtención de fitomedicamentos a través de la realización de extractos para identificar principios activos y separarlos, por lo que este primer punto de análisis adquiere gran importancia. Es así que los resultados del control de calidad se compararon con lo especificado según la norma ecuatoriana de Fitoterápicos y la OMS 1998, los resultados se muestran en muestran en la Tabla 3.

**Humedad:** indica la cantidad de agua residual que una muestra contiene después de haberla sometido a desecación, un exceso de agua en la muestra seca puede provocar crecimiento microbiano lo que a su vez ocasionaría la pérdida de los principios activos por deterioro, es así que la farmacopea indica un rango de 5-13% de humedad para garantizar que la droga vegetal sea óptima (71) y el resultado obtenido fue de  $8.74 \pm 0.044\%$  para hojas y  $8.54 \pm 0.025\%$  para flores, valores que se encuentran en las condiciones especificadas. Los resultados de humedad obtenidos fueron indicativos que el proceso de secado y almacenamiento de las hojas y flores de *Passiflora tripartita* respectivamente fue correcto; además el secado fue realizado de manera artificial y no natural ya que en el estudio realizado por Muñoz y Sarmiento concluyeron que el secado artificial permite un mayor rendimiento en la concentración de principios activos (a través de la cuantificación de flavonoides y cumarinas,) y que gran parte de la humedad de la planta es eliminada (Muñoz et al., 2010) (OMS, 2007).

**Cenizas totales:** este ensayo nos muestra una idea de la cantidad total de material que queda después de la incineración y calcinación de la droga vegetal, es decir la suma de material inorgánico, lo cual incluye tanto la ceniza "fisiológica", resultado del tejido de la planta y la

ceniza "no fisiológico", que es el residuo de la materias extrañas o impurezas presentes en la muestra de ensayo tal como arena y tierra, que por lo general se liga a la superficie de la planta al ser transportada por el viento; esto a su vez indica una inadecuada limpieza de la materia vegetal. Los resultados de ceniza para hojas y flores de *Passiflora tripartita* fueron  $6.88 \pm 0.036\%$  y  $6.53 \pm 0.038\%$  respectivamente, valores que se encuentran dentro de lo indicado por la norma ecuatoriana de Fitoterápicos y la OMS 1998 de hasta 12%, además cumple con lo estipulado por la AEMPS con un valor de como máximo 8% (PH. EUR.) (WHO, 2007).

**Cenizas insolubles en ácido:** este ensayo mide la cantidad de sílice presente, sobre todo en la arena y la tierra silíceas mientras que cenizas soluble en agua es la diferencia en peso entre el total de cenizas y el residuo después del tratamiento de las cenizas totales con agua, los resultados obtenidos fueron para: cenizas solubles en agua  $4.36 \pm 0.031\%$  para hojas y  $5.42 \pm 0.030\%$  para flores siendo el límite hasta 7%, mientras que para cenizas insolubles en ácido clorhídrico  $3.39 \pm 0.025\%$  para hojas y  $4.21 \pm 0.035\%$  para flores siendo el límite 5%; las muestras en ambos casos se encuentran dentro de lo establecido (WHO, 2007) (AGENCY EUROPEAN MEDICINES, 2011).

El control de calidad nos da seguridad y garantiza inocuidad de la materia vegetal seca y con estas pruebas hojas y flores de *Passiflora tripartita* se establecen como materia prima óptimas.

**Tabla 3.-**Control de calidad de hojas y flores secas de *Passiflora tripartita*.

Parámetro	Hojas de <i>P. tripartita</i>	Flores de <i>P. tripartita</i>	Especificaciones USP # 28-(NEPT)
Contenido de Humedad (%)	$8.74 \pm 0.044\%$	$8.54 \pm 0.025\%$	8-14%
Contenido de Cenizas Totales (%)	$6.88 \pm 0.036\%$	$6.53 \pm 0.038\%$	Hasta 12%
Contenido de Cenizas Solubles en Agua (%)	$4.36 \pm 0.031\%$	$5.42 \pm 0.030\%$	Hasta 7%
Contenido de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico	$3.39 \pm 0.025\%$	$4.21 \pm 0.035\%$	Hasta 5%

Realizado por: Monserrath Lema, 2016

### 3.2. Sólidos totales de hojas y flores

Los sólidos totales permiten apreciar la cantidad de materia orgánicos y sales que se encuentran disueltos en un determinado solvente, al mismo tiempo nos da una idea de la capacidad extractiva de estos, en razón del tipo de compuestos que se desee separar de la droga vegetal, es así que se usó solventes como: éter, etanol, agua destilada, metanol y acetato de etilo obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 4 y representados gráficamente en el



anexo A, en la cual se puede apreciar que el uso de los diferentes solventes genera resultados variables tanto en porcentaje de extracción como en sólidos totales, esto posiblemente se debe a la volatilidad de algunos de ellos como es el caso del éter que es un solvente sumamente etéreo por lo que genera menor porcentaje de extracción, al mismo tiempo se observa que el solvente que presenta menor concentración tanto en flores como hojas es el acetato, esto se atribuye al tipo de compuestos que posee la planta, ya que de acuerdo a bibliografía *Passiflora tripartita* posee en su mayoría compuestos glicosilados y acetato de etilo extrae compuestos tipo agliconas, por lo mencionado lo que se necesita es un solvente de mediana o baja polaridad, y observando los resultados el solvente que mejores resultados generaría es el alcohol o una mezcla hidroalcohólica, lo que se verifica ya que metanol presenta mayor % de extracción y concentración que algunos de los solventes probados, este resultado solo se iguala y es superado por el agua pero con este se corre riesgo de daño y contaminación microbiana, por lo que el solvente de elección tanto para hojas como para flores será el metanol, seguido de etanol o alguna mezcla hidroalcohólica.

**Tabla 4.-** Sólidos totales concentraciones de los extractos de hojas de *P. tripartita*

Extractos	Hojas <i>Passiflora tripartita</i>			Flores <i>Passiflora tripartita</i>		
	Concentración	% de extracción	mg/mL	Concentración	% de extracción	mg/mL
<b>Etéreo</b>	0.0125±0.002	35%	12.53 mg/mL	0.0023±0.001	60%	2.27 mg/mL
<b>Alcohólico</b>	0.014±0.002	64%	13.95 mg/mL	0.0195±0.000	74%	19.45 mg/mL
<b>Acuoso</b>	0.020±0.002	69%	19.97 mg/mL	0.0284±0.001	72%	28.40 mg/mL
<b>Metanólico 98%</b>	0.018± 0.002	70%	19.9 mg/mL	0.025±0.0	70%	25.6 mg/mL
<b>Acet. De etilo</b>	0.009±0.002	62%	4.8 mg/mL	0.003±0.01	80%	2.5 mg/mL

Realizado por: Monserrath Lema, 2016

### 3.3. Tamizaje Fitoquímico

Se desarrolló el tamizaje fitoquímico de acuerdo a lo estipulado por MIRANDA, M. en el texto Farmacognosia y productos naturales, con la finalidad de determinar metabolitos secundarios en hojas y flores de *Passiflora tripartita*, es así, que los extractos estudiados mostraron los siguientes resultados.

**Tabla 5.-** Tamizaje Fitoquímico de extractos de hojas y flores de *Passiflora tripartita*

Ensayo	Metabolito	Hojas			Flores		
		<i>P. Tripartita</i>			<i>P. Tripartita</i>		
		etéreo	alcohólico	acuoso	etéreo	alcohólico	Acuoso
<b>Sudán</b>	Aceites y grasas	++			+		
<b>Dragendorff</b>	Alcaloides	-	+	+	-	-	+
<b>Mayer</b>	Alcaloides	-	-	+	-	-	+
<b>Wagner</b>	Alcaloides	-	-	+	-	+	+
<b>Baljet</b>	Lactonas y Cumarinas	+	++		+++	++	
<b>Liebermann-Buchard</b>	Triterpenos y/o esteroides	++	++		++	++	
<b>Catequinas</b>	Catequinas		+			+	
<b>Resinas</b>	Resinas		-			-	
<b>Fehling</b>	Azúcares reductores		+	+		+	+
<b>Espuma</b>	Saponinas		-	+	-	-	+
<b>Cl<sub>3</sub>Fe</b>	Taninos		+++ Coloración verde intensa	+++ Coloración verde intensa		++ Coloración azul	++ Coloración azul
<b>Boritrager</b>	Quinonas		-			-	
<b>Shinoda</b>	Flavonoides		+++ Coloración roja	++ Coloración amarilla		+++ Coloración roja	+++ Coloración amarilla
<b>Antocianidina</b>	Flavonoides		+			++	
<b>Mucilagos</b>	Mucilagos			-			-
<b>Principios Amargos</b>	Principios amargos			+			+

Realizado por: Monserrath Lema, 2016

**Dónde:** (+) opalescencia, (++) turbidez definida), (+++) precipitado

La prueba de Sudán III detecta la presencia de lípidos en una muestra, al ser soluble en las grasas, sustancias de este tipo se tiñen, en el extracto etéreo de hojas y flores de *Passiflora tripartita* el resultado fue positivo al colorearse de rojo la muestra analizada; existen estudios de especies de *Passiflora* que presentan compuestos lipídicos como lo menciona Pruthi JS. 1962, que contiene una gran cantidad de ácidos grasos insaturados, tales como ácido oleico y ácido linoleico, así como también especies como *P. incarnata* y *P. edulis* contienen ácido linoleico y linolénico (Malacrida et al, 2012, pp. 127-134), aunque para *Passiflora tripartita* no existen artículos científicos con los que se asegure la presencia de ácidos grasos en esta especie.

El resultado para las pruebas de Dragendorff, Mayer y Wagner fueron negativas en los extractos etéreo de hojas y flores de *Passiflora tripartita*, mientras que para los extractos alcohólico y acuoso, las pruebas fueron positivas indicando la presencia de alcaloides, lo que concuerda con bibliografía ya que varias especies del genero *Passiflora* reportan la presencia de alcaloides como *P. incarnata* que contiene alcaloides tipo indol como: harmano y harmina (Bennati, 1971, pp. 664-669), Lutomski, J., 1975, verifico la presencia de alcaloides como:

harmano, harmina, harmalina y harmalol en *P. edulis* con mayor concentración en hojas (Lutomski et al., 1975, pp. 381-386). La presencia de este tipo de metabolitos en los diferentes especies del genero *Passiflora* es variable.

La prueba de Baljet dio positivo en los extractos etéreo y alcohólico de hojas y flores de *Passiflora tripartita*, como menciona Miranda M., 2006, esta prueba permite reconocer compuestos con agrupamiento lactónico (lactonas y cumarinas). Liebermann- Buchard permite reconoce la presencia de terpenos y/o esteroides, dando positivo en los extractos etéreo y alcohólico de hojas y flores de *Passiflora tripartita*. La prueba de Fehling confirmó la presencia de azúcares. Los principales flavonoides presentes en esta especie son glicósidos de la luteolina y apigenina.

La presencia de fenoles se confirmó con la prueba de cloruro férrico en extractos alcohólico y acuoso de hojas y flores de *Passiflora tripartita*, mientras que Dhawam, K. et al, 2004 menciona para *P. edulis* compuestos fenólicos como: 4-Hydroxy- $\beta$ -ionol, 4-oxo- $\beta$ -ionol, 4-hydroxy-7,8-dihydro- $\beta$ -ionol, etc (Dhawan et al., 2004, pp. 1-23).

Shinoda indica la presencia de flavonoides y dio positivo para los extractos alcohólico y acuoso de hojas y flores de *Passiflora tripartita* al igual que antocianidinas dio positivo para extracto alcohólico de hojas y flores. Birk et al., 2005, afirma que flavonoides son los principales metabolitos en especies de *passifloras* (Birk et al., 2005, pp. 2285-2291). Flavonoides son reportados como fitoconstituyentes mayoritarios de *P. incarnata*: apigenina, luteolina, quercetina, y sus flavonoides c-glicosidos (Dhawan et al., 2004, pp. 1-23).

Mientras que Simirgiotis M. et al., 2013 en el artículo la *Passiflora tripartita* (Banana Passion) Fruto: Una fuente de flavonoides bioactivos C-glucósidos aislados por HSCCC y caracterizado por HPLC-DAD-ESI / MS / MS, menciona la detección de dieciocho flavonoides C-glucósidos y cuatro derivados O-glucósido y varios de los C-glicósidos detectados están estructuralmente relacionados con el derivado 4'-orientin-metoxi-luteolina-8-C- (6"-acetilo) - $\beta$ -D-glucopiranosido

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

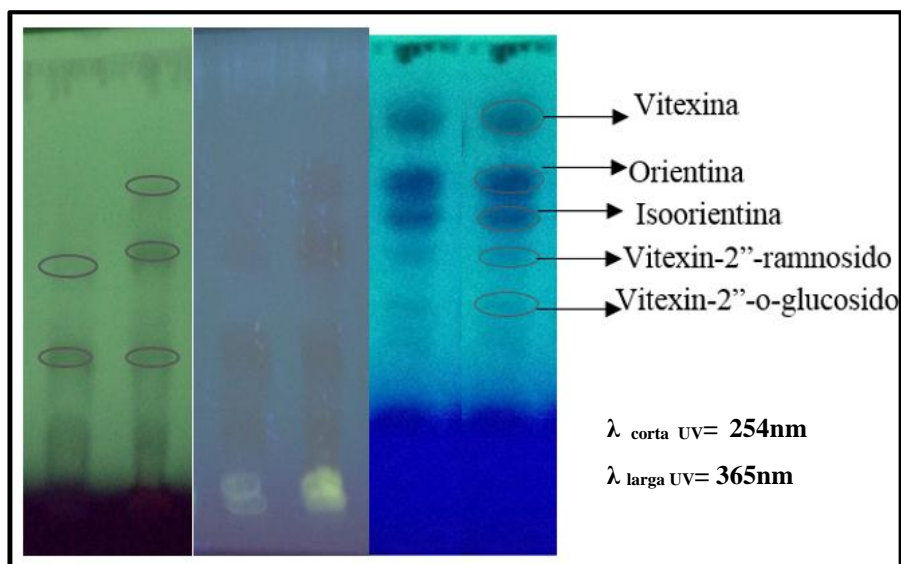
Harbone, 1998 indica que en solventes no polares como es el caso del éter extrae mayoritariamente: ácido grasos, pigmentos fitosteroles y terpenos, lo que verifica que los resultados hayan sido positivos en la fracción etérea del tamizaje.

Mientras que en fracciones acuosas por lo general se encuentran compuestos más polares como saponinas, taninos y flavonoides c-glucósidos como lo indica Reginatto et al., 2001; y Bonifácio et al., 2014.

Alcaloides, fenoles, flavonoides y compuestos cianogénicos, son conocidos en el género *Passiflora*, existe una gran cantidad de estudios realizados para *Passiflora incarnata* y *Passiflora edulis*, mientras que para otras especies como *P. tripartita*, la información es esporádica. Wasicky et al., 2015, menciona que la clase de compuesto predominante en el género *Passiflora* son flavonas de tipo C-glicosil; alcaloides como Harmano, aunque se producen en cantidades de trazas.

### 3.3. Análisis TLC

#### HOJAS Y FLORES NO HIDROLIZADO



**Figura 13.-** Placas cromatográficas de extractos no hidrolizados de flores hojas de *P.tripartita*.

**Realizado por:** Monserrath Lema, 2016

**Adsorbentes:** Sílica gel

**Sistema de solventes:** Acetato de etilo: ác. Acético: ác. Fórmico: agua (100:11:11:26)

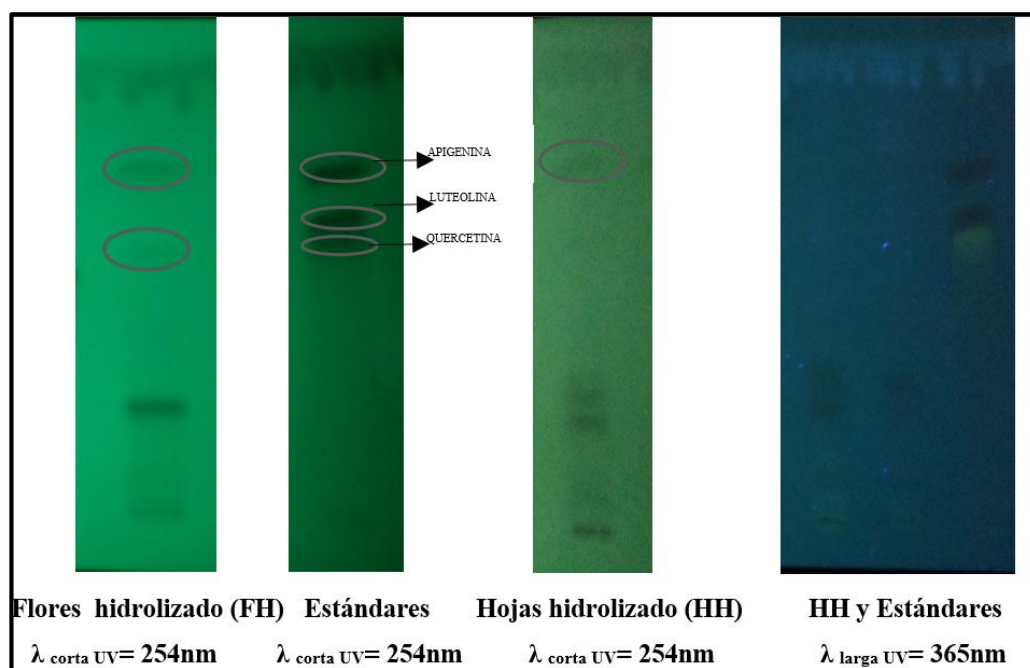
**Revelador:** UV  $\lambda$  larga,  $\lambda$  corta

La constante dieléctrica de la fase móvil fue de 22.59, esta constituye una fase tipo polar, para su preparación se dejó reposar por un periodo de 24 horas hasta que se sature y antes de usarla se retiró la fase acuosa.

Se calculó los valores de Rf indicados de flavonoides en Wagner y se compararon con los Rf calculados con los recorridos obtenidos en la paca sembrada con extracto metanólico no hidrolizado de hojas y flores de *Passiflora tripartita*, los resultados se muestran en la tabla 6; en hojas se obtuvieron Rf que se aproximan a los estándares de: orientina (0.57), isoorientina (0.48), vitexin-2''-O-Glucosido (0.29), vitexin-2''-ramnosido (0.38) y vitexina (0.64), mientras que para flores: orientina (0.55), vitexin-2''-O-Glucosido (0.27) y vitexina (0.63).

Estos datos concuerdan con los flavonoides presentes en *P. incarnata* y *P. edulis* como: flavonoides vitexina C-glicosil, isovitexina, orientina, isoorientina, isovitexin-2-O-glucopiranosido, isoorientina-2-O-gluco-piranosido, etc. (Dhawan et al., 2004, pp. 1-23). Por otra parte Simirgiotis M. et al., 2013, señala a *P. tripartita* como una fuente de flavonoides bioactivos detectando e identificando dieciocho flavonoides C-glucósidos y cuatro derivados O-glucósido.

#### HOJAS Y FLORES HIDROLIZADOS



**Figura 14.-** Placas cromatográficas de estándares y extractos hidrolizados de flores hojas de *P. tripartita*.

Realizado por: Monserrath Lema, 2016

**Adsorbentes:** Sílica gel

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

**Revelador:** UV  $\lambda$  larga  $\lambda$  corta

La constante dieléctrica de la fase móvil fue de 4.77, esta constituye una fase apolar, se hizo correr los extractos hidrolizados de hojas y flores y los Rf obtenidos se compararon con los Rf de los estándares de apigenina, luteolina y quercetina que se prepararon en metanol y/o etanol y se corrieron en la misma fase móvil.

En hojas y flores de *P. tripartita* se obtuvieron Rf que se aproximan a Rf de apigenina con 0.74 y 0.728 respectivamente, mientras que en flores se obtuvo además un Rf de 0.54 el cual se aproxima al estándar de quercetina. Simirgiotis M. et al., 2013, indica que mediante espectroscopia de masas se detectó las agliconas apigenina y luteolina., por otro lado quercetina o su correspondiente glucósido no se mencionan en el estudio.

**Tabla 6.-** Rf de estándares glucósidos, extracto hidrolizado y no hidrolizado de hojas y flores de *Passiflora tripartita*.

Estándares glicósidos		Ext. No hidrolizado Rf		Estándares agliconas		Ext. Hidrolizados Rf	
Comp.	Rf	Hojas	Flores	Comp.	Rf	Hojas	Flores
Orientina	0.57	0.57	0.55	Apigenina	0.72	0.74	0.728
Isoorientina	0.46	0.48		Luteolina	0.63		
Vitexin-2"-O-Glucosido	0.28	0.29	0.27	Quercetina	0.57		0.54
Vitexin-2"-ramnosido	0.37	0.38					
Isovitexin-2-O-ramnosido	0.37						
Isovitexina	0.51						
Vitexina	0.62	0.64	0.63				

Realizado por: Monserrath Lema, 2016

### 3.4. Cuantificación de flavonoides y fenoles

#### 3.4.1. Cuantificación flavonoides

Para la cuantificación de flavonoides se utilizó el método de tricloruro de aluminio, para esto se realizó una curva de calibración del estándar de quercetina la cual se indica en el anexo C, esta tuvo una ecuación de la recta igual a  $y = 0.0012x + 0.0218$ , con  $R^2 = 0.9991$ , las concentraciones de las muestras de flores y hojas de *P. tripartita* en extractos de acetato de etilo 100%, metanol 98% y etanol 70%, se calcularon con la ecuación antes mencionada e interpoladas en la gráfica, es así que con los datos de concentración obtenidas y las diluciones, se calculó el porcentaje de flavonoides totales expresados como quercetina (%FTEQ) y los miligramos de flavonoides totales expresados como quercetina por 1 g de muestra seca (mg FTEQ/g), dichos resultados se muestran en la tabla 7.

El extracto etanólico 70% de hojas y flores de *P. tripartita* muestra mayor %FTEQ que los demás extractos y los mgFTEQ/ g de muestra seca fueron 68,50±4.639 y 12,03±0.833 respectivamente. Mientras que resultados en extracto metanólico también es alto con valores de mgFTEQ/g de muestra seca igual a 55.17±2.204 para hojas y 10.42±0.128 para flores.

En extracto de acetato de etilo los resultados fueron igualmente significativos. Saravanan S., Parimelazhagan T., 2014, mencionan que extracto de acetona de *Passiflora ligularis*, muestra un máximo de flavonoides igual a 387.33 mg Rutina/g de extracto y Simirgiotis, et al., 2013, indican para *P. tripartita* un contenido de flavonoides de 56.03 ± 4.34 mg quercetin/100 g de muestra seca.

**Tabla 7.-** Cuantificación de flavonoides en extractos de hojas y flores de *Passiflora tripartita*, por el método de AIC13

Tipo de extracto	Acetato de etilo 100%		Metanólico 98%		Etanólico 70%	
	Hojas <i>P. tripartita</i>	Flores <i>P. tripartita</i>	Hojas <i>P. tripartita</i>	Flores <i>P. tripartita</i>	Hojas <i>P. tripartita</i>	Flores <i>P. tripartita</i>
% FTEQ	0.62±0.017	0.11±0.004	5.52±0.22	1.04±0.013	6.85±0.464	1.20±0.083
mg de FTEQ/g de muestra seca	6.16±0.173	1.08±0.042	55.17±2.204	10.42±0.128	68.5±4.639	12.03±0.833

Realizado por: Monserrath Lema, 2016

### 3.4.2. Cuantificación fenoles

Para la cuantificación de fenoles se utilizó el método de Folin-Ciocalteu y se manejó como estándar de referencia ácido gálico, del mismo que se realizó soluciones a diferentes concentraciones, para obtener una curva de calibración, la misma que presentó la siguiente ecuación de la recta  $y = 0.0006x + 0.061$ ,  $R^2 = 0.9992$ , la gráfica de la curva y las muestras se exhiben en el anexo D.

Una vez realizados los cálculos necesarios, se obtuvo que en el caso de fenoles también el extracto etanólico 70% muestra una mayor cantidad de fenoles expresados como mg de ácido gálico / por gramos de muestra seca (mgEAG/g) siendo para hojas 672.22±9.623 y para flores 105.56±1.925; los extractos metanólico y de acetato de etilo muestran del mismo modo buenos resultados como se indica en la tabla 8.

Saravanan S., Parimelazhagan T., 2014, mencionan que extracto de acetona de *Passiflora ligularis*, contienen 640.70 mg de compuestos fenólicos expresados como equivalentes de ácido gálico por g de extracto, los mismos indican que *P. mollissima* también contiene cantidad alta de fenoles 635±2.71 mg GAE/100 g de extracto. Mientras que Saravanan, S., et al., 2014, indican que extractos de acetona de hojas de *P. subpeltata* registran fenoles igual a 417.65 mg GAE/g de extracto, resultados bibliográficos que verifican al género *Passiflora* como fuente de compuestos fenólicos y flavonoides.

**Tabla 8.-** Cuantificación de hojas y flores de *Passiflora tripartita*, por el método de Folin-Ciocalteu.

Tipos de extracto	Acetato de etilo 100%		Metanólico 98%		Etanólico 70%	
	Hojas <i>P. tripartita</i>	Flores <i>P. tripartita</i>	Hojas <i>P. tripartita</i>	Flores <i>P. tripartita</i>	Hojas <i>P. tripartita</i>	Flores <i>P. tripartita</i>
% FTE	6.94±0.255	3.53±0.173	19.17±0.833	5.67±0.441	67.22±0.962	10.56±0.925
mg de EAG/g de muestra seca	69.44±2.546	35.28±1.734	191.67±8.33	56.67±4.41	672.22±9.623	105.56±1.925

Realizado por: Monserrath Lema, 2016

### 3.5. Análisis HPLC

Se analizó por HPLC muestras hidrolizadas de hojas y flores de *P. tripartita*, se utilizó como estándares externos apigenina, luteolina y quercetina, para conocer la concentración de los diferentes componentes en la muestra estudiada, se realizó una curva de calibración de cada estándar con concentraciones de 0.1 a 10 ppm, obteniendo para apigenina una ecuación de la recta de  $y = 10.233x + 3.5717$  y  $R^2 = 0.9977$ , luteolina  $y = 27.635x + 3.1617$ ,  $R^2 = 0.9989$  y quercetina  $y = 6.1754x + 2.5719$ ,  $R^2 = 0.9977$ , como se muestra en el anexo E, con las diferentes ecuaciones de la recta y con las áreas bajo la curva obtenidas en el HPLC se calculó la concentración correspondiente a los componentes de las muestras analizadas.

Apigenina y luteolina poseen estructuras similares, por lo tanto requieren de una fase móvil polar para una mejor separación de las agliconas, la fase móvil seleccionada es ácido fórmico: acetonitrilo: metanol (60:16:24) tomada del estudio “Pharmacokinetic study of luteolin, apigenin, chrysoeriol and diosmetin after oral administration of Flos Chrysanthemi extract in rats”, el método fue planteado por Chen Z. , Kong, Song, Li, & Jiang, 2012.

Las concentraciones de los estándares antes mencionados en las muestras de estudio fueron mínimos es así que en hojas se tuvo 0.18±0.052 ppm de apigenina, 0.08±0.015 ppm de luteolina



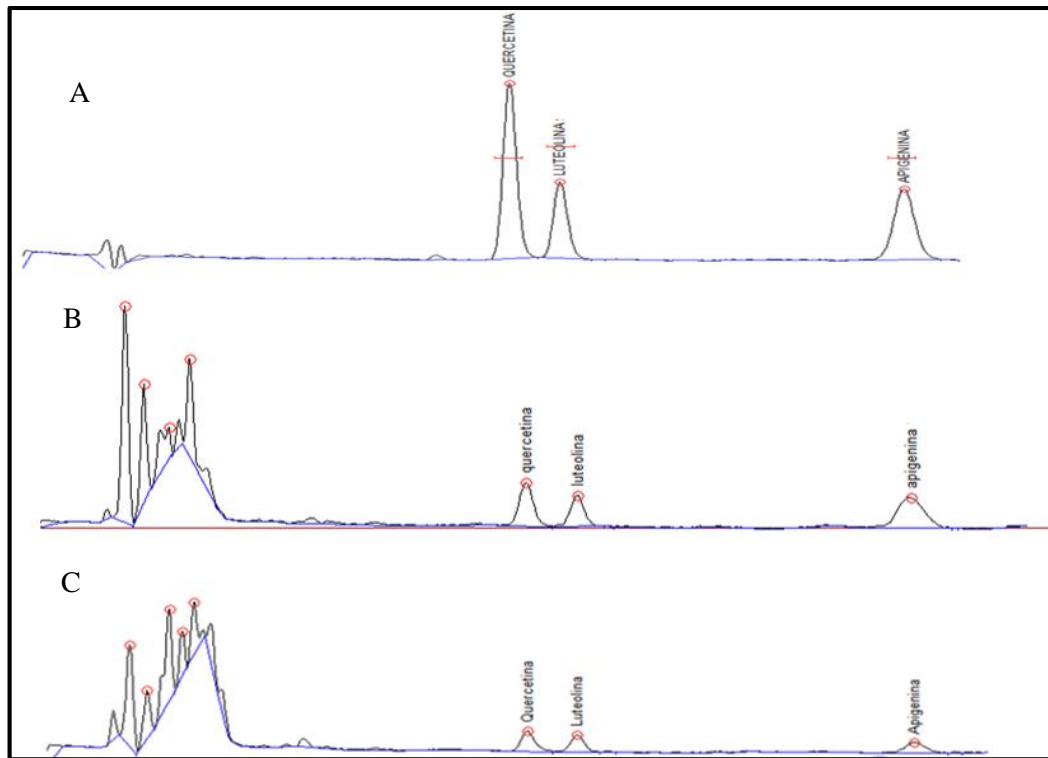
y  $0.61 \pm 0.096$  ppm de quercetina y en flores  $1.09 \pm 0.086$  ppm de apigenina,  $0.18 \pm 0.025$  ppm de luteolina y  $1.43 \pm 0.058$  ppm de quercetina.

Tanto en hojas como en flores el componente mayoritario fue quercetina, seguido por apigenina y luteolina, además se presenta más concentración en flores que en hojas, lo antes mencionado comparado con los resultados de flavonoides y fenoles que fueron altos y mayoritarios en hojas que en flores, nos llevan a presumir que los compuestos que se encuentran en hojas son flavonoides de tipo c-glucósido, lo que conlleva que estos no sufran hidrólisis solo reordenamiento de Wessely-Moser (Larget et al., 2000, pp. 835-838) y que solo aquellos de tipo O-glucósidos sean los que si sufrieron este proceso y corresponde a la concentración obtenida por HPLC, esto lo podemos verificar por lo propuesto por Simirgiotis M. et al., 2013, ya que señala a *P. tripartita* como una fuente de flavonoides bioactivos detectando e identificando dieciocho flavonoides C-glucósidos y cuatro derivados O-glucósido.

**Tabla 9.-** Cuantificación de hojas y flores de *Passiflora tripartita*, por HPLC

	<b>Hojas <i>Passiflora tripartita</i></b>			<b>Flores <i>Passiflora tripartita</i></b>		
	<b>Conc. (ppm)</b>	<b>mg/100g</b>	<b>Abc</b>	<b>Conc. (ppm)</b>	<b>mg/100g</b>	<b>Abc</b>
<b>Apigenin a</b>	$0.18 \pm 0.052$	$0.52.17 \pm 0.0863 \pm 0.052$	$5.374 \pm 0.529$	$1.09 \pm 0.086$	<b><math>2.17 \pm 0.086</math></b>	$14.68 \pm 0.876$
<b>Luteolina</b>	$0.08 \pm 0.015$	$0.24 \pm 0.015$	$5.34 \pm 0.413$	$0.18 \pm 0.025$	$0.36 \pm 0.025$	$8.11 \pm 0.684$
<b>Quercetin a</b>	$0.61 \pm 0.096$	$1.83 \pm 0.096$	$6.34 \pm 0.591$	$1.43 \pm 0.058$	$2.85 \pm 0.058$	$11.375 \pm 0.437$

Realizado por: Monserrath Lema, 2016



**Figura 15.-** Cromatogramas HPLC (A) mezcla de estándares de apigenina (5ug/mL), luteolina (5ug/mL) y quercetina (10ug/mL), (B) muestra metanólica hidrolizada de flores, (C) muestra metanólica hidrolizada de hojas.

Elaborado por: Monserrath Lema, 2016

### 3.6. Determinación de la capacidad captadora de radicales libres mediante método de DPPH

**Tabla 10.-** Determinación de la capacidad captadora de radicales libres mediante método de DPPH.

	Hojas <i>Passiflora tripartita</i>	Flores <i>Passiflora tripartita</i>	Ácido gálico
IC50 (ug/mL)	408.5±4.923	735.7±6.113	43.79±0.157

Elaborado por: Monserrath Lema, 2016

La actividad antioxidante se expresa como porcentaje de inhibición lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración, sin embargo los resultados obtenidos por este método se reportan como IC50 que es la concentración inhibitoria media, es decir, la concentración de compuestos antioxidantes que es capaz de inhibir el 50 % del radical DPPH. Para la determinación de la capacidad captadora de radicales libres se prepararon extractos metanólicos de hojas y flores de *P. tripartita*, en los cuales se determinó la cinética de reacción y la linealidad de las mediciones, y con esto obtuvo

las curvas de concentración versus porcentaje de inhibición de las muestras analizadas y del estándar ácido gálico (anexo G), en las cuales se calculó su respectivo IC50. El ensayo DPPH también indicó que el potencial antioxidante de *P. tripartita* no es muy alta, ya que los extractos de hojas y flores consideradas con una prometedora actividad en este ensayo presentaron valores de  $408.5 \pm 4.923$  para hojas y  $735.7 \pm 6.113$  para flores, mientras que para el ácido gálico fue  $43.79 \pm 0.157$ . La cinética de reacción de hojas y flores fue de una hora.

Con los resultados obtenidos en fenoles y flavonoides se esperaba un IC50 bajo que reflejara una actividad antioxidante alta comparada con el IC50 del ácido gálico, pero los resultados no fueron significativos, aunque si presentaron coherencia ya que flores posee una actividad antioxidante menor que hojas dato que se sospechaba por los resultados de cuantificación en espectrofotómetro, ya que de acuerdo a bibliografía los fenoles junto con flavonoides constituyen principales grupos que actúan como antioxidante, y mientras mayores son las cantidades de fenoles totales y flavonoides la capacidad de captación de radicales es mejor. (Saravanan et al., 2014, pp. 56-64) (Saravanan et al., 2014, pp. 272-280)

El contenido de fenoles en las plantas tiene relación con la actividad antioxidante de los extractos, por lo general una planta con mayor contenido de compuestos fenólicos presenta una mayor actividad antioxidante, sin embargo se puede observar que algunas plantas presentan una actividad antioxidante superior a lo esperado o por el contrario, una baja actividad que no se relaciona con el contenido de compuestos fenólicos. Esto es indicativo de que la capacidad antioxidante de una planta se debe al efecto combinado de diversos factores, como puede ser la presencia de otro tipo de metabolitos antioxidantes, o bien, una actividad pro-oxidativa que se contrapone al potencial antioxidante. (Saravanan et al., 2014, pp. 56-64).

*P. tripartita* comparada con *P. ligularis* (IC50  $19.13 \mu\text{g/mL}$ ), exhibe una no muy buena actividad antioxidante y comparada con bibliografía *P. tripartita* en el estudio presentado por Simirgiotis M. et al., 2013, la pulpa del fruto de esta especie muestra buena capacidad antioxidante  $12.89 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ . *P. alata* presenta un IC50 de  $18.3 \pm 0.9 \text{ g/ml}$  mientras que literatura indica para *P. alata* un IC50 que varía de 290 to 1000 g/ml (Wasicky et al., 2015, pp. 407-412).

## CONCLUSIONES

Las hojas y flores de *Passiflora tripartita* cumplieron con los parámetros de control de calidad y en el tamizaje fitoquímico se determinó la presencia de flavonoides, alcaloides, terpenos, taninos, cumarinas, azúcares reductores y compuestos fenólicos, tanto en hojas como flores.

La cromatografía en capa delgada determinó la presencia de componentes tipo flavónico en los extractos de hojas y flores de *Passiflora tripartita*, es así que en extractos no hidrolizados de flores se encontró presumiblemente orientina, vitexin-2''-O-glucosido y vitexina, en hojas posiblemente orientina, isoorientina, vitexin-2''-O-glucosido, vitexin-2''-ramnosido y vitexina; mientras que en extractos hidrolizados se obtuvo Rf correspondientes posiblemente a apigenina en hojas; y en flores apigenina y quercetina.

Mediante espectrofotometría, se realizó la cuantificación del contenido de fenoles totales y flavonoides en hojas y flores de *P. tripartita*, siendo estos mayores en extractos etanólicos de hojas y flores ( $6.85 \pm 0.464$  y  $1.20 \pm 0.083$  g FTEQ/100g -  $67.22 \pm 0.962$  y  $10.56 \pm 0.925$  gEAG/100g). De acuerdo a HPLC el compuesto mayoritario en extractos hidrolizados hojas y flores fue quercetina con  $1.83 \pm 0.096$  y  $2.85 \pm 0.058$  mg/100g respectivamente.

De acuerdo a los resultados de la cuantificación de flavonoides y fenoles se esperaba que los extractos presenten buena capacidad antioxidante pero los IC<sub>50</sub> obtenidos fueron  $408.5 \pm 4.923$  ug/mL para hojas y  $735.7 \pm 6.113$  ug/mL para flores, la capacidad antioxidante fue mejor en hojas y ambos extractos no presentan valores significativos al compararlos con IC<sub>50</sub> de ácido gálico  $43.79 \pm 0.157$  ug/mL.

## RECOMENDACIONES

Para la cuantificación por espectrofotometría es recomendable, tratar de ser precisos en el pipeteo y adición de reactivos en tiempo determinado, así como también trabajar en ambientes oscuros, porque estos métodos son muy sensibles.

Se recomienda continuar con el estudio de la evaluación de las actividades biológicas que se le atribuyen al género de *Passiflora* tanto de tipo in vivo e in vitro.

Es aconsejable realizar un estudio más exhaustivo sobre los constituyentes flavónicos presentes en hojas y flores de *P. tripartita*, para determinar que compuestos son causantes de la actividad biológica.

## **GLOSARIO**

**FITOFARMACO:** son medicamentos que contienen como principio activo exclusivamente plantas, partes de plantas, ingredientes vegetales o bien, preparaciones obtenidas a partir de ellas.

**ANSIEDAD:** Estado mental que se caracteriza por una gran inquietud, una intensa excitación y una extrema inseguridad.

**DEPRESIÓN:** Enfermedad o trastorno mental que se caracteriza por una profunda tristeza, decaimiento anímico, baja autoestima, pérdida de interés por todo y disminución de las funciones psíquicas.

**TRASTORNO:** Alteración en el funcionamiento de un organismo o de una parte de él o en el equilibrio psíquico o mental de una persona

**COMPULSIVO:** Que responde a un impulso o deseo intenso de hacer algo.

**GLOBOCAN:** proyecto es proporcionar estimaciones contemporáneas de la incidencia de la mortalidad y la prevalencia de los principales tipos de cáncer, a nivel nacional, para 184 países del mundo.

**PS:** Organización Panamericana de la Salud

## BIBLIOGRAFIA

1. **AGENCY EUROPEAN MEDICINES.** *Guideline on specifications: test procedures and acceptance criteria for herbal substances preparations herbal medicinal products* [en línea]. 11 marzo 2011. [Consulta: 20 enero 2016]. Disponible en: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/09/WC500113210.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/09/WC500113210.pdf).
2. **ALOK K. VERMA, RAM PRATAP.** Chemistry of biologically important flavones. *Tetrahedron* [en línea], 2012, (India) 68(41), pp. 8523-8538, 14 de octubre de 2011, Tetrahedron report number 986, Vol. 68, pp. 8523–8538. [Consulta: 24 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040402012010290>
3. **BENNATI, E.** Quantitative determination of harman and harmine in *P. incarnata* extract. *Bollettino Chimico Farmaceutico* [en línea], 1971, Vol. 110, pp. 664-669.
4. **BIRK, D.; PROVENSÍ, G.; GOSMANN, G.; et al.** TLC Fingerprint of Flavonoids and Saponins from *Passiflora* Species. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* [en línea], 2005, (Brazil) 28(14), pp. 2285-2291. . [Consulta: 26 diciembre 2015]. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/JLC-200064212>
5. **BLASCO, RUBÉN.** *Tratamiento ansiedad depresión* [en línea]. 18 noviembre 2015. [Consulta: 19 de 02 de 2016]. Disponible en: <http://tratamiento-ansiedad-depresion.com/blog/tratamientos/como-funcionan-los-ansioliticos/>.
6. **BONE, K.; MILLS, S.** Principles and Practice of Phytotherapy. En: *Modern Herbal Medicine* [en línea]. Churchill Livingstone, 2013, pp. 17-82. [Consulta: 4 diciembre 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780443069925000025>
7. **BONIFÁCIO, BV.; SILVA, PB.; RAMOS, MA.; et al.** Nanotechnology-baesd drug delivery systems and herbal medicines: a review. *Int J Nanomedicine* [en línea], 2014, (Brazil) 9, pp. 1-15. [Consulta: 26 diciembre 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24363556>

8. **BOUKHRIS, M.; SIMMONDS, MS.; SAYADI, S.; et al.** Chemical composition and biological activities of polar extracts and essential oil of rose-scented *geranium*, *Pelargonium graveolens*. *Phytother Res* [en línea], 2012, (Tunisie) 27(8), pp. 1206-1213.[Consulta: 23 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23027699>
9. **CARDOSO, FREDDY.** *Centro de homeopatía y medicinas alternativas* [en línea]. Quito. [Consulta: 17 de 08 de 2015]. Disponible en: <http://www.medicinaalternativa.ec/tipos-medicina-alternativa.html>.
10. **CARTAYA, O.; REYNALDO, I.** Flavonoides: Características Químicas y Aplicaciones. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (redalyc.org)* [en línea]. (La Habana, Cuba): 2001, 22(2), pp. 5-14. [Consulta: 17 septiembre 2015 ]. ISSN 0258-5936. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1932/193215009001.pdf>
11. **CHEN, Z.; KONG, S.; SONG, F.; LI, L.; JIANG, H.** Pharmacokinetic study of luteolin, apigenin, chrysoeriol and diosmetin after oral administration of *Flos Chrysanthemi* extract in rats. *Fitoterapia* [en línea], 2012, (China) 83(8), pp. 1616-1622. [Consulta: 24 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22999990>
12. **COLLEGI DE FARMACÉUTICS DE BARCELONA.** *Medicamento*. [en línea]. Barcelona: Girona. [Consulta: 17 de 08 de 2015]. Disponible en: <http://www.farmaceuticonline.com/es/el-medicamento/630-medicamento-ique-es?start=3>
13. **CUEVA, PATRICIA.** *El cáncer en el Ecuador* [en línea]. Ecuador: Salud Total, 16 abril 2015. [Consulta: 16 septiembre 2015]. Disponible en: <https://www.saludsa.com/vivesaludtotal/index.php/cancer/el-cancer-en-el-ecuador/423-el-cancer-en-el-ecuador>
14. **DENGA, J.; ZHOUA, Y.; BAIA, M.; LI, H.; LI, L.** Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* var. *carpa*. *Journal Ethnopharmacol* [en línea]. 2010, (China) 128(1), pp.148-153. [Consulta: 25 septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20051259>
15. **DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A.** Passiflora: a review update. *Journal ethnopharmacol* [en línea], 2004, (India) 94(1), pp. 1-23. [Consulta: 26 diciembre 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15261959>



16. **ESTRADA, R.; UBALDO, D.; ARAUJO, A.** Flavonoids and Central Nervous System. *Salud Mental* [en línea], 2012, (Mexico) 35(5), pp. 375-384. [Consulta:16 septiembre 2015]. ISSN 0185-3325. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33252012000500004](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33252012000500004)
17. **EVICANCER.** *Medicina convencional* [en línea]. Colombia: 2012. [Consulta: 24 julio 2015]. Disponible en: <http://www.evicancer.com/evicancer/index.php/consejos/med-convencional/142-medicina-convencional>
18. **FARMACOPEA EUROPEA (PH. EUR.).** *Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios* [en línea]. [Consulta: 20 enero 2016]. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/buscador/iniciar.do>.
19. **FERNÁNDEZ, FRANCISCO J.** *Ansiedad* [en línea]. Unidad Editorial Revistas, S.L.U. DMedicina, junio 2015. [Consulta: 21 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.dmedicina.com/enfermedades/psiquiatricas/ansiedad.html>
20. **FRANCÓFONOS HIT-PARADE.** *Passiflora tripartita*. Grenadine banane ou Tété bœuf. Liane et fruit de La Réunion Famille *Passifloraceae* - *Passifloracées* [en línea]. Sitios Web francófonos Hit-Parade, Webmaster, . [Consulta: 19 de Febrero de 2016]. Disponible en: [http://www.mi-aime-a-ou.com/passiflora\\_tripartita.php](http://www.mi-aime-a-ou.com/passiflora_tripartita.php).
21. **GARDEN, DAVE'S.** *Banana Passion Flower, Banana Poke* [en línea]. 12 abril 2010. [Consulta: 17 de 08 de 2015]. Disponible en: <http://davesgarden.com/guides/pf/go/1561/#b>.
22. **GAVIN, MARY L. MD.** *Medicina Complementaria y alternativa* [en línea]. USA: Teens Health from Nemours Foundation: mayo 2013. [Consulta: 24 julio 2015]. Disponible en: [http://kidshealth.org/teen/en\\_espanol/seguridad/alternative\\_medicine\\_esp.html#](http://kidshealth.org/teen/en_espanol/seguridad/alternative_medicine_esp.html#)
23. **GIRBÉS, P.; JIMÉNEZ T.** *METODO DEL RADICAL DPPH. 1,1-DIFENIL -2-PICRYLHYDRAZYL.* [En línea]. 2013. [Consulta: 26 agosto 2015]. Disponible en: [https://alojamientos.uva.es/guia\\_docente/uploads/2012/470/45808/1/Documento14.pdf](https://alojamientos.uva.es/guia_docente/uploads/2012/470/45808/1/Documento14.pdf).

24. **GOLDBERG, JOSEPH.** *Anxiety Disorders* [en línea]. 08 febrero 2014. [Consulta: 17 de 08 de 2015.] <http://www.webmd.com/anxiety-panic/guide/mental-health-anxiety-disorders?page=3.33>.
25. **GRACIA, M.** *Cuantificación de Fenoles y Flavonoides Totales en Extractos Naturales* [en línea]. (Querétaro), 2007. [Consulta: 23 agosto 2015]. Disponible en: [http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56\\_1UAQGarciaNava.pdf](http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava.pdf).
26. **GROHOL, JOHN M. PSY.D.** *Anxiety: An Introduction to Anxiety Disorders* [en línea]. 19 agosto 2015. [Consulta: 21 agosto 2015]. Disponible en: <http://psychcentral.com/disorders/anxiety/>. 34.
27. **GROTEWOLD, ERICH.** *The Science of Flavonoids.* Springer [en línea]. 2006. (Columbus, Ohio), pp. 1-274.[Consulta: 17 septiembre 2015 ]. ISSN 978-0387-28821-5. Disponible en : <http://rushim.ru/books/mechanizms/the-science-of-flavonoids.pdf>
28. **GRUNDMANN, O.; WANG, J.; MCGREGOR, GP.; et al.** Anxiolytic activity of a phytochemically characterized *Passiflora incarnata* extract is mediated via the GABAergic system. *Planta Medica* [en línea], 2008, (New York) 74 (15), pp 1769-1773. [Consulta: 16 septiembre 2015]. ISSN 0032-0943. Disponible en: <http://www.thieme-connect.com/secure.sci-hub.io/products/ejournals/html/10.1055/s-0028-1088322>
29. **GUTTERIDGE, J.; HALLIWELL, B.** *Antioxidants in nutrition, health, and disease* [en línea]. 2 marzo 1995, pp. 120- 124. [Consulta: 20 septiembre 2015]. Disponible en: <https://global.oup.com/academic/product/antioxidants-in-nutrition-health-and-disease-9780198549024?lang=en&cc=jp#>
30. **GUZMAN, LORENA.** *La ansiedad se come el mundo* [en línea]. Chile: EL TIEMPO Casa Editorial., 17 mayo 2015. [Consulta: 13 septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.eltiempo.com/estilo-de-vida/salud/la-ansiedad-se-come-al-mundo/15767477>
31. **HARBORNE, A.J.** *Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis.* Springer Netherlands, 3, 1998, p. 302.
32. **HUANG, S.; TEIK, L.** Quantification of polyphenolic content and bioactive constituents of some commercial rice varieties in Taiwan. *Journal of Food and Analysis*[en línea]. 2012,

- (Taiwan), 26(1), pp. 122-127. [Consulta: 23 agosto 2015]. ISSN 0889-1575. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/sci-hub.io/science/article/pii/S0889157512000506>
33. **IESM-OMS**. *Informe sobre el Sistema de Salud Mental en el Ecuador* [en línea]. Ecuador: diciembre, 2007. [Consulta: 13 septiembre 2015]. Disponible en: [http://www.who.int/mental\\_health/ecuador\\_who\\_aims\\_report.pdf](http://www.who.int/mental_health/ecuador_who_aims_report.pdf)
34. **JÄGER, AK1.; SAABY, L.** Review Flavonoids and the CNS. *Journal Molecules* [en línea], 2011, (Dinamarca) 16(2) , pp. 1471-1485. [Consulta: 17 septiembre 2015]. ISSN 1420-3049. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21311414>
35. **JIANG; H.; ENGELHARDT, UH.; THRÄNE, C.; et al.** Determination of flavonol glycosides in green tea, oolong tea and black tea by UHPLC compared to HPLC. *Food Chem* [en línea]. 2015, (China) 183(5), pp. 30-35. [Consulta: 24 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25863606>
36. **KRUCIK, G.** *Anxiolytics* [en línea]. HEALTHLINE, 06 junio 2013. [Consulta: 17 de 09 de 2015]. Disponible en: <http://www.healthline.com/health/anxiolytics#Overview1>.
37. **LARGET, R.; LOCKHART, B.; RENARD P.; et al.** A Convenient Extension of the Wessely-Moser Rearrangement for the Synthesis of Substituted Alkylaminoflavones as Neuroprotective Agents *In Vitro*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [en línea], 2000, (France) 10(8), pp. 835-838. [Consulta: 26 diciembre 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10782697>
38. **LUTOMSKI, J.; MALEK, B.** Pharmacological investigations on raw materials of the genus *Passiflora*. *Planta Medica* [en línea], 1975, 27(4), pp. 381-386. [Consulta: 26 diciembre 2015]. Disponible en: [http://www.unboundmedicine.com/medline/citation/1161907/\[Pharmacological\\_investigations\\_on\\_raw\\_materials\\_of\\_the\\_genus\\_passiflora\\_\\_4\\_\\_The\\_comparision\\_of\\_contents\\_of\\_alkaloids\\_in\\_some\\_harman\\_raw\\_materials\\_\\_author's\\_transl\\_\]](http://www.unboundmedicine.com/medline/citation/1161907/[Pharmacological_investigations_on_raw_materials_of_the_genus_passiflora__4__The_comparision_of_contents_of_alkaloids_in_some_harman_raw_materials__author's_transl_])
39. **LYNESS, D'ARCY PhD.** *Anxiety Disorders* [en línea]. Estados Unidos: Teens Health from Nemours Foundation, marzo 2014. [Consulta: 21 agosto 2015]. Disponible en: [http://kidshealth.org/teen/n\\_espanol/mente/anxiety\\_esp.html#](http://kidshealth.org/teen/n_espanol/mente/anxiety_esp.html#)

40. **MALACRIDA: CASSIA, R.; NEUZA, J.** Yellow passion fruit seed oil (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*): physical and chemical characteristics. *Brazilian Archives of Biology and Technology* [en línea], 2012, (Brazil) 55(1), pp. 127-134. ISSN 1516-8913. [Consulta: 26 diciembre 2015]. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/babt/v55n1/v55n1a16.pdf>
41. **MARTÍNEZ, S.; GONZÁLEZ, J.; CULEBRAS, J.; et al.** Revisión Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria* [en línea], 2002, (España) 17(6), pp. 271-278. [Consulta: 16 septiembre 2015]. ISSN 0212-1611. Disponible en: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>
42. **MEDINI, F.; FELLAH, H.; KSOURI, R.; et al.** Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant and antimicrobial activities of organic extracts of shoots of the plant *Limonium delicatulum*. *Journal of Taibah University for Science* [en línea], 2014, (Tunisia) 8(3), pp. 216-224. [Consulta: 24 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1658365514000120>
43. **MERCOLA, D.** *Underrated Medicinal Plants* [en línea]. 01 noviembre 2014. [Consulta: 17 de 08 de 2015]. Disponible en: <http://articles.mercola.com/sites/articles/archive/2014/09/01/medicinal-plants.aspx>.
44. **MINISTERIO DE AGRICULTURA Y PATRIMONIO.** *Patrimonio Alimentario: El poder curativo del taxo en la región andina* [en línea]. Ecuador: 02 abril 2015. [Consulta: 21 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.culturaypatrimonio.gob.ec/patrimonio-alimentario-el-poder-curativo-del-taxo-en-la-region-andina/>.
45. **MIRANDA, M.** *Farmacognosia y Productos naturales (Normas Ramales de drogas crudas y extractos y tinturas)*. 2006, pp. 32-62.
46. **MISHRA, K.; HIMANSHU O.; CHAUDHURY N.** Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food chemistry* [en línea], 2011, (India) 130(4), pp. 1036–1043. [Consulta: 24 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611011058>
47. **MORTON, JULIA F.** *Banana Passionfruit-Fruits of warm climates* [en línea]. 1987. [Consulta: 19 de 08 de 2015]. Disponible en: [https://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/banana\\_passion\\_fruit.html](https://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/banana_passion_fruit.html).

48. **MUÑOZ J, SARMIENTO D.** "Valoración comparativa de dos metodos de secado de plantas medicinales a través de la cuantificación de flavonoides y cumarina" [en línea]. 2010. [Consulta: 20 enero 2016.]. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/2420>
49. **MURAKAMI, AN.; AMBONI, RD.; PRUDÊNCIO, ES.; et Al.** Concentration of biologically active compounds extracted from *Ilex paraguariensis* St. Hil. by nanofiltration. *Food Chemistry* [en línea], 2013, (Brazil) 141(1), pp. 60-65. [Consulta: 24 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23768327>
50. **NIH: INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER.** *Estadísticas de cáncer* [en línea]. Estado Unidos: 25 abril 2012. [Consulta: 16 septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es/estadisticas>
51. **NIH: INSTITUTO NACIONAL DE LA SALUD MENTAL.** *Ansiedad* [en línea]. Estados Unidos: U.S. National Library of Medicine, 16 de Diciembre de 2013. [Consulta: 21 agosto 2015]. Disponible en: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/anxiety.html>
52. **NIH: NACIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH.** *ANXIETY* [en línea]. 05 mayo 2015. [Consulta: 16 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.nimh.nih.gov/health/topics/anxiety-disorders/index.shtml?rf=32471>. 35.
53. **O'CONNOR, P.** *Anxiolytics and Sedatives* [en línea]. Julio 2008. [Consulta: 17 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.merckmanuals.com/professional/special-subjects/drug-use-and-dependence/anxiolytics-and-sedatives>.
54. **OMS.** *Formulario Modelo de la OMS 2004* [en línea]. 2014. [Consulta: 18 agosto 2015]. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js5422s/4.4.html>.
55. **OMS.** *Medicamento esencial* [en línea]. [Consulta: 17 agosto 2015]. Disponible en: [http://www.who.int/topics/essential\\_medicines/es/](http://www.who.int/topics/essential_medicines/es/).
56. **OMS.** *The Pursuit of Responsible Use of Medicines: Sharing and Learning from Country Experiences* [en línea]. 2009. [Consulta: 17 agosto 2015]. Disponible en: [http://www.who.int/medicines/areas/rational\\_use/en/](http://www.who.int/medicines/areas/rational_use/en/).

57. **OMS.** *Uso racional de medicamentos* [en línea]. [Consulta: 17 agosto 2015]. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js4874s/1.html>.
58. **ØYVIND, A.; MARKHAM, K.** *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications* [en línea]. 2006, CRCPress, pp. 1-1212. [Consulta: 24 agosto 2015]. Disponible en: <http://faculty.ksu.edu.sa/alqasoumi/Documents/Andersen%20-%20Flavonoids%20Chemistry,%20biochemistry,%20and%20applications%202021.pdf>
59. **PÉREZ, G.** Los Flavonoides: Antioxidantes o Prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed* [en línea]. 2003, (Cuba), 22 (1), pp. 48-57. [Consulta: 17 septiembre 2015]. Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol22\\_1\\_03/ibi07103.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol22_1_03/ibi07103.pdf)
60. **PERÉZ, REINALDO.** *Los trastornos de la ansiedad, como problema masivo del mundo actual y la búsqueda de programas terapéuticos específicos* [en línea]. La Habana-Cuba, PSICOM Editores-PsicoPediaHoy, 16 septiembre 2014. [Consulta: 13 septiembre 2015]. Disponible en: <http://psicopediahoy.com/trastornos-de-la-ansiedad-programas-terapeuticos/>
61. **PIETTA, PIER-GIORGIO.** Reviews Flavonoids as Antioxidants. *Journal Natural Product* [en línea]. 2000, (Italia), 63(7), pp. 1035-1042. [Consulta: 18 septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10924197>
62. **PRUTHI, JS.** Chemical composition and utilization of passion fruit seed, seed oil and seed meal. *Indian Oil Soap Journal* [en línea]. 1962, (India) 28(3). pp. 55-62. [Consulta: 20 enero 2016]. Disponible en: <http://ir.cftri.com/3400/>
63. **RAMAIYA, S.; BUJANG, J.; ZAKARIA, M.** Assessment of Total Phenolic, Antioxidant, and Antibacterial Activities of *Passiflora* Species.. *The Scientific World Journal* [en línea], 2014, (Malaysia) 2014(1), p. 10. [Consulta: 16 septiembre 2015]. ISSN 167309. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/167309>
64. **REILLY, COLLEEN.** *Antioxidants and Skin Care: Media Hype or Wonder Drug* [en línea]. 16 diciembre 1996. [Citado el: 18 de 08 de 2015]. Disponible en: [http://www.vanderbilt.edu/AnS/psychology/health\\_psychology/anoxres.htm](http://www.vanderbilt.edu/AnS/psychology/health_psychology/anoxres.htm). 31.

65. **SANDHAR, H.; KUMAR, B.; PRASHER, S.; et al.** A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia* [en línea]. India: Hindawi Publishing Corporation, 2011.[Consulta: 17 septiembre 2015].
66. **SANTOS, K.; TESSARO S.; MÜLLER S.; et al.** Sedative and Anxiolytic Effects of Methanolic Extract from the Leaves of *Passiflora actinia*. *Brazikian Archives of Biology and Technology* [en línea], 2006, (Brazil) 49(4), pp. 565-573. [Consulta: 17 septiembre 2015]. ISSN 1516-8913. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/babt/v49n4/30895.pdf>
67. **SARAVANAN, S.; ARUNACHALAM, K.; PARIMELAZHAGAN, T.** Antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic effects of polyphenols from *Passiflora subpeltata* leaves – A promising species of *Passiflora*. *Industrial Crops and Products* [en línea], 2014, (India) 54, pp. 272-280. [Consulta: 26 diciembre 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669014000454>
68. **SARAVANAN, S.; PARIMELAZHAGAN, T.** In vitro antioxidant, antimicrobial and anti-diabetic properties of polyphenols of *Passiflora ligularis* Juss. fruit pulp. *Food Science and Human Wellness* [en línea], 2014, (India) 3(2), pp. 56-64. [Consulta: 26 diciembre 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213453014000160>
69. **SIMIRGIOTIS, M.; SCHMEDA, G.; BÓRQUEZ, J.; et al.** The *Passiflora tripartita* (Banana Passion) Fruit: A Source of Bioactive Flavonoid C-Glycosides Isolated by HSCCC and Characterized by HPLC–DAD–ESI/MS/MS. *Journal molecules* [en línea], 2013, (Chile) 18(2), pp. 1672-1692.[Consulta: 16 septiembre 2015]. ISSN 1420-3049. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1420-3049/18/2/1672>
70. **TAPAS, A.; SAKARKAR, D.; KAKDE, R.** Review Article Flavonoids as Nutraceuticals, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* [en línea]. 2008, (India) 7(3), pp. 1089-1099.[Consulta: 18 septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.bioline.org.br/pdf?pr08030>
71. **TRADE WINDS FRUIT.** Plant Informational DATA BASE. [en línea]. PSHelper, 2013. [Consulta: 21 de 08 de 2015]. Disponible en: <http://www.tradewindsfruit.com/content/banana-passion-fruit.htm>.
72. **UNDERSTOOD.ORG.** *Guía de medicamentos para la ansiedad..* [En línea]. USA LLC, 19 enero 2014. [Consulta: 19 de 02 de 2016]. Disponible en:

mx/learning-attention-issues/treatments-approaches/medications/a-guide-to-anti-anxiety-medications.

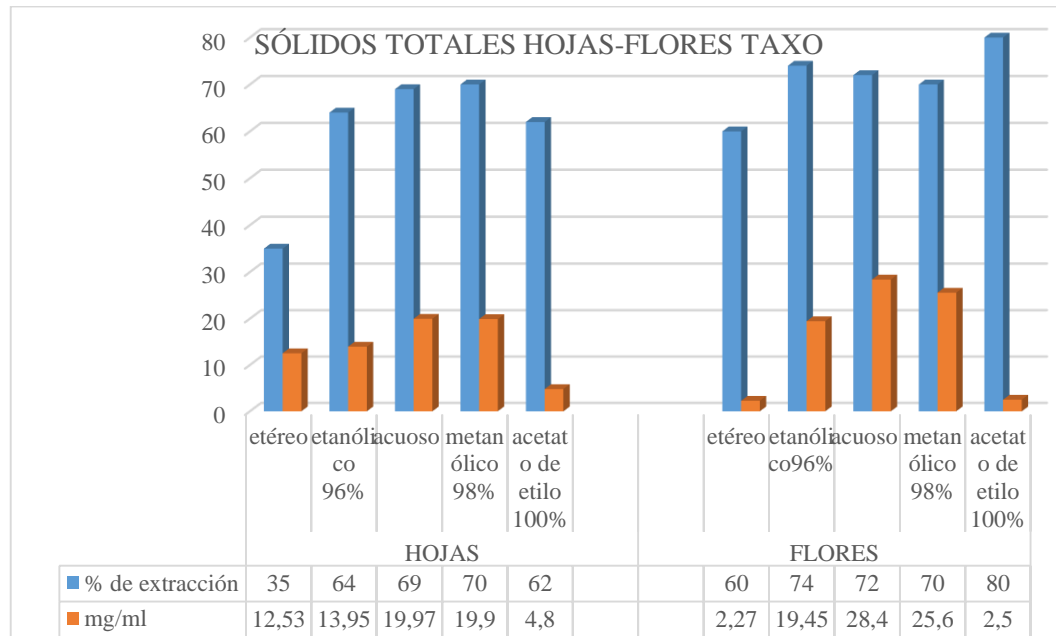
73. **VÍA DEFINICIÓN ABC.** *Medicina tradicional: definiciones* [en línea] [Consulta: 17 de 08 de 2015]. Disponible en: <http://www.definicionabc.com/salud/medicina-alternativa.php>.
74. **WAGNER, HIDEBERT.** *Plant Drug Analysis*. Munich : Springer, 2001, pp. 215-225
75. **WASICKY, A.; HERNANDES, L.; VETORE-NETO, A.; et al.** Evaluation of gastroprotective activity of *Passiflora alata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [en línea], 2015, (Brazil) 25 (4), pp. 407-412. [Consulta: 26 diciembre 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0102695X15001325>
76. **WHO.** *WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues* [en línea]. 2007. [Consulta: 20 enero 2016.]. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/h1791e/h1791e.pdf>.
77. **WILLIAMS, B.; CUVELIER, M.; BERSET, C.** Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* [en línea], 1995, (France) 28(1), pp. 25-30. [Consulta: 24 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643895800085>
78. **ZERAIK, M.; SERTEYN, D.; DEBY-DUPONT, G.; et al.** Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit (*Passiflora edulis* and *Passiflora alata*) extracts on stimulated neutrophils and myeloperoxidase activity assays. *Food Chemistry* [en línea], 2011, (Brazil) 128(2), pp 259-265. [Consulta: 17 septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/sci-hub.io/science/article/pii/S0308814611003670>
79. **ZEYLSTRA, HEIN H.** *PHYTOTHERAPY* [en línea]. The College of Practitioners of Phytotherapy. IT-easy.net, 16 diciembre 2015. [Consulta: 19 enero 2016]. Disponible en: <http://phytotherapists.org/contact.php>.
80. **ZHANG, Y.; TIE, X.; BAO, B.; et al.** Metabolism of flavone C-glucosides and p-coumaric acid from antioxidant of bamboo leaves (AOB) in rats. *The British journal of nutrition* [en línea], 2007, (China) 97(3), pp. 484-494. [Consulta: 24 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17313710>



81. **ZHANG, XIAORUI.** *Medicina tradicional, Medicamentos Esenciales y Política Farmacéutica (EDM)* [en línea]. [Consulta: 17 de 08 de 2015]. Disponible en: [http://www.who.int/topics/traditional\\_medicine/definitions/es/](http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/).

## ANEXOS.

### Anexo A.- Representación gráfica de sólidos totales de diferentes solventes de extracción.



Elaborado por: Monserrath Lema, 2016

### Anexo B.- Cromatografía en capa fina: sistemas de solventes que no presentaron buenos resultados

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

- CONSTANTES DIELECTRICAS DE SOLVENTES

Tolueno; 2.4

Metil Isobutil Cetona: 13.1

Acetato de etilo: 6

Agua: 82

- CONSTANTE DIELECTRICA DEL SISTEMA: 13,93

- REVELADOR: UV



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

- CONSTANTES DIELECTRICAS

Acetato de etilo: 6

Ácido fórmico: 58

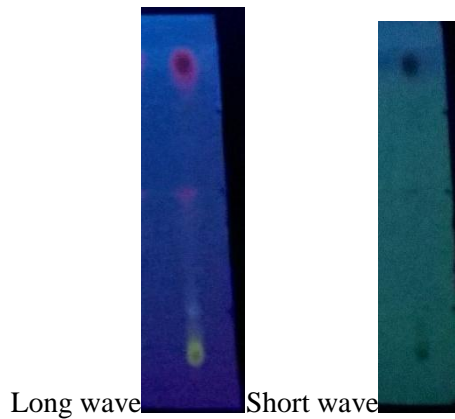
Ácido acético: 6,2

Agua: 82

Metil Isobutil cetona: 13.1

- CONSTANTE DIELECTRICA DEL SISTEMA: 16.87

- REVELADOR: vapores de NH<sub>3</sub>



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

- CONSTANTES DIELECTRICAS

Acetato de etilo: 6

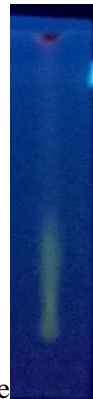
Ácido acético: 6,2

Acetona: 21

Agua: 82

- CONSTANTE DIELECTRICA DEL SISTEMA: 16.62

- REVELADOR: UV



Long wave

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

- CONSTANTES DIELECTRICAS

Acetato de etilo: 6

Agua: 82

Ácido fórmico: 58

Metil Isobutil cetona: 13.1

- CONSTANTE DIELECTRICA DEL SISTEMA: 20,93
- REVELADOR: UV



Long wave

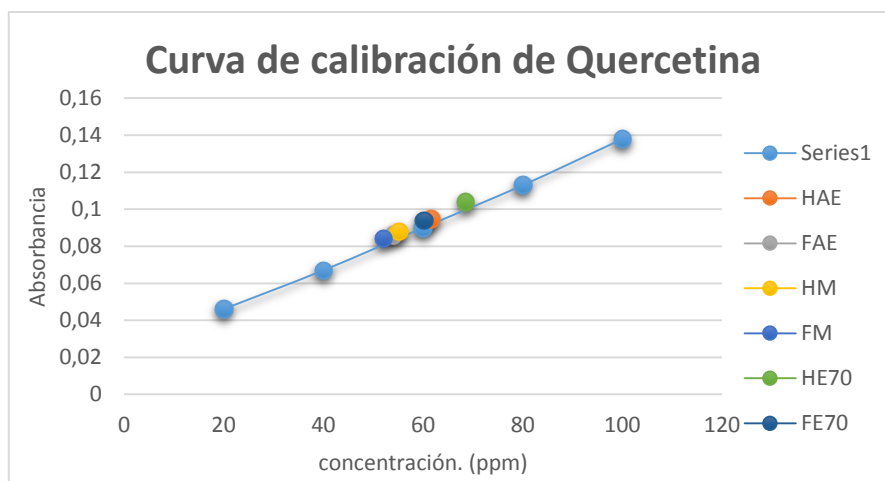


Short wave

**Anexo C.-** Curva de calibración de quercetina por el método de tricloruro de aluminio

<b>CURVA DE CALIBRACIÓN DE QUERCETINA</b>	
<b>Concentración (ppm)</b>	<b>Absorbancia</b>
20	0.046
40	0.067

60	0.090
80	0.113
100	0.138

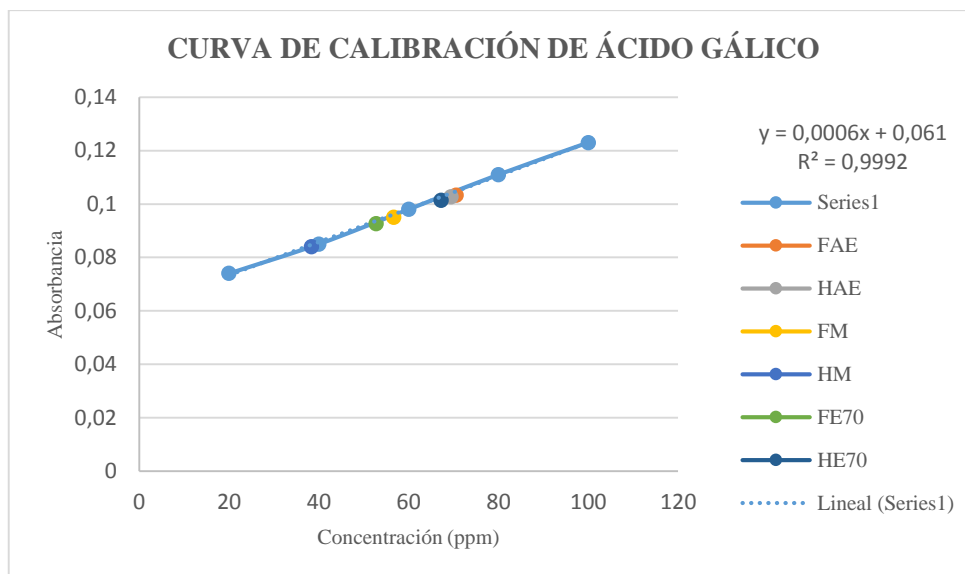


Elaborado por: Monserrath Lema, 2016

**Anexo D.-** Curva de calibración de ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu.

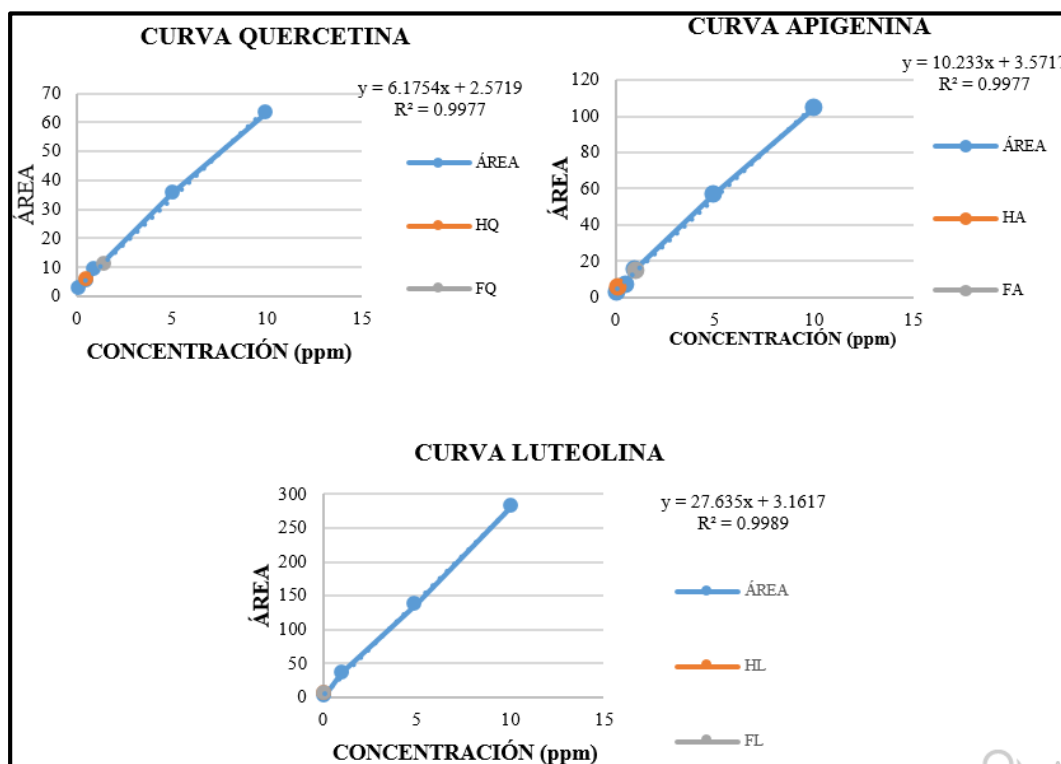
<b>CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO</b>	
<b>Concentración (ppm)</b>	<b>Absorbancia</b>
20	0.074
40	0.085
60	0.098
80	0.111
100	0.123

Elaborado por: Monserrath Lema, 2016



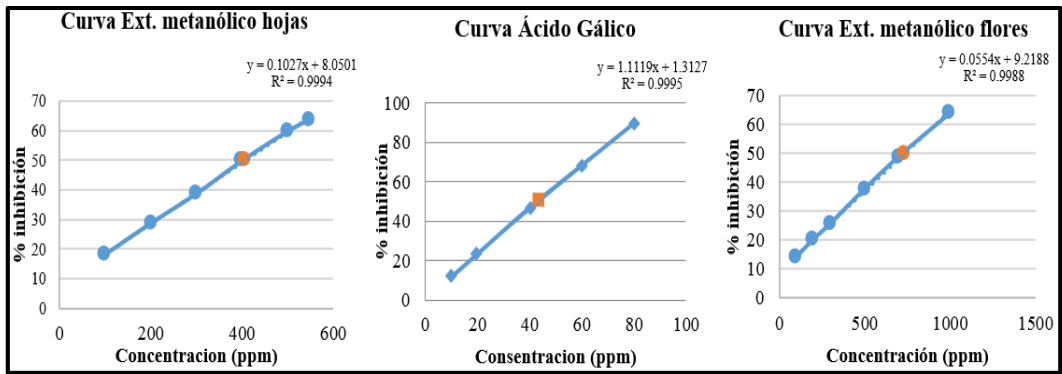
Elaborado por: Monserrath Lema, 2016

**Anexo E.-** Curva de calibración de apigenina, luteolina y quercetina para analisis HPLC.



Elaborado por: Monserrath Lema, 2016

**Anexo F.-** Determinación de capacidad captadora de radicales libres DPPH - curva de IC50



Elaborado por: Monserrath Lema, 2016

### Anexo G.- Secado de la materia vegetal



### Anexo H.- Control de calidad de materia vegetal



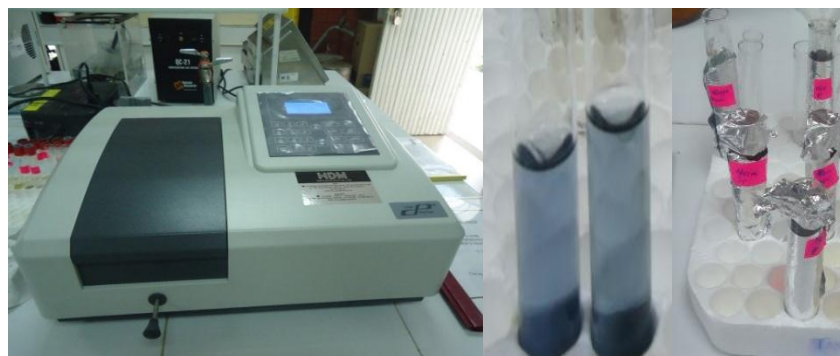
### Anexo I.- Tamizaje Fitoquímico



**Anexo J.- Sólidos Totales**

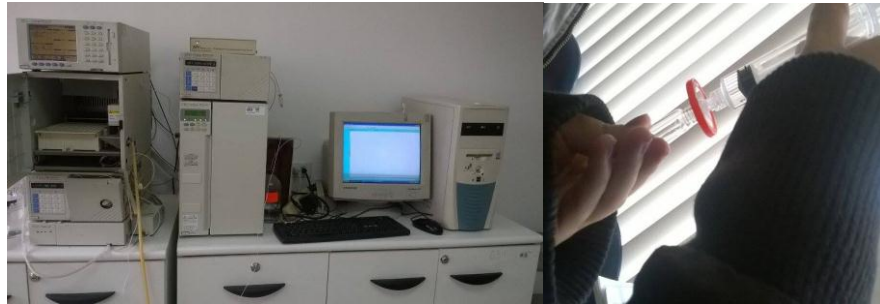


**Anexo K.- Cuantificación de flavonoides y fenoles**



**Anexo L.- Análisis HPLC muestras hidrolizadas**





**Anexo M.-** Determinación de capacidad captadora de radicales libres

