

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



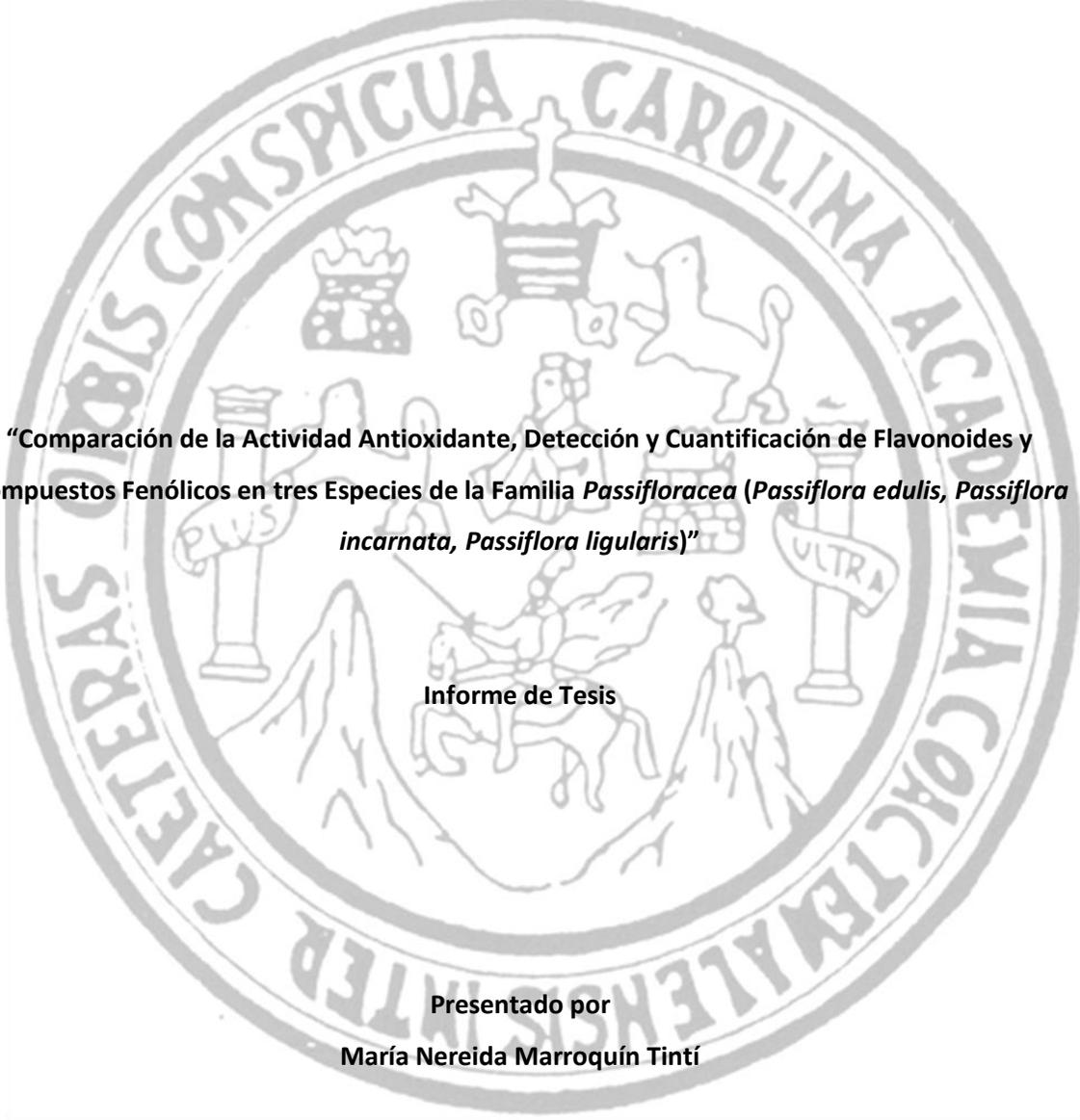
“Comparación de la Actividad Antioxidante, Detección y Cuantificación de Flavonoides y Compuestos Fenólicos en tres Especies de la Familia *Passifloraceae* (*Passiflora edulis*, *Passiflora incarnata*, *Passiflora ligularis*)”

María Nereida Marroquín Tintí

Química Farmacéutica

Guatemala, Julio de 2011

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a large, circular emblem in the background. It features a central figure on a horse, surrounded by various symbols including a crown, a lion, and a banner with the word 'ULTRA'. The text 'ACADEMIA CAETEMALENSIS INTER CAETERAS OBIS CONSPICUA CAROLINA' is inscribed around the perimeter of the seal.

“Comparación de la Actividad Antioxidante, Detección y Cuantificación de Flavonoides y Compuestos Fenólicos en tres Especies de la Familia *Passifloraceae* (*Passiflora edulis*, *Passiflora incarnata*, *Passiflora ligularis*)”

Informe de Tesis

**Presentado por
María Nereida Marroquín Tintí**

**Para optar al título de
Química Farmacéutica**

Guatemala, Julio de 2011

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Manuel Cobar Pinto, Ph. D.

Decano

Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.

Secretario

Licda. Lillian Magaly Vides de Urizar

Vocal I

Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladres

Vocal II

Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli

Vocal III

Br. José Roy Morales Coronado

Vocal IV

Br. Cecilia Liska de León

Vocal V

AGRADECIMIENTO

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, templo del saber, por darme la oportunidad de crecer académicamente y desarrollarme como profesional.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, especialmente a la Escuela de Química Farmacéutica por brindarme todos los conocimientos necesarios para mi desempeño profesional y personal.

Al Laboratorio de Productos Naturales – LIPRONAT-, por permitirme trabajar dentro de sus instalaciones, así como de haberme permitidos compartir momentos muy especiales con todos mis compañeros de trabajo, los lipronenses.

A mi asesora, Licenciada Sully Margot Cruz Velásquez por haberme orientado sabiamente para la elaboración del trabajo de investigación y fomentar en mí el espíritu de investigación hacia el gran campo de los productos naturales.

A todos los excelentes catedráticos de la facultad, especialmente a los grandes licenciados de la Escuela de Química Farmacéutica, por haberme instruido con dedicación para prepararme en el desempeño profesional.

Al proyecto de investigación FODECYT 17-2009 de “Actividad Antioxidante de especies de *Piper*”, por la ayuda en la compra de reactivos para cada uno de los ensayos de los métodos montados.

Al departamento de Anatomía y Fisiología y de Química medicinal por darme la oportunidad de trabajar como auxiliar y de esta forma contribuir en la formación de los futuros colegas.

A mis compañeros de promoción por su amistad, ayuda y compañerismo; ya que cada una de las experiencias que vivimos, alegrías, tristezas, enojos y preocupaciones nos ayudaron a crecer como personas y profesionales.

A la familia Xoquic Cuc por permitirme ser parte de su familia desde la realización de mí EPS en Sololá, ya que me brindaron su amistad y cariño.

A todas aquellas personas que de una manera u otra han contribuido en la culminación de esta etapa de mi carrera.

DEDICATORIA

A Dios: Por ser el que siempre me cuida, ilumina y guía durante cada etapa de mi vida; que durante las noches de desvelo y estudio nunca estuve sola ya que contaba con su compañía.

A mis Padres: Fernando Marroquín Palencia y Apolonia Tintí Veliz, por su amor incondicional, su esfuerzo y dedicación para que todos sus hijos realicen sus estudios y lleguen a ser profesionales de éxito; esta meta que hoy alcanzó es gracias a ustedes.

A mi Abuela: Genara De Jesús Palencia Rojas, la mamá Naya, por su infinito amor; ya que es una verdadera segunda madre para todos sus nietos por educarme con amor y regañarme cuando era necesario.

A mis Hermanos: Mónica, Salomón, Sofía, Emperatriz, Andrea y José; por su ayuda en cada momento de mi vida, por las peleas que al final nos unen más como hermanos y ante todo saber que aunque se sienta tener todo el mundo en contra puedo contar con el apoyo de mis hermanos, los patojos Marroquín Tintí.

A mis Sobrinos: Gabriela Celeste y Víctor Maximiliano por ser la luz de mi vida, mi inspiración para seguir adelante y verlos alcanzar sus propias metas.

A los Ángeles que me cuidan desde el cielo: Maximiliano, Felisa, Teresa y Jóvito Marroquín porque sé que desde el cielo están cuidándome y celebrando conmigo este momento.

A mis Amigos: Por compartir conmigo cada momento de mi vida alegrías, tristezas y preocupaciones; y en algún momento darme un consejo sabio.

A mis compañeros de promoción: Porque compartimos preocupaciones, desvelos, exámenes y sobre todo la alegría de estar todos juntos viviendo la aventura de volvernos profesionales.

A la Familia Xoquic Cuc: Por convertirse en mi familia lejos de casa y preocuparse por mí.

A mi familia en general: Por compartir mi triunfo.

A todas: Aquellas personas que de una u otra manera me han ayudado y se alegran con esta meta alcanzada.

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Antecedentes	5
4. Justificación	15
5. Objetivos	16
6. Hipótesis	17
7. Materiales y Métodos	18
8. Resultados	32
9. Discusión de Resultados	42
10. Conclusiones	47
11. Recomendaciones	49
12. Referencias	50
13. Anexos	55

1. Resumen

Existe creciente evidencia que muchas de las enfermedades son consecuencia de los procesos oxidativos celulares que están involucrados en el daño a las biomoléculas, contribuyendo a la etiología de enfermedades crónicas y degenerativas.

Se ha reportado que dentro de los metabolitos secundarios para la familia Passifloraceae, se encuentran diferentes compuestos fenólicos como flavonoides; estos compuestos están relacionados con actividad antioxidante fue por ello que se decidió estudiar tres especies de esta familia, que son nativas de nuestro país, *P. ligularis*, *P. edulis* y *P. incarnata*. Las especies se colectaron en diferentes partes de Guatemala, Chimaltenango y Suchitepéquez, después se identificaron y se secaron, para dejarles una humedad residual por debajo del 10%. Se prepararon extractos de diclorometano y metanol por percolación y rotavaporación. Se identificaron y cuantificaron flavonoides y fenoles totales; así mismo se determinó la actividad antioxidante por medio de un método cualitativo, la cromatografía en capa fina (CCF) y dos métodos cuantitativos espectrofotométricos con 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y el ensayo de decoloración de radical catiónico del reactivo ácido 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).

Los mejores porcentajes de extracción se obtuvieron con los extractos metanólicos de las tres especies, dando el mayor rendimiento *P. incarnata* (16.02%); el análisis de flavonoides se realizó sobre el material vegetal y se detecto por CCF y en tubos la presencia de diferentes flavonoides; la cuantificación se realizó expresándola como rutina y también como vitexina, el cual es el flavonoide representativo de estas especies, dando el mayor cantidad en *P. incarnata* con un 10.51% y 23.6% respectivamente. Mientras que en la cuantificación de fenoles totales los mayores porcentajes se encontraron en los dos extractos de *P. ligularis*, el de metanol y el de diclorometano (31.93 μ g/g y 30.80 μ g/g respectivamente).

La actividad antioxidante se determinó cualitativamente por CCF, en donde todos los extractos evidenciaron una actividad positiva; la cuantificación de esta actividad se realizó por el método de DPPH que sirve para determinar dicha actividad de compuestos con características polares, con este método se determinó que la mejor actividad la presentó el extracto de metanol de *P. ligularis* con un IC₅₀ 1.65mg/ml. Con el método de ABTS se cuantifica la actividad de compuestos con características más apolares y por este método la mejor actividad también se presentó con el extracto de metanol de *P. ligularis* con un IC₅₀ de 2.22mg/ml. Se realizaron los cálculos de equivalentes de Trolox de actividad antioxidante (TEAC), en el cual se observó que los extractos de

metanol de las especies presentaron la cantidad más alta de TEAC, obteniéndose los mejores resultados en el extracto de metanol de *P. ligularis* con un valor de 23.6mmol/g de extracto, lo cual coincide con los resultados de IC_{50} encontrados con el método de DPPH y ABTS.

Se observó concordancia entre los resultados obtenidos por el método de DPPH, ABTS y fenoles totales; para determinar la actividad antioxidante ya que en todos la mejor actividad fue presentada por *P. ligularis* en su extracto metanólico, además los otros extractos de las otras especies mantuvieron cierta relación.

Se determinó que las especies nativas de *Passiflora* que se estudiaron si presentan una actividad antioxidante, por lo que además de los usos terapéuticos que ya se le atribuyen a esta familia, como lo es analgésica, espasmolítico, relajante, entre otros; tienen potencial como antioxidantes los cuales tienen una amplia aplicación en cosmética, alimentos o medicamentos.

2. Introducción

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. Los radicales libres son componentes que se generan en el organismo, están implicados en numerosos eventos fisiopatológicos como envejecimiento, cáncer, arterosclerosis y diabetes, ocasionados por el proceso oxidativo que producen dichos compuestos. Aunque las reacciones de oxidación son cruciales para la vida, también pueden ser perjudiciales. Por lo tanto las plantas y los animales mantienen complejos sistemas de múltiples tipos de antioxidantes, tales como glutatión, vitamina C y vitamina E, así como enzimas tales como la catalasa, superóxido dismutasa y varias peroxidasas. Los niveles bajos de antioxidantes o la inhibición de las enzimas antioxidantes causan estrés oxidativo y pueden dañar o matar las células.

Para contrarrestar la acción de los radicales libres se requiere de compuestos que posean actividad antioxidante y que a su vez no presenten toxicidad, la cual se ha observado en antioxidantes artificiales que generalmente se utilizan como aditivos en alimentos. Esta desventaja abre el campo en el estudio y exploración en el ámbito de las plantas en búsqueda de metabolitos con actividad antioxidante y con menos efectos tóxicos.

Es por ello que se realizó un estudio de la actividad antioxidante de tres especies de la familia *Passifloraceae*, de esta forma ampliar los conocimientos que se tiene de dicha familia, la cual presenta especies con gran potencial terapéutico.

Dicha actividad se determinó mediante tres métodos: uno cualitativo, la cromatografía en capa fina, este para poder descartar qué extractos puedan ser de interés cuantitativo; además los otros dos métodos son cuantitativos la espectrofotometría con 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) que sirve para la detección de moléculas de tipo polar; y el ensayo de decoloración de radical catiónico del reactivo ácido 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS). Este permite la cuantificación de moléculas de tipo apolar. Ambos reactivos ayudan en la determinación de la actividad antioxidante según la presencia de diferentes grupos funcionales en los metabolitos, con lo que se podría tener una noción de qué tipo de molécula es la que pueda presentar más actividad antioxidante en los extractos de las plantas. Con estos métodos se pudo determinar si existe o no actividad antioxidante en las tres especies estudiadas de la familia *Passifloraceae*, y de

presentar actividad antioxidante poder ser comparada contra una sustancia de referencia como lo es el Trolox.

Además se cuantifico la presencia de compuestos con posible actividad antioxidante como los flavonoides y compuestos fenólicos, esto para poder determinar si la presencia de los mismos pueda tener una implicación en su actividad antioxidante.

3. Antecedentes

3.1 Definición de antioxidante:

El término antioxidante fue utilizado originalmente para referirse específicamente a un producto químico que previniera el consumo de oxígeno. A finales del siglo XIX y a principios de siglo XX, extensos estudios fueron dedicados a las aplicaciones de antioxidantes en importantes procesos industriales, tales como la prevención de la corrosión del metal, la vulcanización del caucho, y la polimerización de combustibles en la formación de escoria en motores de combustión interna (Matill, 1947, 177).

Las primeras investigaciones sobre el rol de los antioxidantes en biología se centraron en su uso en la prevención de la oxidación de grasas insaturadas, que es la causa de la rancidez (German, 1999, 22). La actividad antioxidante podía ser medida simplemente colocando la grasa en un contenedor cerrado con oxígeno y midiendo la tasa de consumo de éste. Sin embargo fue la identificación de las vitaminas A, C, y E como antioxidantes la que revolucionó el campo y condujo a dilucidar la importancia de los antioxidantes en la bioquímica de los organismos vivos (Jacob, 1995, 16; knight, 2001, 331).

Los posibles mecanismos de acción de los antioxidantes fueron investigadas por primera vez cuando fue reconocido que una sustancia con actividad antioxidante es probable que sea una que se oxida a sí misma fácilmente (Moreau, 1992, 321). La investigación en cómo la vitamina E previene el proceso de peroxidación de lípidos condujo a la identificación de antioxidantes como agentes reductores que previenen reacciones oxidativas, a menudo depurando especies reactivas del oxígeno antes de que puedan dañar las células (Wolf, 2005,363).

3.2 Radical libre:

Un radical libre es una especie química con uno o más electrones desapareados en un orbital externo, por lo cual constituye una molécula altamente inestable. Entre los radicales libres más importantes, están los derivados del oxígeno: el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el oxígeno. Por sus propiedades oxidantes, los radicales libres reaccionan rápidamente con casi cada tipo de molécula biológica hallada en forma libre o formando parte de las diferentes estructuras celulares de los seres vivos, tales como:

glúcidos, fosfolípidos, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos, lipoproteínas y membranas celulares (Montero, 2007, 54).

Las fuentes más comunes de generación de radicales libres son: las radiaciones (ultravioleta, rayos X, infrarrojo), el metabolismo (ejercicio extenuante, bebidas alcohólicas, drogas y péptidos alfa-amiloides), las sustancias químicas ambientales (ozono, nitrógeno, productos de combustión, tabaco, hidrocarburos halogenados y metales pesados) y las infecciones (bacterianas, víricas, parasitarias y priones). En la actualidad se reconoce que alrededor de 60 patologías pueden estar relacionadas con el aumento de radicales libres (Montero, 2007, 54).

3.3 Clasificación de los antioxidantes:

Los antioxidantes se clasifican en dos amplios grupos, dependiendo de si son solubles en agua (hidrofílicos) o en lípidos (hidrofóbicos). En general los antioxidantes solubles en agua reaccionan con los oxidantes en el citoplasma celular y el plasma sanguíneo, mientras que los antioxidantes liposolubles protegen las membranas de la célula contra la peroxidación de lípidos (Sies, 1997, 291). Estos compuestos se pueden sintetizar en el cuerpo u obtener de la dieta (Vertuani, 2004, 1677). Los diferentes antioxidantes están presentes en una amplia gama de concentraciones en fluidos corporales y tejidos, con algunos tales como el glutatión o la ubiquinona mayormente presente dentro de las células, mientras que otros tales como el ácido úrico se distribuyen más uniformemente a través del cuerpo.

La importancia relativa y las interacciones entre estos diferentes antioxidantes constituye un área compleja, con varios metabolitos y sistemas de enzimas teniendo efectos sinérgicos e interdependientes unos de otros (Claudiére, 1993, 10; Sies, 1993, 213). La acción de un antioxidante puede depender de la función apropiada de otros miembros del sistema antioxidante (Stohs, 1995, 321). La cantidad de protección proporcionada por cualquier antioxidante depende de su concentración, de su reactividad hacia la especie reactiva del oxígeno y del estado de los antioxidantes con los cuales interactúa (Vertuani, 2004, 1694).

Algunos compuestos contribuyen a la defensa antioxidante quelando los metales de transición y evitando que catalicen la producción de radicales libres en la célula. Particularmente importante es la capacidad de secuestrar el hierro, que es la función de proteínas de unión al hierro tales como la transferrina y la ferritina (Imlay, 2000, 395). El

selenio y el zinc son comúnmente mencionados como nutrientes antioxidantes pero estos elementos químicos no tienen ninguna acción antioxidante ellos mismos sino que se requieren para la actividad de algunas enzimas antioxidantes.

3.4 Metabolitos con actividad antioxidante:

En las plantas existen una gran variedad de metabolitos secundarios que pueden actuar como antioxidantes, de los cuales podemos mencionar:

3.4.1 Tocoferoles y tocotrienoles:

La vitamina E es el nombre colectivo para un sistema de ocho tocoferoles y tocotrienoles relacionados, que son vitaminas antioxidantes liposolubles (Herrera, 2001, 43). De éstos, el α -tocoferol ha sido muy estudiado ya que tiene la biodisponibilidad más alta y el cuerpo preferentemente absorbe y metaboliza esta forma (Brigelius, 1999, 1145). La forma del α -tocoferol es la más importante de los antioxidantes liposolubles y protege las membranas de la célula contra la oxidación reaccionando con los radicales del lípido producidos en la reacción en cadena de peroxidación de lípidos (Herrera, 2001, 47). Esto quita las formas intermedias de radicales libres y evita que la propagación de la reacción en cadena continúe. Los radicales oxidados del α -tocoferoxil producidos en este proceso se pueden reciclar de nuevo a la forma reducida activa a través de la reducción por el ascorbato, el retinol o el ubiquinol (Wang, 1999, 309). Las funciones de las otras formas de la vitamina E están menos estudiadas, aunque el γ -tocoferol es un nucleófilo que puede reaccionar con mutágenos electrofílicos (Brigelius, 1999, 1155) y los tocotrienoles puede que tengan un rol especializado en la neuroprotección (Sen, 2006, 2088).

3.4.2 Carotenoides:

Están entre los pigmentos naturales más comunes y han sido caracterizados hasta ahora más de 600 compuestos diferentes. Los carotenoides son responsables por muchos de los colores rojos, amarillos y naranja de las hojas, frutas y flores de los vegetales, así como también por el color de algunos insectos, aves, peces y crustáceos. Solamente pueden ser sintetizados por plantas, hongos, bacterias y algas, sin embargo muchos animales los incorporan a través de la dieta. Dos carotenoides dietarios importantes son el licopeno y el β -caroteno (Cantrell, 2003, 47; Stahl, 2003,

345). Estos están involucrados en la eliminación (scavenging) de dos de las especies reactivas del oxígeno, el oxígeno singlete y el radical peroxilo. Además son efectivos desactivando moléculas excitadas electrónicamente las cuales están involucradas en la generación tanto de radicales como del propio oxígeno singlete (Van, 2003, 215). Los carotenoides, barren eficientemente los radicales peroxilos, especialmente cuando la tensión de oxígeno es baja.

3.4.3 Polifenoles:

Son fitoquímicos de bajo peso molecular, esenciales para el ser humano. Estos constituyen uno de los metabolitos secundarios de las plantas, más numerosos y distribuidos por toda la planta, con más de 800 estructuras conocidas en la actualidad. Los polifenoles naturales pueden ir desde moléculas simples (ácido fenólico, fenilpropanoides, flavonoides), hasta compuestos altamente polimerizados (ligninas, taninos). Los flavonoides representan el subgrupo más común y ampliamente distribuido y entre ellos los flavonoles son los más ampliamente distribuidos. Al estar ampliamente distribuidos en el reino vegetal, constituyen parte integral de la dieta (Girgin, 2004, 19; Soobrattee, 2005, 200; Halliwell, 2005, 2685). Los polifenoles poseen una estructura química ideal para la actividad como consumidores de radicales libres. Su propiedad como antioxidante, proviene de su gran reactividad como donantes de electrones e hidrógenos y de la capacidad del radical formado para estabilizar y deslocalizar el electrón desapareado (termina la reacción en cadena) y de su habilidad para quelar iones de metales de transición (Vaya, 2001, 99). Los polifenoles poseen una porción hidrofílica y una porción hidrofóbica. Su capacidad antioxidante está directamente relacionada con el grado de hidroxilación del compuesto (Girgin, 2004, 25). Los flavonoides tienen una poderosa acción antioxidante in Vitro, siendo capaces de barrer un amplio rango de especies reactivas del oxígeno, nitrógeno y cloro, tales como el superóxido, el radical hidroxilo, el radical peroxilo, el ácido hipocloroso, actuando como agentes reductores. Además pueden quelar iones de metales de transición (Halliwell, 2005, 2760; Roginsky, 2003, 261).

3.5 Estudios de antioxidantes realizados:

3.5.1 Actividad antioxidante aplicando un ensayo de decoloración mejorado del catión ABTS:

Un método para el cribado de la actividad antioxidante es reportado como un ensayo de decoloración aplicable tanto a antioxidantes lipofílicos como hidrofílicos, incluyendo flavonoides, hidroxycinamatos, carotenoides y antioxidantes plasmáticos: El radical pre-formado monocación de 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS⁺) es generado por la oxidación de ABTS con persulfato de potasio y es reducido en la presencia de antioxidantes donadores de protones. Durante la determinación de la actividad antioxidante se debe tomar en cuenta tanto la concentración del antioxidante como la duración de la reacción en la inhibición de la absorción del radical catiónico. Este ensayo claramente mejora, en diversas formas, al ensayo original (ensayo mioglobina férrica/ABTS) para la determinación de la actividad antioxidante. Primero, la química involucra la generación directa del radical monocatiónico ABTS sin involucrar un radical intermedio. Segundo, es un ensayo de decoloración; por tanto, el radical catiónico es pre-formado previo a su adición al ensayo de sistemas antioxidantes, en lugar de que la generación del radical tome lugar continuamente en la presencia del antioxidante. Por consiguiente, los resultados obtenidos con el sistema mejorado pueden no siempre ser comparables con aquellos obtenidos usando el ensayo TEAC original. Tercero, es aplicable tanto para sistemas acuosos como lipofílicos (Re, 1999, 1231).

3.5.2 Presencia y actividad de los antioxidantes naturales en las bebidas espirituosas a base de plantas:

En vista del creciente interés en antioxidantes naturales y su papel en el mantenimiento de la salud y el bienestar, se realizó un estudio para medir la presencia y actividad de los antioxidantes naturales en diferentes bebidas espirituosas a base de plantas. Utilizando tres métodos diferentes la oxidación de los ácidos linoleico, valoración en base a DPPH y un método de fluorescencia en TLC; variaciones significativas en antioxidantes naturales se encuentran las actividades comerciales en 11 muestras de bebidas espirituosas a base de plantas. Los resultados

de las bebidas espirituosas a base de plantas se compararon con la capacidad antioxidante del vino tinto, así como antioxidantes naturales purificados como catequina, quercetina, eugenol, ácido ascórbico, y trans-resveratrol (Imark, 2000, 239).

3.5.3 Comparación de los contenidos de antioxidantes de frutas, verduras y té de medida como la vitamina C equivalentes:

La mayor parte de los beneficios para la salud de té negro y té verde hecho de *Camellia sinensis* se atribuyen a su contenido de antioxidantes. Muchas plantas y especias se han utilizado para hacer infusiones que se refiere erróneamente como "té". La expresión "rico en antioxidantes" se usa a menudo para describir este tipo de infusiones, a menudo sin apoyo científico. Se ha utilizado el método DPPH para cuantificar el total de la capacidad de barrido del radical (RSC) de una amplia gama de "té", frutas y hortalizas, los resultados se presentaron como equivalentes de vitamina C. Estos resultados se compararon con la RSC de las porciones recomendadas de frutas y hortalizas en la pirámide nutricional de una dieta sana y equilibrada. La EC50 resultados muestran que hay diferencias estadísticamente significativas en la RSC de té negro y té verde. Sin embargo, la RSC de "té" hecho a partir de otras especies de plantas son significativamente inferiores. Los resultados muestran que una o dos tazas de té podrían proporcionar una cantidad similar de RSC como cinco porciones de frutas y verduras o 400mg equivalentes de vitamina C (Toit, 2001, 63).

3.5.4 Evaluación de propiedades antioxidantes de la corteza de la raíz *Hemidesmus R. Br.* (Anantmul):

Hemidesmus indicus R. Br. (Asclepiadaceae) es una especie bien conocido en el sistema de la medicina Ayurveda. En el presente estudio, la actividad antioxidante del extracto metanólico de la corteza de raíz de *H. indicus* se evaluó en varios modelos *in vitro* e *in vivo*. Además, el análisis fitoquímico preliminar TLC del extracto se estableció para caracterizar el extracto que mostró propiedades antioxidantes. El extracto se encontró que tienen diferentes niveles de propiedades antioxidantes en los modelos probados, DPPH y los radicales superóxido, su actividad fue intensa

(EC50 = 18,87 y 19,9g/ml, respectivamente). También inhibe la peroxidación lipídica del hígado homogenizado (EC50 = 43,8g/ml) y la hemólisis inducida por fenilhidrazina (EC50 = 9,74g/ml), que confirma la estabilización de la membrana. El secuestro de radicales libres puede ser uno de los mecanismos por los que esta especie es eficaz como antioxidante (Ravishankara, 2002, 153).

3.5.5 Actividad antioxidante de radicales libres y la capacidad de barrido de gases entre las plantas medicinales de Korea y flavonoides ensayo guiada por la comparación:

Varias plantas medicinales coreanas fueron seleccionadas para evaluar la capacidad de barrido de radicales libres y actividades antioxidantes que utilizan comúnmente en ensayos. Se extrajeron con diclorometano, metanol o etanol, respectivamente, y se seleccionaron los mejores resultados de actividad antioxidante. Flavonoides, tales como la catequina, morina, naringenina, quercetina y rutina, se incluyeron y se utilizan como estándares en este estudio. Cada una de las muestras bajo las condiciones del ensayo mostraron una relación dosis-dependiente contra los radicales libres del efecto de DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) y un efecto inhibidor de la xantina oxidasa y la peroxidación lipídica. Entre los extractos de plantas, la corteza de la raíz de *Morus alba* y la hoja de *Saururus chinensis* mostraron valores altos en SC50 o ID50. También mostraron un efecto protector sobre el daño del ADN causado por los radicales hidroxilos generados por la radiación UV-inducida por la fotólisis del peróxido de hidrógeno. Este potencial antioxidante correspondió con los resultados de ensayo DPPH espectrofotométrico (Chang, 2002, 1161).

3.5.6 Capacidad antioxidante de algunos comestibles y plantas cicatrizantes de heridas en Omán:

Un examen etnobotánico de los usos de las plantas en Omán llevó a investigar algunas hierbas curativas y comestibles para la actividad antioxidante, usando los métodos de análisis de DPPH *in vivo* y el método de fosfomolibdeno. De las 19 plantas investigadas, los extractos acuosos etanólicos de *Becium dhofarense*, *Publicaria crispa*, *Allophylus rubifolius*, *Olea europea*, *Acacia senegal*, *Pluchea arabica*, *Anogeissus dhofarica*, *Moringa halcón*, *Crodia perrottettii*, *Ficus lutea* y *Acalypha*

indica mostraron mejor la inhibición del radical DPPH en 89-93 %, después de 15 minutos de incubación en una concentración de 50µg/ml. Los valores de IC₅₀ más bajos de 4.45 y 8.5 µg/ml se observaron para la extractos etanólicos de *A. dhofarica* y *A. rubifolius*. La más alta capacidad antioxidante total como equivalentes de ácido gálico 1790, 913, 814, 893 mg/g se obtuvieron de extractos etanólicos de *P.crispa*, *O.europea*, *peregrina* de *M.* y *Caralluma quadrangula* en el ensayo de fosfomolibdeno. *A. dhofarica* una planta endémica, activa contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Los usos de las plantas son racionalizadas sobre la base de su capacidad antioxidante (Marwah, 2005).

3.5.7 Actividad antioxidante in vitro y captación de efectos de extracto de hoja de *Cinamomum verum* ensayada por diferentes metodologías:

La capacidad de captación de radicales libres y actividad antioxidante de los extractos metanólicos de hoja de *Cinamomum verum* (CLE) fueron estudiados en comparación con compuestos de antioxidantes como trolox, Anisol oxhidrilo butilado, el ácido gálico y ácido ascórbico. El extracto metanólico de hoja de *Cinamomum verum* mostró actividad de depuración de radicales libres, especialmente contra el radical DPPH y el catión ABTS. Ellos también demostraron reducir la potencia y actividad quelante de metal, junto con la actividad de depuración del radical oxhidrilo. La actividad inhibitoria de peroxidación del CLE usando un sistema de emulsión de ácido linoleico mostró actividad antioxidante muy buena (Mathew, 2005).

3.5.8 Actividad antioxidante de algunos constituyentes fenólicos de pimiento verde (*Piper nigrum* L.) y nuez moscada fresca (*Myristica fragans*):

El potencial antioxidante de compuestos fenólicos de pimiento verde (*Piper nigrum* L.) y lignanos de nuez moscada (*Myristica fragans*) fueron evaluadas por su habilidad para acomplejar al radical 1,1'- difenil - 2-picrylhidrazyl (DPPH), inhibir la peroxidación lipídica y proteger de daños al plásmido DNA de la exposición a radiación gamma. Los valores de CE₅₀ valores de los principales compuestos fenólicos de pimiento verde es decir, glucósido 3, 4-dihirofenil etanol, 3,4-dihidroxi-6-(N-ethylamino) benzamida y

glucósidos fenólicos ácidos fueron encontrados en 0,076, 0,27 y 0,12 mg/ml, respectivamente, lo que sugiere una alta actividad de purificación radical de estos fenoles. Estos resultados fueron confirmados aún más con voltametría cíclica. El extracto de acetona de nuez moscada y su posterior aislamiento de fracciones para TLC estuvo constituido principalmente de lignanos según lo revelado por GC-MS análisis. Los principales compuestos se identificaron tentativamente y el patrón de masa de fragmentación espectral. La capacidad de purificación de acetona de extraer al radical DPPH, así como sus fracciones era comparativamente inferior que los fenoles de pimienta verde. En contraste, en estas fracciones había una mayor capacidad para inhibir la oxidación de lípidos que fenoles de pimienta según lo revelado por análisis del β -caroteno y ácido linoleico. Un rol protector de ADN de estos compuestos incluso a dosis tan altas como 5Kg sugirió además el uso potencial de pimienta verde y nuez moscada fresca y sus extractos como un nutraceutico para prevenir el daño oxidativo a las células (Chatterjee, 2006).

3.5.9 Comparación de la capacidad antioxidante y citotoxicidad de ciertas cáscaras de frutas:

Un estudio exploró el potencial de los materiales de desperdicio de las frutas como fuentes de antioxidantes naturales. Se usaron las cáscaras de ocho tipos de frutas comúnmente consumidas en Tailandia. Los extractos etanólicos de las cáscaras de frutas fueron sometidas al cribado mediante los radicales DPPH y ABTS. Los resultados de ambos ensayos fueron similares, los tres extractos que marcadamente presentan un alto poder anti-radical libre fueron los extractos de cáscara de *Punica granatum* (granada), *Nephelium lappaceum* (rambután) y *Garcinia mangostana* (mangostán) (Okonogi, 2007).

3.5.10 Radicales, antioxidantes y actividad citotóxica de las plantas *Caatinga* brasileña:

Extractos de 32 plantas de la región nor-este brasileña fueron evaluados mediante ensayo de radical DPPH, beta-caroteno y citotoxicidad. Entre los extractos estudiados *Bysonima cf. gardneriana*, *Mascagnia coriacea*, *Cordia globosa*, *Diodia apiculata* y *Hypenia salzmännii* mostraron la más alta de las actividades de barrido y el radical

DPPH en el ensayo de β -Caroteno la actividad más alta fue presentada por *Passiflora cincinnata*, *Chamaecrista repens*, *B. cf. gardneriana*, *Rollinia leptopetala*, *Serjania glabrata*, *Diospyros gaultheriifolia*, *C. globosa*, *Mimosa opthalmocentra*, *M. coriacea* y *Lippia cf. gardneriana*, *Rollinia leptopetala*, *Serjania glabrata*, *Diospyros gaultheriifolia*, *C. globosa*, *Mimosa opthalmocentra*, *M. coriacea* y *Lippia cf. microphylla*. En cambio, *R. leptopetala*, *Zornia cf. brasiliensis* y *Leonotis nepetifolia* fueron los más activos en la especie *H. Esp* (Juceni, 2007).

3.5.11 Actividad antibacteriana, citotóxica y antioxidante de *Passiflora edulis* Sims:

Fracciones cloroformo y éter de petróleo del extracto etanólico de hojas y tallo de la planta *Passiflora edulis*, fueron sujetos a estudios de actividad antioxidante, antibacteriana y citotóxica. Todas las fracciones mostraron potente actividad antioxidante, del cual la fracción de cloroformo y éter de petróleo del tallo demostró una marcada actividad antioxidante con un IC_{50} valorado de 51.28 μ g/ml y 54.01 μ g/ml respectivamente. En el caso de actividad antibacteriana la fracción de cloroformo del extracto de hoja mostro moderada actividad antibacteriana en de 7-10 contra 12 microorganismos en una concentración de 50 μ g/disco pero no se observo actividad en la fracción de extracto de éter de petróleo. El extracto de cloroformo y éter de petróleo del tallo mostraron una notable actividad antibacteriana a una concentración de 500 μ g/disco en un rango de 8-17 and 7-12 respectivamente contra 12 microorganismos. Fue evidente que el extracto de cloroformo y éter de petróleo de tallo y hojas tienen significativa citotoxicidad con potencial de LC_{50} de 6.63 μ g/ml, 6.89 μ g/ml, 7.91 μ g/ml y 11.17 μ g/ml respectivamente (Ripa, 2009).

Los estudios sobre la actividad terapéutica de especies de *Passiflora* son escasos, únicamente se ha determinado un potencial terapéutico como sedante, para el tratamiento de la ansiedad, hipertensión, estrés, nerviosismo. No existen estudios sobre su actividad antioxidante en Guatemala, pero sí en otras partes del mundo como en Japón, Polonia, con el método del DPPH empleando como muestra extractos cloroformicos, de éter de petróleo y el jugo de la fruta; con esto se observa la importancia del estudio de las especies y observar si

las colectadas en Guatemala y de otro tipo de extracto presentan un comportamiento similar al reportado en los otros estudios.

Al analizar la composición química de la familia *Passifloracea*, se puede observar que presenta metabolitos secundarios con grupos fenólicos, los cuales pueden tener una actividad antioxidante, por lo que se puede realizar un estudio de la posible actividad para así aumentar los conocimientos que se tiene sobre esta familia, así como sus usos medicinales.

4. Justificación

En el organismo se acumulan diferentes sustancias provenientes ya sea del propio metabolismo o por la contaminación ambiental; estas sustancias pueden llegar a causar problemas a la salud de las personas. En los últimos años se ha determinado que muchas enfermedades pueden ser provocadas por radicales libres, sustancias que tienen la capacidad de causar oxidaciones en el organismo y desencadenar enfermedades graves como cáncer. Debido a esto es indispensable investigar sustancias naturales que presenten actividad antioxidante y con menos toxicidad que los compuestos sintéticos que presentan dicha actividad, utilizados actualmente como aditivos alimenticios.

Es por ello importante evaluar la actividad antioxidante de tres especies de la familia Passifloraceae (*Passiflora edulis*, *P. incarnata* y *P. ligularis*), para determinar si presentan actividad antioxidante por medio de la cromatografía en capa fina, la espectrometría con DPPH (1,1-Difenil-2-picrilhidrazil); y el ensayo de decoloración de radical catiónico del reactivo ácido: 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS); lo cual puede servir de precedente para posteriores estudios farmacológicos sobre las especies de dichas familias.

5. Objetivos

5.1. Objetivo General:

- 5.1.1 Comparación de la actividad antioxidante de extractos metanólicos y diclorometánicos de tres especies de la familia Passifloracea (*Passiflora edulis*, *P. incarnata* y *P. ligularis*) colectadas en Guatemala, por medio de un método cualitativo y dos cuantitativos que analizan diferente tipo de moléculas polares y apolares.

5.2. Objetivos Específicos:

- 5.2.1 Evaluar la presencia de flavonoides en las tres especies de pasiflora mediante pruebas cualitativas de coloración y cromatografía en capa fina (CCF)
- 5.2.2 Valorar cualitativamente la actividad antioxidante de los extractos vegetales por medio del método de DPPH por Cromatografía de Capa Fina.
- 5.2.3 Determinar la concentración inhibitoria de radicales libres de los extractos vegetales a través del la espectrometría con DPPH (1,1-Difenil-2-picrilhidrazil); y el ensayo de decoloración de radical catiónico del reactivo ácido: 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)
- 5.2.4 Cuantificar los fenoles totales y flavonoides presentes en cada una de las especies a estudiar.

6. Hipótesis

Por lo menos uno de los extractos vegetales a ensayar presenta actividad antioxidante y compuestos fenólicos que pueden estar relacionados con dicha actividad.

7. Materiales y Métodos

7.1. Universo:

7.1.1. Población:

Tres especies de la familia Passifloraceae (*Passiflora edulis*, *Passiflora incarnata*, *Passiflora ligularis*).

7.1.2 Muestra:

Hojas de *Passiflora edulis*, *Passiflora incarnata*, *Passiflora ligularis*.

7.2. Materiales

7.2.1 Materiales y Equipos

- Percolador de acero inoxidable
- Rotavapor
- Balanza semianalítica y balanza analítica
- Bomba de vacío
- Desecadora
- Campana de extracción de gases
- Cámaras cromatográficas
- Gradillas para tubo de ensayo
- Refrigeradora
- Estufa eléctrica
- Asperjador de vidrio
- Lámpara de UV/VIS
- Cromatoplaca de Sílicagel 60 F₂₅₄
- Espectrofotómetro CARY-50
- Ampolla de decantación
- Papel filtro
- Agitador tipo Vortex
- Sonicador

7.2.2 Reactivos

- Rutina
- Quercetina
- Acetato de etilo
- Ácido acético
- Ácido fórmico
- 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)
- Ácido 2,2'-azin-obis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS)
- Trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)
- Ter- butilhidroxianisol (BHA)
- Persulfato de potasio
- Ácido Ascórbico
- Ácido gálico
- Eugenol
- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Ácido linoleico
- α -Tocoferol
- Etanol
- Metanol
- Diclorometano
- β -caroteno
- Licopeno
- Reactivos para fase móvil de las cromatografías en capa fina
- Reactivos específicos para la determinación de metabolitos secundarios

7.3. Métodos:

7.3.1. Recolección:

El material vegetal será recolectado en Samayac, Suchitepéquez y San José Poaquil, Chimaltenango, en la época de invierno. Conforme a la naturaleza de la parte a estudiar para cada especie se obtendrá una muestra representativa de 1 kg; 250 g serán

identificados y guardados como muestra de referencia, y los 750 g restantes serán sometidos a las pruebas de laboratorio fitoquímico. Las muestras serán procesadas conforme a técnicas convencionales de secado y molienda. El almacenamiento, embalaje y transporte se realizará conforme a los principios aceptados de buenas prácticas de cultivo y post-cosecha (WHO, 1998, 115).

7.3.2. Secado y molienda de la planta:

A la planta secar, moler, realizar la prueba de humedad residual, y si ésta es mayor a lo permitido (<10%) secar en horno a 40°C hasta que cumpla con las especificaciones de humedad. La molienda de la planta realizarla utilizando un tamiz No. 5 para disminuir el tamaño de partícula. Separar de 200-300 g de la planta molida y rotularla con nombre, fecha y parte de la planta a analizar (Sharapin, 2000, 205).

7.3.3. Obtención de extractos:

7.3.3.1 Llenado del percolador

- a) Colocar en la punta del percolador un pedazo de algodón adecuado, de manera que sirva de filtro de forma circular y colocarlo cubriendo el fondo del percolador.
- b) Tapar la punta del percolador con un tapón plástico.
- c) Agregar la tercera parte de la cantidad pesada de materia vegetal seca y cubrir con diclorometano.
- d) Verificar que no queden burbujas y si las hay, hacer presión con una espátula para desaparecerlas.
- e) Agregar el resto del material vegetal seco y cubrir nuevamente con diclorometano, repetir el paso anterior.
- f) Rotular el percolador con el nombre científico de la planta, nombre común, fecha y peso. Dejar reposar por 12-24 horas para que reaccione.
- g) Abrir la llave del percolador y dejar gotear hasta que salga todo el disolvente.

- h) Agregar el disolvente recuperado a la materia en extracción en el percolador, repetir esta operación tres veces antes de comenzar a concentrar en rotavapor.
- i) Pasar el disolvente recogido al balón del rotavapor para concentrar.
- j) Terminado tres veces la rotavaporación del extracto de diclorometano, llenar el percolador, que tiene el material vegetal, con metanol. Esto para obtener el extracto metanolico; lavar el material vegetal tres veces y concentrar el extracto.

7.3.3.2 Concentración en rotavapor:

- a) Encender el baño de María y llevar la temperatura a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$.
- b) Engrasar todas las partes esmeriladas y armar el rotavapor según el instructivo específico.
- c) Succionar la solución obtenida del percolador.
- d) Conectar la bomba de vacío y el rotavapor, e iniciar la destilación del extracto con recuperación del disolvente hasta llevar a la consistencia semisólida. Para el extracto de diclorometano no se trabajo con vacío, mientras que el extracto de metanol se trabaja con vacío aproximadamente 337mmHg
- e) Verter el extracto concentrado en un cristalizador de vidrio debidamente tarado y rotulado.
- f) Colocar en una desecadora durante 7-15 días.
- g) Cuando el extracto tenga consistencia sólida, pasar a viales debidamente tarados y rotulados.
- h) Calcular el rendimiento del extracto y guardar en viales o recipientes herméticos a 4°C .

7.3.4 Evaluación de la actividad antioxidante:

7.3.4.1 Determinación de la actividad antioxidante por cromatografía en capa fina (Gudiel, 2009):

- Aplicar 10 μ L de muestra y 5 μ L del estándar antioxidante terc-butilhidroquinona (TBHQ), rutina, quercetina, vitamina C, vitamina E y Trolox en la cromatoplaca de silicagel 60F₂₅₄
- Colocar la placa en la cámara de vidrio saturada previamente con acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (100:11:11:26).
- Secar y asperjar con 2,2-defenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) (1mg/ml en metanol)
- Detección: si los extractos presentan actividad antioxidante se observa la decoloración del DPPH en las bandas respectivas.

7.3.4.2 Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) mediante espectrofotometría UV-VIS (Córdova, 2009, Gudiel, 2009; Om, 2008, 154; Vasco, 2008, 167):

Preparación de solución madre: Pesar 0.1g de extracto seco y agregar 5ml de metanol absoluto luego introducirlo en el sonicador por 30 minutos, para obtener la solución madre. De esta solución madre preparar una serie de diluciones:

Diluciones

No. tubo	Extracto	Metanol	Dilución
1	1	4	0.2
2	2	3	0.4
3	3	2	0.6
4	4	1	0.8
5	5	0	1.0

De estas disoluciones se encontrará el porcentaje de inhibición que esté entre (60-70%).

- A) Solución de 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) 500 μ M en metanol: Pesar 0.0219g de reactivo de DPPH y disolver con metanol hasta un volumen de 100ml en un balón aforado. Agitar la solución y conservar en un recipiente ámbar. Por ser una solución inestable, se recomienda preparar la solución en mismo día que se va a emplear, preparando únicamente lo necesario.

- B) Buffer de acetato: Para preparar un litro de buffer se debe pesar 5.98g de acetato de sodio disolverlo con agua destilada y trasvasar a un balón de 1000ml; antes de aforar adicionar 3ml de ácido acético glacial. Aforar con agua destilada y agitar. El buffer tendrá un pH de 5.5
- C) Preparación de los tubos de reacción: Utilizar tubos de vidrio con capacidad de 10ml, de preferencia nuevos. En caso de no contar con tubos nuevos, emplear tubos que se hayan lavado correctamente, agregando agua desmineralizada después de su lavado para evitar que interfieran sustancias contenidas en el agua de chorro. Recubrir los tubos completamente con papel aluminio para proteger la reacción de la luz, la cual puede degradar la vitamina C. Preparar una serie de tubos que contiene los reactivos que se citan a continuación:

Reactivo	Blanco Control	Control	Blanco de ensayo	Ensayo*
Buffer de acetatos	1ml	1ml	1ml	1ml
Metanol	2ml	1.5ml	1.9ml	1.4ml
Solución de DPPH	-----	0.5ml	-----	0.5ml
Dilución de cada muestra	-----	-----	0.1ml	0.1ml

* Cada tubo de ensayo de cada dilución de muestra se prepara por triplicado.

Agitar los tubos preparados de esta forma en un vortex durante 30 segundos y luego incubar a temperatura ambiente protegidos de la luz durante 30 minutos. Leer a una longitud de onda de 517nm. Siempre debe leerse la absorbancia del control y del ensayo versus el blanco respectivo.

- D) Registro de los resultados y cálculo del porcentaje de inhibición de la absorbancia: Registrar los valores obtenidos de la curva en base al siguiente esquema:

Tipo de muestra	Absorbancia del blanco	Absorbancia 1era repetición	Absorbancia 2da repetición	Absorbancia 3era repetición	Promedio	Diferencia	% de inhibición
Control							
1							
2							
3							
4							
5							

Para calcular el porcentaje de inhibición de la concentración se emplea la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia del control} - \text{absorbancia de la dilución}}{\text{Absorbancia del control}} * 100 = \% \text{ de inhibición}$$

Luego graficar la concentración del extracto (eje X) vrs porcentaje de absorbancia (eje Y). Determinar la ecuación de la recta y el r^2 el cual se debe encontrar entre 0.97-0.99.

Expresar la actividad antioxidante en términos de la concentración de inhibición al 50% (IC_{50}), que es la concentración del extracto requerida para dar un 50% de disminución de absorbancia de DPPH. Para ello se emplea la ecuación de la recta, quedando la formula de la siguiente manera:

$$IC_{50} = (50 - \text{pendiente}) / \text{intercepto}$$

6.3.4.3 Determinación de la actividad antioxidante por el ensayo de decoloración de radical catiónico del reactivo ácido: 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (Re, 1999; Vasco, 2008):

- A. Preparación de solución madre: Pesar 0.1g de extracto seco y agregar 5ml de metanol absoluto luego introducirlo en el sonicador por 30 minutos, para

obtener la solución madre. De esta solución madre preparar una serie de diluciones:

Diluciones

No. tubo	Extracto	Metanol	Dilución
1	1	4	0.2
2	2	3	0.4
3	3	2	0.6
4	4	1	0.8
5	5	0	1.0

De estas disoluciones se encontrara el porcentaje de inhibición que esté entre (60-70%), con un R^2 0.97-0.99.

B) Preparación de estándares:

- Trolox 2.5mM, se prepara en etanol, emplear diluciones de 0-15 μ M
- Vitamina C: Pesar 0.1g y diluir con 5ml de metanol, preparar diluciones de 0.03-0.04-0.05-0.06-0.07/5ml
- Vitamina E: Pesar 10mg y diluir con 5ml de metanol, preparar diluciones de 0.8-0.9-1-1.1-1.2/5
- Rutina: Pesar 40mg y diluir en 20ml de metanol, preparar diluciones de 2-2.5-3-3.5-4/5.
- Quercetina: Pesar 10mg y diluir con 5ml de etanol, preparar diluciones de 0.2-0.25-0.3-0.35-0.4/5
- Ter-butilhidroxiquinona (TBHQ): Pesar 10mg y diluir con 5ml de etanol, preparar diluciones de 0.4-0.5-0.6-0.7-0.8/5

C) Solución de 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS⁺) 7mM en agua: Para preparar 10ml pesar 38.41mg y diluir con agua hasta 10ml.

D) Solución de persulfato de potasio 2.45mM en agua: Para preparar 5ml pesar 3.31mg y diluir con agua hasta 5ml.

- E) Formación del catión (ABTS⁺): se produce por la reacción de la solución stock de ABTS con persulfato de potasio 2.45mM, una proporción 2:1; y dejando la mezcla en un lugar oscuro por al menos 16-18 horas a temperatura ambiente antes de su uso. Se prepara un día antes de realizar la prueba.
- F) Preparación de la solución de uso: La solución ABTS⁺ es diluida con etanol hasta lograr una absorbancia de 0.70 ± 0.02 a 734nm y equilibrado a 30°C. Se emplea una dilución 1/30 a 1/35 para obtener dicha absorbancia.
- G) Preparación de los tubos de reacción: Utilizar tubos de vidrio con capacidad de 10ml, de preferencia nuevos. En caso de no contar con tubos nuevos, emplear tubos que se hayan lavado correctamente, agregando agua desmineralizada después de su lavado para evitar que interfieran sustancias contenidas en el agua de chorro. Recubrir los tubos completamente con papel aluminio para proteger la reacción de la luz, la cual puede degradar la vitamina C. Preparar una serie de tubos que contiene los reactivos que se citan a continuación:

Reactivo	Control	Ensayo*
Solución de ABTS ⁺	3ml	3ml
Dilución de cada muestra	-----	30µl

* Cada tubo de ensayo de cada dilución de muestra se prepara por triplicado. El blanco de la corrida es etanol al 95%. Tanto la solución de ABTS⁺ como la muestra deben haber estado en la incubadora a 30°C mínimo 30 minutos antes de mezclarlos.

La lectura de la absorbancia se toma a 30°C exactamente un minuto después de la mezcla inicial, al cuarto minuto y al minuto seis.

Para calcular el porcentaje de inhibición de la concentración se emplea la siguiente fórmula:

Absorbancia del control – absorbancia de la dilución * 100 = % de inhibición

Absorbancia del control

Luego graficar la concentración del extracto (eje X) vrs porcentaje de absorbancia (eje Y).

Determinar la ecuación de la recta y el r^2 el cual se debe encontrar entre 0.97-0.99.

Expresar la actividad antioxidante en términos de la concentración de inhibición al 50% (IC_{50}), que es la concentración del extracto requerida para dar un 50% de disminución de absorbancia de ABTS. Para ello se emplea la ecuación de la recta, quedando la formula de la siguiente manera:

$$IC_{50} = (50 - \text{pendiente}) / \text{intercepto}$$

La capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) de un extracto representa la concentración de solución de Trolox que tiene la misma capacidad antioxidante que el extracto. Los valores de TEAC se determinan como sigue:

$$\Delta A_{\text{trolox}} = (A_{T=0 \text{ Trolox}} - A_{T=6 \text{ Trolox}}) - \Delta A_{\text{solvent}(0-6 \text{ min})}$$

$$\Delta A_{\text{trolox}} = m \cdot [\text{Trolox}]$$

$$TEAC_{\text{extracto}} = (\Delta A_{\text{extracto}} / m) \cdot d$$

Donde ΔA = reducción de la absorbancia, A =absorbancia al tiempo dado, m =pendiente de la curva estándar, $[\text{Trolox}]$ = concentración de trolox, d = factor de dilución.

7.3.5 Determinación de flavonoides:

- Ensayo macro y semimicro:

Disolver 3g de extracto seco vegetal en etanol al 50%. Agregar 15ml de éter de petróleo hasta que la extracción se torne incolora. Disolver el residuo en 30ml de metanol al 80%, filtrar y dividir en 5 tubos:

Tubo 1: agregar 0.5ml de ácido sulfúrico concentrado.

Tubo 2: agregar 3 a 5 gotas de cloruro férrico al 10% (p/v)

Tubo 3: agregar 0.5ml de ácido clorhídrico concentrado y calentar en baño de maría por 5 minutos (prueba para leucoantocianinas).

Tubo 4: agregar magnesio metálico y 0.5ml de ácido clorhídrico concentrado.

Tubo 5: agregar un álcali a un extracto acuoso.

Tubo 6: testigo.

Evaluación de reacciones: cambios de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo. Desarrollo inmediato de color flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavononoles (rojo a magenta), flavonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo), isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración (Kuklinski, 2000, 515; Sharapin, 2000, 205; Santa, 1992; WHO, 1998, 115; Lock, 1988, 300; Vila, 2003, 2801; Farmacopea Española, 2002).

- Ensayo en cromatografía en capa fina:

Concentrar hasta 1ml de extracto vegetal y aplicar en la cromatografía.

Solución estándar: emplear solución estándar de rutina, quercetina, hiperosido, ácido clorogénico, etc. (10µl).

Fase móvil: n-butanol- ácido acético glacial- agua (40:10:50 ó 20:5:25)

Fase estacionaria: placa de sílica gel 60F₂₅₄

Detección: Spray revelador: reactivo de productos naturales (NP/PEG). Un típico color fluorescente intenso en UV 365nm es producido inmediatamente al agregar el revelador, o después de 15 minutos. La adición de propilenglicol disminuye el límite de detección de 10µg a 0.5µg. (NP: solución metanólica al 1% de difenilboriloxietilamina. PEG: solución etanólica al 5% de polietilenglicol 4000).

Aplicar a la placa vapores de amoníaco para intensificar el color de las manchas (Sharapin, 2000, 205; Santa, 1992; WHO, 1998, 115; Lock, 1988, 300; Vila, 2003, 2801; Farmacopea Española, 2002).

7.3.6. Cuantificación de metabolitos:

7.3.6.1 Cuantificación de flavonoides expresados como rutina (Córdova, 2009; Gudiel, 2009):

- Solución madre: Pesar 1.5g de material vegetal molida y pasar a un balón de reflujo, adicionar 100ml de etanol al 60% y poner a reflujo en un baño de agua durante una hora. Dejar enfriar y filtrar, pasar el filtrado a un balón aforado de 250ml. Agregar otros 100ml de etanol al 60% al material vegetal y

llevar nuevamente a reflujo durante una hora. Dejar enfriar, filtra y juntar con el filtrado anterior. Aforar hasta 250ml con etanol al 60%.

- Preparación de referencia: Pesar 10mg de la sustancia de referencia de rutina y disolver en metanol absoluto llevando al aforo a 10ml.
- Solución 1: Colocar 2.0ml de la muestra y 2.0ml de cloruro de aluminio al 2% en un matraz aforado de 25ml y llevar al aforo con metanol absoluto.
- Solución 2: Colocar 2.0ml de la muestra en un matraz de 25ml y llevar al aforo con metanol absoluto.
- Solución 3: Colocar 2.0ml de la solución de referencia y 2.0ml de cloruro de aluminio al 2% en un matraz de 25ml y llevar al aforo con metanol absoluto.
- Solución 4: Colocar 2.0ml de la solución de referencia en un matraz aforado de 25ml y llevar al aforo con metanol absoluto.
- Procedimiento: Medir la absorbancia de la solución1, después de 25 minutos a 394nm, usando como blanco la solución 2. Medir la absorbancia de la solución 3, después de 25 minutos a 394nm, usando como blanco la solución 4.
- Cálculos:

$$\% \text{ de flavonoides en base a rutina} = \frac{A_1 P_2 V_2}{A_2 P_1 V_1} * 100$$

Donde:

A_1 = Absorbancia de la muestra

A_2 = Absorbancia de la solución de referencia

P_1 = Peso de la muestra (mg)

P_2 = Peso del estándar. (mg)

V_1 = Volumen de aforo de la muestra (250ml)

V_2 = Volumen de aforo de la solución de referencia (10ml)

7.3.6.2 Cuantificación de flavonoides en base a vitexina (Farmacopea Española, 2002):

- Disolución madre. En un matraz de fondo redondo de 100 ml, introducir 0,200 g de droga pulverizada y añadir 40 ml de alcohol al 60 por ciento V/V R.

Calentar en un baño de agua a 60 °C a reflujo durante 30 min mientras se agita frecuentemente. Dejar enfriar y filtrar la mezcla a través de una torunda de algodón absorbente a un matraz de 100 ml. Poner el algodón absorbente con el residuo de la droga en el matraz de fondo redondo. Añadir 40 ml de alcohol al 60 por ciento V/V R y calentar otra vez en un baño de agua a 60 °C a reflujo durante 10 min. Dejar enfriar y filtrar la mezcla y el primer filtrado, que estaba en el matraz de 100 ml, a través de un filtro de papel a un matraz aforado de 100 ml. Diluir hasta 100 ml con el mismo disolvente, mientras se lava el matraz, el matraz de fondo redondo y el filtro.

- Disolución problema. Poner 5,0 ml de la disolución madre en un matraz. Evaporar a sequedad a presión reducida y tomar el residuo con 10 ml de una mezcla de 10 volúmenes de metanol R y 100 volúmenes de ácido acético glacial R. Añadir 10 ml de una disolución formada por una disolución de 25 g/l de ácido bórico R y 20 g/l de ácido oxálico anhidro R en ácido fórmico anhidro R y diluir hasta 25,0 ml con ácido acético anhidro R.
- Disolución de compensación. En un segundo matraz poner 5,0 ml de la disolución madre. Evaporar a sequedad a presión reducida y tomar el residuo con 10 ml de una mezcla de 10 volúmenes de metanol R y 100 volúmenes de ácido acético glacial R. Añadir 10 ml de ácido fórmico anhidro R y diluir hasta 25,0 ml con ácido acético anhidro R.

Medir la absorbancia de la disolución problema tras 30 min por comparación con la disolución de compensación a 401nm.

$$\frac{A \times 0,8}{m}$$

Calcular el contenido en tanto por ciento de flavonoides totales, expresado como vitexina, a partir de la expresión: tomando 628 como valor de la absorbancia específica. A = absorbancia de la disolución problema a 401 nm, m = masa de la sustancia a examinar en gramos.

7.3.6.3 Cuantificación de fenoles totales (Técnica macrométrica) (Córdova, 2009):

- Preparación de los tubos de reacción y de la curva de lectura: Utilizar tubos de vidrio con capacidad de 10ml, de preferencia nuevos. En caso de no contar con tubos nuevos, emplear tubos que se hayan lavado correctamente, agregando agua desmineralizada después de su lavado para evitar que interfieran las sustancias contenidas en el agua del chorro.
- Preparar una serie de tubos que contengan los reactivos que se citan a continuación:

	H ₂ O (ml)	Ácido gálico (μL) solución 1μg/10μL	Reactivo de Folin- Ciocalteu (ml)	Na ₂ CO ₃ 10% (ml)
Blanco	4.000	0	0.4	0.8
Patrón 1	3.975	25	0.4	0.8
Patrón 2	3.950	50	0.4	0.8
Patrón 3	3.900	100	0.4	0.8
Patrón 4	3.850	150	0.4	0.8
Patrón 5	3.800	200	0.4	0.8
Patrón 6	3.750	250	0.4	0.8
Muestra 1a	3.950	50	0.4	0.8
Muestra 1b	3.900	100	0.4	0.8

Nota: Los tubos muestra 1a y 1b contienen la misma muestra con distintos volúmenes y se agitan en un vortex durante 30 segundos, luego incubar en baño de maría en un rango de 90-100^oC por 1 minuto. Dejar enfriar y leer la absorbancia a 765nm.

- Para realizar los cálculos obtener la media de las absorbancia de la muestra; luego determinar la concentración de la muestra utilizando la ecuación de la línea recta, despejando "x". El resultado así obtenido se utiliza para calcular los μg equivalentes de ácido gálico/mg peso seco. El cálculo se realiza de la siguiente forma:

μg equivalentes de ácido gálico/g de extracto=

$[(\text{Concentración obtenida en base a la curva}/0.05) * (\text{peso alícuota}/\text{volumen reconstitución}) * 1000] * \text{Dilución}$

Concentración en base a la curva= Absorbancia-Intersecto/Pendiente

$$\mu\text{g equivalentes de ácido gálico/g de extracto seco} = [(\mu\text{g equivalentes de ácido gálico/g de extracto}) * (1/1 - \% \text{ Humedad de extracto seco})]$$

7.4 Diseño de la investigación:

Se realizará un estudio experimental de tipo descriptivo.

7.5 Diseño estadístico:

Se realizará un muestreo no probabilístico a conveniencia de las distintas especies vegetales. Por conveniencia para cada extracto se realizaran las pruebas cualitativas de coloración y la cromatografía en capa fina para la determinación de flavonoides, y determinación de la actividad antioxidante por cromatografía de capa fina, haciéndose un análisis descriptivo. Se realizarán 4 réplicas de cada extracto obtenido de cada especie (6 extractos) y de los controles (5 controles) de los siguientes ensayos: determinación de fenoles totales, cuantificación de flavonoides, determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS. Para estos últimos se calculará las medidas de tendencia central (media) y medidas de dispersión (desviación estándar y coeficiente de variación). Así mismo se hará una comparación descriptiva entre estos resultados, comparando los valores de IC_{50} de cada extracto en su actividad antioxidante por DPPH y ABTS; además de comparar la capacidad antioxidante equivalente de Trolox de cada extracto haciéndose un análisis descriptivo.

8. Resultados

8.1 Obtención del material vegetal: En la tabla # 1 se puede observar la procedencia del material vegetal, la parte de la planta utilizada para la obtención de los extractos necesarios para la realización de las pruebas de actividad antioxidante.

Tabla # 1 Recolección del material vegetal

Nombre científico	Nombre común	Parte de la planta recolectada	Cantidad de materia vegetal recolectada	Estado	Procedencia	Coordenadas Geográficas
<i>Passiflora ligularis</i>	Granadilla	Hojas	1kg	Fresco	San José Poaquil	Latitud 14°48'58" Longitud 90°54'45"
<i>Passiflora edulis</i>	Maracuyá/ Granadilla	Hojas	0.5Kg	Fresco	Ecoparcela El Kakawatal, Samayac, Suchitepéquez	Latitud 14°20'10.9"N Longitud 091°30'37.1"O
<i>Passiflora incarnata</i>	Maracuyá/ Granadilla	Hojas	1Kg	Fresco	Ecoparcela El Kakawatal, Samayac, Suchitepéquez	Latitud 14°20'10.9"N Longitud 091°30'37.1"O

Fuente: Datos Experimentales

8.2 Obtención de extractos por medio de percolación y concentración con rotavapor: En la tabla # 2 se puede observar la cantidad de material vegetal empleado para la realización de cada extracto, cantidad de solvente, porcentaje de rendimiento y humedad del extracto seco. La extracción se inicio primero con diclorometano (solvente apolar) y posteriormente con metanol (solvente polar), con este tipo de extracción se puede hacer una extracción fraccionada. En la gráfica # 1 se puede visualizar el rendimiento de cada extracto, observándose una comparación entre cada especie.

Tabla # 2 Proceso de extracción por percolador y rotavapor.

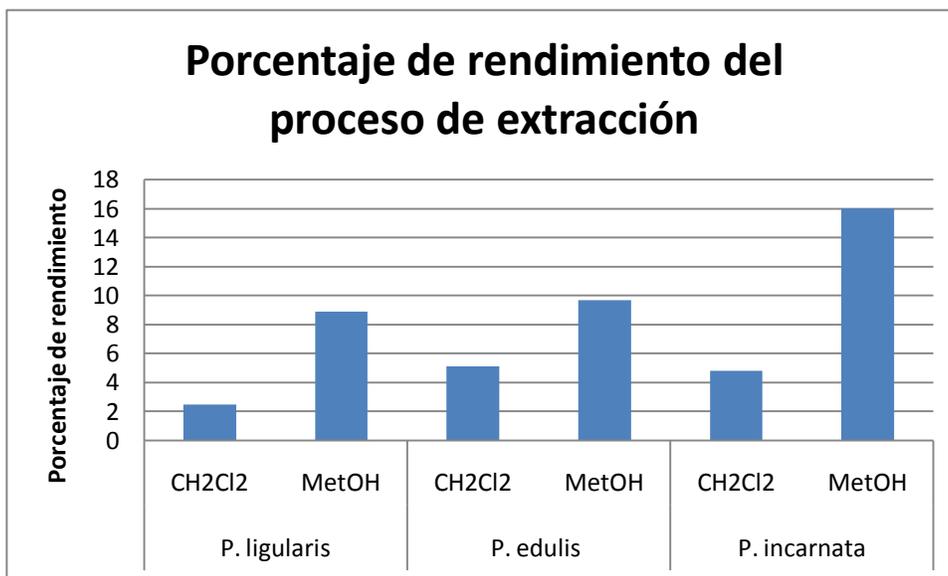
Nombre científico	Nombre común	Material vegetal (g)	Humedad del material vegetal (%)	Cantidad de solvente (L)	Extracto seco (g)	Rendimiento de extracción (%)	Humedad de extracto seco (%)
<i>Passiflora ligularis</i>	Granadilla	200	8.29	2.0 CH ₂ Cl ₂ *	4.93	2.47	6.34
				2.0 MetOH *	17.75	8.88	13.32
<i>Passiflora edulis</i>	Maracuyá/ Granadilla	200	8.39	2.2 CH ₂ Cl ₂	10.22	5.11	7.50
				2.0 MetOH	19.42	9.71	11.84
<i>Pasiflora incarnata</i>	Maracuyá/ Granadilla	200	7.84	2.0 CH ₂ Cl ₂	9.58	4.79	7.11
				2.0 MetOH	32.03	16.02	16.94

Fuente Datos Experimentales

* CH₂Cl₂: Diclorometano; MetOH: Metanol

Ver foto del percolador y rotavaporación en Anexo # 2

Gráfica # 1 Porcentaje de rendimiento de extractos de especies de *Passiflora*



Fuente: Datos Experimentales

8.3 Determinación de flavonoides: En la tabla # 3 se pueden observar los resultados de la determinación de flavonoides en extractos metanólicos, mediante pruebas cualitativas de ensayo macrométrico. En la tabla # 4 la determinación de flavonoides en cromatografía en capa fina. Se analizó la presencia de dicho metabolito ya que se encuentra relacionado con la actividad antioxidante.

Tabla # 3 Determinación de flavonoides en extractos metanólicos mediante pruebas macrométricas

Extracto	Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	Cloruro férrico (FeCl ₃)	Ácido clorhídrico (HCl) + Calor	Magnesio metálico (Mg ₂) + HCl	Álcali	Ácido bórico en anhídrido acético	Resultado
MetOH <i>P. ligularis</i>	+	+	+	+	+	+	Positivo
MetOH <i>P. edulis</i>	+	+	+	+	+	+	Positivo
MetOH <i>P. incarnata</i>	+	+	+	+	+	+	Positivo

* Fuente: Datos Experimentales (+) Indica cambios de color y formación de precipitado comparado con el testigo. (Ver foto de resultados en Anexo # 3)

Tabla # 4 Determinación de flavonoides por medio de Cromatografía en Capa Fina

Muestra	Número de banda	Color UV de la banda	Rf	Resultado
<i>P. ligularis</i>	1	Amarillo	0.48	Positivo
	2	Verde	0.60	
	3	Amarillo	0.92	
<i>P. edulis</i>	1	Amarillo	0.33	Positivo
	2	Verde	0.44	
	3	Amarillo	0.61	
	4	Rojo	0.94	
<i>P. incarnata</i>	1	Amarillo	0.35	Positivo
	2	Verde	0.44	
	3	Rojo	0.50	
	4	Rojo	0.94	
Quercetina	1	Amarillo	0.66	Estándar
Rutina	1	Amarillo	0.20	
Hiperosido	1	Anaranjado	0.41	
Ácido clorogenico	1	Celeste	0.29	

*Fuente: Datos experimentales

Fase móvil: acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial-agua (100:11:11:27) Detección: reactivo de Productos Naturales (NP/PEG).

Fluorescencia azul o amarilla. Dependiendo la estructura fluorescen amarillo, azul o verde (*Ver foto en anexo #4*)

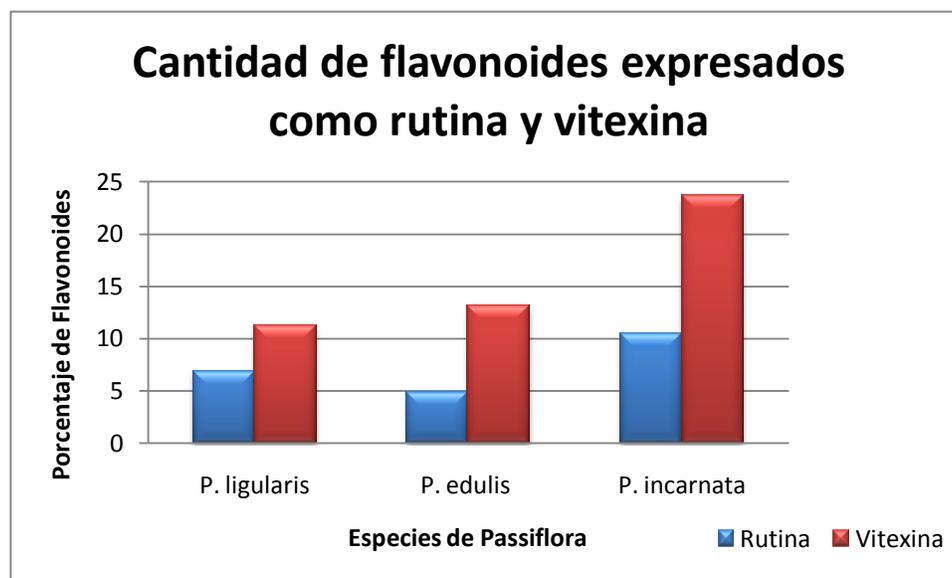
8.4 Cuantificación de metabolitos: En la tabla # 5 se observa la cantidad de flavonoides expresados como rutina y vitexina en cada una de las especies, y en la gráfica # 2 se puede observar una la relación de la cantidad de flavonoides mediante un esquema. La tabla # 6 muestra la cantidad de fenoles totales, mediante ensayo macrométrico, expresados como μg equivalentes de ácido gálico en gramo de extracto, y en la gráfica # 3 se puede observar una la relación de la cantidad de fenoles totales mediante un esquema. Se cuantificó dichos compuestos debido a que sus estructuras se encuentran relacionadas con la actividad antioxidante.

Tabla # 5 Cantidad de flavonoides expresados como rutina y vitexina en material vegetal de especies de *Passiflora*

Espece	% de flavonoides expresados como mg de rutina/g de material vegetal	% de flavonoides totales expresados como mg vitexina/g de material vegetal
<i>Passiflora ligularis</i>	6.86 ± 0.10	11.2 ± 0.5
<i>Passiflora edulis</i>	4.86 ± 0.12	13.1 ± 0.3
<i>Passiflora incarnata</i>	10.51 ± 0.15	23.6 ± 0.5

Fuente: Datos Experimentales

Grafica # 2 Cantidad de flavonoides expresados como rutina y vitexina en material vegetal de especies de *Passiflora*



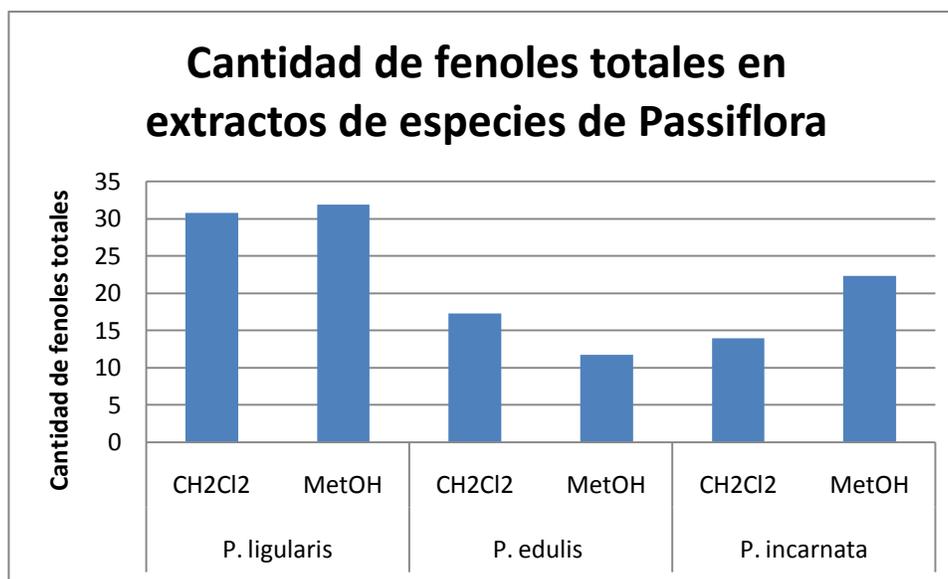
Fuente: Datos Experimentales

Tabla # 6 Cuantificación de fenoles totales por medio de reactivo de Folin- Ciocalteu en extractos diclorometánicos y metanólicos de especies de *Passiflora*

Especie	Extracto	Peso de Mx (g)	Volumen de reconstitución (ml)	Dilución empleada	µg de ácido gálico/g de extracto
<i>P. ligularis</i>	CH ₂ Cl ₂	0.1136	5	1.75:5	30.80 ± 2.49
	MetOH	0.1166	5	0.5:5	31.93 ± 1.67
<i>P. edulis</i>	CH ₂ Cl ₂	0.4064	20	1.5:5	17.28 ± 1.70
	MetOH	0.4025	20	1.5:5	11.73 ± 1.08
<i>P. incarnata</i>	CH ₂ Cl ₂	0.4042	20	1.5:5	14.00 ± 1.85
	MetOH	0.1103	5	1.5:5	22.38 ± 1.40

Fuente: Datos Experimentales

Gráfica # 3 Cantidad de fenoles totales en extractos de especies de *Passiflora*



Fuente: Datos Experimentales

8.6 Determinación de la actividad antioxidante: La tabla # 7 muestra los resultados cualitativos de actividad antioxidante por medio de cromatografía en capa fina. Los resultados cuantitativos de la actividad antioxidantes se pueden observar en la tabla # 8 por medio de DPPH, que es para determinar la actividad antioxidante de compuesto con características polares; y en la gráfica # 4 se puede observar la comparación entre los diferentes extractos según el método de DPPH. La tabla # 9 por medio de ABTS, que es para determinar la actividad antioxidante en compuesto con características más apolares; y en la gráfica # 5 se puede observar la comparación entre los diferentes extractos según el método de ABTS. La gráfica # 6 muestra los resultados obtenidos de actividad antioxidante equivalente a Trolox en cada uno de los extractos. Por último en la gráfica # 7 se muestra una comparación entre los resultados de DPPH y ABTS.

Tabla # 7 Determinación de la actividad antioxidante por cromatografía en capa fina de los extractos metanólicos y diclorometanos de diferentes especies de *Passifloracea*

Especie	Extracto	Actividad antioxidante	Resultado
<i>P. ligularis</i>	CH ₂ Cl ₂	++	Positivo
	MetOH	+++	Positivo
<i>P. edulis</i>	CH ₂ Cl ₂	++	Positivo
	MetOH	+++	Positivo
<i>P. incarnata</i>	CH ₂ Cl ₂	+++	Positivo
	MetOH	+++	Positivo
Rutina	Estándar	+++	Positivo
Quercetina		+++	Positivo
β-Caroteno		+	Positivo
TBHQ		+++	Positivo

Fuente: Datos Experimentales

Fase móvil: acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial-agua (100:11:11:27)

Detección: reactivo de DPPH

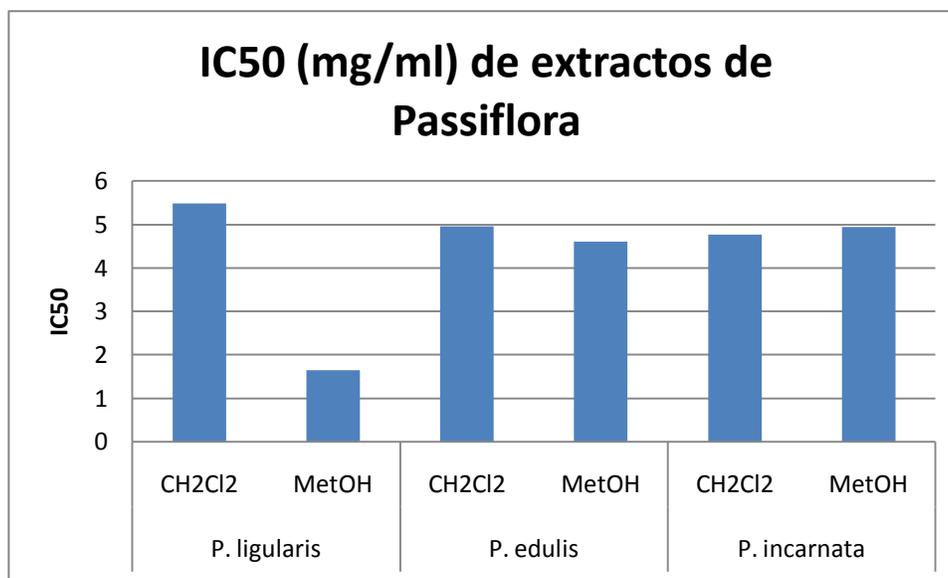
(Anexo # 5 Foto de la cromatografía en capa fina)

Tabla # 8 Determinación de la actividad antioxidante por medio de reactivo de DPPH
(Método macrométrico)

Especie	Extracto	Peso de Mx (g)	Volumen de reconstitución (ml)	Dilución empleada	Porcentaje de inhibición (%)	Determinación de la actividad antioxidante expresado como IC ₅₀ (mg/ml)
<i>P. ligularis</i>	CH ₂ Cl ₂	0.3079	15	1.75:5	65.16	5.48 ± 0.13
	MetOH	0.4041	20	0.7:5	64.95	1.65 ± 0.07
<i>P. edulis</i>	CH ₂ Cl ₂	0.2114	10	1.4:5	59.03	4.96 ± 0.03
	MetOH	0.4022	20	1.5:5	63.87	4.61 ± 0.04
<i>P. incarnata</i>	CH ₂ Cl ₂	0.2024	10	1.5:5	66.42	4.77 ± 0.07
	MetOH	0.2074	10	1.5:5	62.45	4.95 ± 0.18
Trolox	Estándar	0.010	5	0.1	60.25	0.182
Vitamina E		0.011	5	0.18	65.45	0.2798
Vitamina C		0.2007	10	0.008	67.40	0.01285
Rutina		0.1005	5	0.012	65.57	0.02623
Quercetina		0.010	5	0.025	65.37	0.04146
TBHQ		0.010	5	0.08	68.71	0.1200

Fuente: Datos Experimentales (Anexo # 6 Fotos de cuantificación de actividad antioxidante por DPPH, y anexo # 7 Curvas de calibración de muestras y estándares por el método de DPPH)

Gráfica # 4 IC₅₀ de actividad antioxidante de especies de *Passiflora* determinado por medio de DPPH (Método macrométrico)



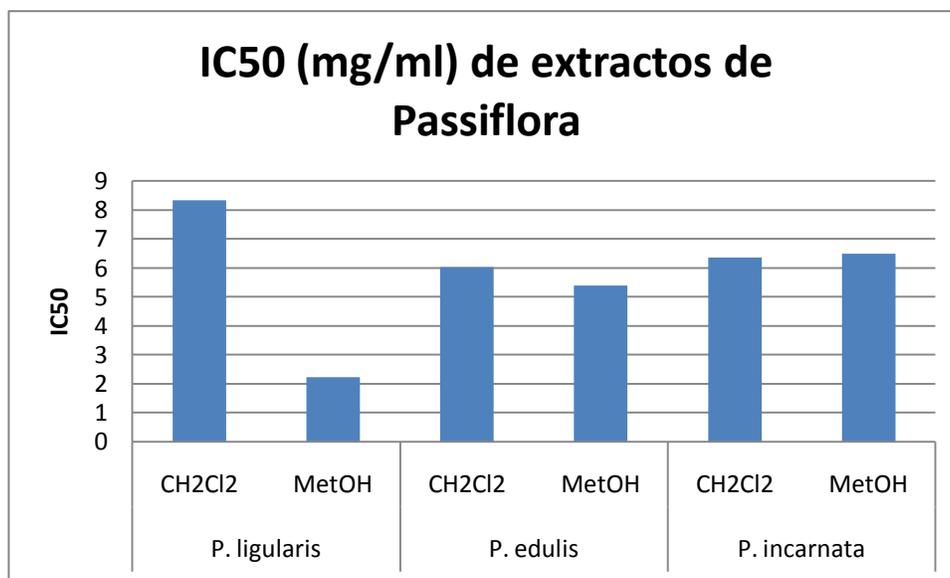
Fuente: Datos Experimentales

Tabla # 9 Determinación de la actividad antioxidante por medio de reactivo de ABTS
(Método macrométrico)

Especie	Extracto	Peso de Mx (g)	Volumen de reconstitución (ml)	Dilución empleada	Porcentaje de inhibición (%)	Determinación de la actividad antioxidante expresado como IC ₅₀ (mg/ml)	Equivalentes de actividad antioxidante de Trolox (mmol/g)
<i>P. ligularis</i>	CH ₂ Cl ₂	0.2074	10	3:5	66.06	8.34 ± 0.20	2.40
	MetOH	0.4041	20	0.7:5	61.12	2.22 ± 0.04	12.39
<i>P. edulis</i>	CH ₂ Cl ₂	0.4064	20	2.0:5	64.46	6.03 ± 0.05	3.56
	MetOH	0.4025	20	2.0:5	61.27	5.39 ± 0.08	4.97
<i>P. incarnata</i>	CH ₂ Cl ₂	0.4042	20	2.0:5	63.15	6.35 ± 0.07	3.03
	MetOH	0.4099	20	2.5:5	69.33	6.49 ± 0.15	3.82
Trolox	Estándar	0.010	5	0.04	78.17	0.2726	-----
Vitamina E		0.021	10	0.24	59.96	0.3846	-----
Vitamina C		0.010	5	0.012	61.13	0.0201	-----
Rutina		0.040	20	0.4	67.79	0.4232	-----
Quercetina		0.010	5	0.07	61.64	0.1136	-----
TBHQ		0.010	5	0.24	60.59	0.1992	-----

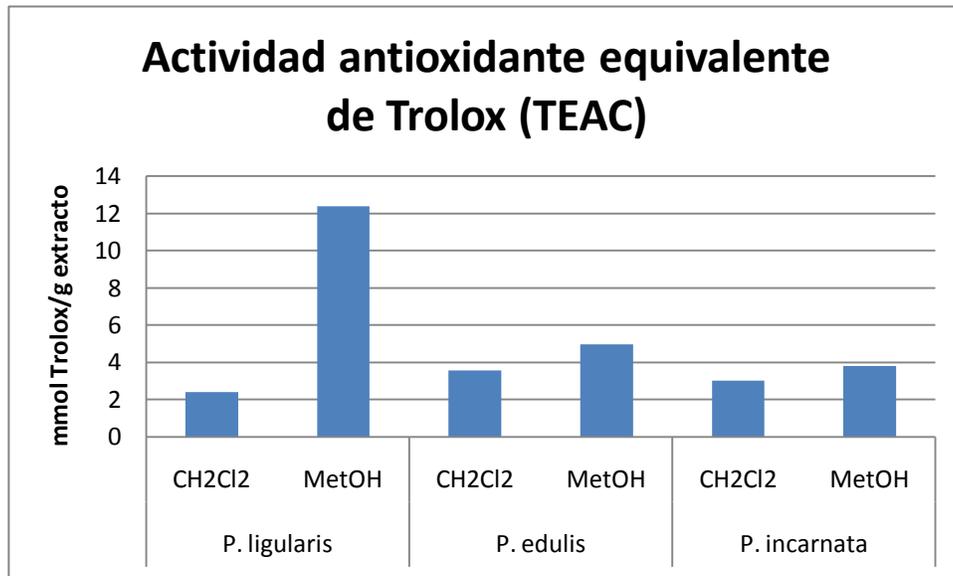
Fuente: Datos Experimentales (Anexo # 8 Fotos de cuantificación de actividad antioxidante por ABTS, y anexo # 9 Curvas de calibración de muestras y estándares por el método de ABTS)

Gráfica # 5 IC₅₀ de actividad antioxidante de especies de *Passiflora* determinado por medio de ABTS (Método macrométrico)



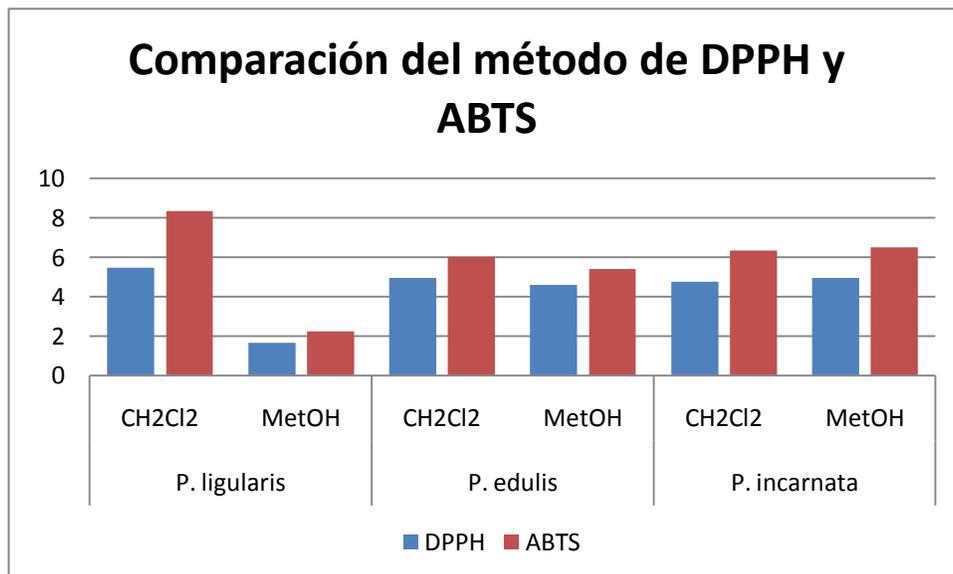
Fuente: Datos Experimentales

Gráfica # 6 Comparación de la Actividad antioxidantes de equivalentes de Trolox en cada uno de los extractos.



Fuente: Datos Experimentales

Gráfica # 7 Comparación de IC₅₀ de actividad antioxidante mediante el método de DPPH y ABTS



Fuente: Datos Experimentales.

Tabla # 10 Resumen resultados obtenidos de actividad antioxidante y cuantificaciones de metabolito en especies de *Passiflora*

Especie	Extracto	Porcentaje de rendimiento de la extracción	Identificación de flavonoides		Cuantificación de Metabólitos secundarios			Determinación de la Actividad Antioxidante			
			Pruebas macrométricas (Tubos)	Pruebas cualitativas (CCF)	Flavonoides mg rutina/g material vegetal	Flavonoides mg vitexina/g material vegetal	Fenoles totales µg de ácido gálico/g de extracto	Cromatografía en Capa Fina	DPPH Cl ₅₀ (mg/ml)	ABTS Cl ₅₀ (mg/ml)	TEAC (mmol/g)
<i>P. ligularis</i>	CH ₂ Cl ₂	2.47	Positivo	Positivo	6.86 ± 0.10	11.2 ± 0.5	30.80 ± 2.49	++	5.48 ± 0.13	8.34 ± 0.20	2.40
	MetOH	8.88					31.93 ± 1.67	+++	1.65 ± 0.07	2.22 ± 0.04	12.39
<i>P. edulis</i>	CH ₂ Cl ₂	5.11	Positivo	Positivo	4.86 ± 0.12	13.1 ± 0.3	17.28 ± 1.70	++	4.96 ± 0.03	6.03 ± 0.05	3.56
	MetOH	9.71					11.73 ± 1.08	+++	4.61 ± 0.04	5.39 ± 0.08	4.97
<i>P. incarnata</i>	CH ₂ Cl ₂	4.79	Positivo	Positivo	10.51 ± 0.15	23.6 ± 0.5	14.00 ± 1.85	+++	4.77 ± 0.07	6.35 ± 0.07	3.03
	MetOH	16.02					22.38 ± 1.40	+++	4.95 ± 0.18	6.49 ± 0.15	3.82
				Media	7.41	15.97	21.35		4.40	5.80	5.03
				Coefficiente de variación	0.68	1.29	0.32		1.38	2.01	2.17

Fuente: Datos Experimentales

9. Discusión de Resultados

Se ha reportado que la actividad antioxidante en plantas se le atribuye a ciertos metabolitos secundarios como caratenoides, polifenoles como flavonoides; entro otros (Cantrell, 2003, 47; Sthal, 2003, 345; Girgin, 2004, 215); al elaborar las monografías de cada uno de las especies de *Passiflora* estudiada (*P. ligularis*, *P. edulis* y *P. incarnata*) se pudo observar que dentro de su composición química se encuentran varios de estos metabolitos por lo que se evaluó la posible actividad antioxidante de extractos polares y apolares de las especies. (Anexo 1 se encuentran las fichas técnicas de cada una de las especies)

En la tabla # 1 se indica la procedencia del material vegetal, la cual fue recolectada en diferentes partes del territorio nacional, se recolectó para el estudio las hojas de cada una de las especies, dos de las especies fueron colectadas en Suchitepéquez y una proviene de Chimaltenango, las especies son nativas de nuestro país y los frutos son comestibles y empleados en el comercio de las regiones en donde se cultivan.

Los extractos que se obtuvieron de cada especies fueron polares (extractos de metanol) y apolares (extractos de diclorometano), esto para analizar la actividad antioxidante dependiendo de la polaridad de los metabolitos. En la tabla # 2 y gráfica # 1 se observan los porcentajes de rendimientos de cada extracto, en donde los mayores rendimientos se obtuvieron con el metanol en todas las especies. El mayor porcentaje de rendimiento de extracto de metanol se obtuvo en *P. incarnata*, después en *P. edulis* y por último *P. ligularis*. Por otra parte con los extractos de diclorometano el mayor rendimiento fue con *P. edulis*, después *P. incarnata* y por último *P. ligularis*. Con esto se puede determinar que la mayor cantidad de metabolitos presentes en las especies tiene características polares y por ello fueron arrastrados por el metanol.

Entre los metabolitos a los cuales se les atribuye una posible actividad antioxidante están los flavonoides, las referencias bibliográficas de cada una de las especies indican la presencia de flavonoides; es por ello que se analizó la presencia de dicho metabolito en las especies por pruebas cualitativas. En la tabla # 3 se reportan los resultados de las pruebas en tubo, con cada uno de los reactivos para la determinación de flavonoides, para todas las especies con cada resultado se obtuvieron resultados positivos lo que indica efectivamente la presencia de flavonoides en cada una de las especies. Las pruebas en tubos indican la presencia de flavonoides, por lo que se realizó la cromatografía en capa fina de flavonoides para poder identificar los

posibles flavonoides presentes según estándares empleados; en la tabla #4 se puede observar los resultados de la cromatografía en capa fina, en donde se compara a cada una de las muestras con 4 estándares de flavonoides y en base al color de cada banda y relacionando el Rf, se puede tener una idea del posible flavonoides presente en las especies. Al observar los resultados de *P. ligularis* se determinaron 3 bandas de color amarillo y verde, que son colores relacionados con la presencia de flavonoides, al ver el color sí coincide con los estándares pero los Rf no, por lo que los flavonoides detectados no tiene relación con los estándares empleados esto indica que los flavonoides presentes en las especies son diferentes. Por otra parte la *P. edulis* presentó 4 bandas de las cuales hay dos amarillas que coinciden en color y Rf muy parecidos con el estándar de quercetina y rutina, esto indica que esta especie tiene presente estos flavonoides además de otros dos que no fueron posibles identificar. Por último la *P. incarnata* también presentó 4 bandas de flavonoides de las cuales una coincide en color y Rf parecido con rutina, lo que indica la posible presencia de este flavonoide en esta especie. Los resultados obtenidos coinciden con lo que se reporta en la ficha técnica de cada especie.

Se realizó la cuantificación de flavonoides debido a que estos metabolitos pueden estar relacionados con una actividad antioxidante; además se cuantificó fenoles totales ya que también se ha relacionado a compuestos con estructuras fenólicas con la actividad antioxidante. En la tabla # 5 y gráfica # 2 se encuentran los resultados de la cuantificación de flavonoides en base a rutina en la cual el mayor porcentaje se encontró en *P. incarnata* con un valor de 10.51%, esto indica que hay 10.51mg de rutina en 1g de material vegetal; la segunda con mayor cantidad fue *P. ligularis* y el que menor cantidad presentó fue *P. edulis*. Se puede observar que esto mantiene cierta relación con el porcentaje de rendimiento de los extractos de metanol, ya que este metabolito tiene propiedades polares, y se encontró en mayor proporción en *P. incarnata* misma especie que dio el mejor porcentaje de rendimiento en extracto metanólico. Así mismo en dicha tabla y gráfica se pueden observar la cuantificación de flavonoides en base a vitexina, el cual es el flavonoide que se reporta en la farmacopea española para la especie de *P. incarnata*, en dicha farmacopea indica que la especie no debe presentar menos de 1.5% de flavonoides expresados como vitexina; como se observa en la tabla # 5 el porcentaje de vitexina si cumple con lo establecido en la farmacopea, además es la especie de *Passiflora* que mayor cantidad presentó. Al comparar la cuantificación de flavonoides en base a rutina y vitexina, es muy notorio que las tres especies de *Passiflora*

analizadas presentan mayor cantidad de flavonoides como vitexina; esto indica que dicho flavonoide es el representativo de las especies de flavonoides.

En cuanto a la cuantificación de fenoles totales se puede observar la tabla # 6 y gráfica # 3 que la especie de *P. ligularis* en ambos tipos de extractos presentaron la mayor cantidad de fenoles totales, lo hace sospechar que la actividad antioxidante en dichos extractos puede estar presente; por otra lado la cantidad de fenoles totales en las especies de *P. edulis* y *P. incarnata* se comportaron de forma diferente, ya que el metanólico de *P. incarnata* presentó mayor cantidad de fenoles totales que el de *P. edulis*; pero en los extractos de diclorometano fue diferente ya que el de *P. edulis* presentó mayor cantidad de fenoles totales que en *P. incarnata*. Con esto se puede observar que la distribución de fenoles totales en cada una de las especies es diferente, así como las características de polaridad de los compuestos fenólicos en cada especie. Además se pudo observar que en las especies de *P. ligularis* y *P. incarnata* los extractos de metanol presentaron mayor cantidad de fenoles totales que los de diclorometano, mientras que en *P. edulis* fue lo contrario, presentó mayor cantidad de fenoles totales en el extracto apolar que en el polar.

La actividad antioxidante se evaluó por medio de tres métodos, uno cualitativo y dos cuantitativos; el primero en realizarse fue el cualitativo ya que si los extractos de las especies no presentaban actividad antioxidante de forma cualitativa no se realizaría la cuantificación, ya que se determinaría desde un inicio que la especie no presentaba actividad antioxidante. En la tabla # 7 se pueden observar los resultados cualitativos, el cual se realizó con el método de la cromatografía en capa fina con revelador DPPH, en donde los resultados cualitativos de actividad antioxidante fueron positivos para todos los extractos de las tres especies, comparándose con cuatro estándares: quercetina, rutina, β -caroteno y terbutilhidroquinona (TBHQ) los cuales también dieron actividad positiva. Estos estándares son en su mayoría metabolitos secundarios de plantas que pueden estar presentes en los extractos de las plantas y pueden estar relacionados con la actividad que presenten los extractos de las diferentes especies; y el TBHQ es un antioxidante sintético.

Los métodos cuantitativos empleados fueron dos la espectrofotometría con 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) que sirvió para la detección de moléculas de tipo polar; y el ensayo de decoloración de radical catiónico del reactivo ácido 2,2-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), este permite la cuantificación de moléculas de tipo polar. En la tabla # 8 y gráfica # 4 se observan los resultados de la actividad antioxidante por el método de DPPH, se expresaron

los resultados por el IC_{50} (mg/ml) que indican la concentración que inhibe el 50% de los radicales que forman la oxidación, para la determinación del IC_{50} se empleó la ecuación de la recta para cada extracto, elaborada a partir de diferentes diluciones de cada extracto. Se determinó que la mejor actividad antioxidante lo presentaron los extractos de metanol sobre los de diclorometano, de ellos el extracto de metanol de *P. ligularis* fue el que mejores resultados presentó, ya que inhibieron el 50% de los radicales de oxidación con la cantidad más pequeña de extracto. Después el que mejor actividad presentó fue el extracto metanólico de *P. edulis* y el que menor actividad presentó fue *P. incarnata*. Por otra parte los extractos de diclorometano presentaron menor actividad en comparación con los de metanol; en ellos la mejor actividad la presentó *P. incarnata*, después *P. edulis* y la de menor actividad fue *P. ligularis*; esto demuestra que la distribución de compuestos con actividad antioxidante es diferente entre los extractos de la misma especie. Al comparar los resultados de los extractos con los estándares de referencia se puede observar que los estándares presentan una actividad antioxidante muy superior a los extractos analizados.

En la tabla # 9 y gráfica # 5 se observan los resultados de la actividad antioxidante medida en base al método de ABTS expresándolos también en base al IC_{50} (mg/ml) para determinarlo se empleo la ecuación de la recta para cada extracto, elaborada a partir de diferentes diluciones de cada extracto. Con este método se pudo observar que se detectó una menor actividad antioxidante en los extractos que con el método de DPPH; esto indica que los compuestos con características apolares que están presentes en cada uno de los extractos no presentan mucha actividad antioxidante en comparación con los compuestos con características polares. En la determinación por este método también se observó que la mayoría de los extractos de metanol presentaron mejor actividad antioxidante que los extractos de diclorometano, a excepción con *P. incarnata* que el extracto de diclorometano presentó una ligeramente mayor actividad antioxidante que el extracto de metanol. Entre los extractos de metanol que mejor actividad antioxidante mostró fue el de *P. ligularis*, después el de *P. edulis* y por último el de *P. incarnata*. Por otra parte de los extractos de diclorometano el que mejor actividad presente fue el de *P. edulis*, seguido del de *P. incarnata* y por último el de *P. ligularis*. Al analizar los estándares en base a este método se puede observar que los mismos presentaron mejor actividad antioxidante que los extractos.

Así mismo en la tabla # 9 y gráfica # 6 se observan los resultados de la actividad antioxidante de los extractos en base a equivalentes de Trolox (TEAC), el Trolox es una sustancia antioxidante de

referencia. Al comparar los extractos de diclorometano y metanol, los de metanol en todas las especies presentaron los mayores equivalentes de Trolox, lo que confirma que los resultados de IC_{50} , los cuales indicaban una mejor actividad en los extractos de metanol que en los de diclorometano. Se pudo observar que la cantidad más elevada de TEAC se encontró en *P. ligularis* en el extracto de metanol, mismo extracto que reportó los mejores resultados de actividad antioxidante en base al IC_{50} , con ambos métodos de cuantificación. Con esto se puede determinar que el extracto de metanol de dicha especie presenta el mayor número de equivalentes de Trolox para una actividad antioxidante. Por otra parte la mejor cantidad de equivalente de Trolox se reportó en el extracto de diclorometano de *P. ligularis*, mismo extracto que presentó la menor cuantificación de actividad antioxidante en ambos métodos según el IC_{50} . Con esto se puede observar la relación que se mantiene de la actividad antioxidante calculada en base a los IC_{50} y los resultados de TEAC.

Se puede observar que las diferentes especies de *Passiflora* presentaron una mejor actividad antioxidante con el método que detecta compuestos con más características polares; como se observa en la tabla # 10 se encuentra un resumen de todos los resultados obtenidos, en el cual destaca que los extractos de metanol presentaron los mejores resultados en cuanto a cuantificación de fenoles totales y la cuantificación de actividad antioxidante en ambos métodos. De las tres especies la de *P. ligularis* fue la que mejores resultados presentó en sus extractos metanólicos dando la mayor cantidad de fenoles totales y se encontró la mejor actividad antioxidante por ambos métodos, pero con el método de DPPH se obtuvieron mejores resultados; esto indica que los metabolitos que le dan propiedades antioxidante tienen características polares. Por otro lado el extracto de metanol de *P. incarnata* fue el que menor actividad antioxidante presentó en ambos métodos. Por lo contrario los extractos de diclorometano que mejores resultados dieron fueron los de *P. incarnata*, esto indica que en esta especie la actividad antioxidante se encuentra en sus metabolitos con características apolares. Y el extracto de diclorometano de *P. ligularis* fue el que presentó la menor actividad antioxidante; por otra parte, ambos extractos de *P. edulis* se encontraron siempre segundos en demostrar la mejor actividad antioxidante, siendo mejor el extracto de metanol. Esto indica que entre las especies de *Passiflora* estudiadas presentan diferentes metabolitos con características polares o apolares, y que las mismas presentan actividad diferente entre las especies estudiadas. La comparación de la actividad antioxidante de

los dos tipos de extractos estudiados en los dos métodos de cuantificación se puede observar en la gráfica # 7.

Se han realizado en varios países estudios sobre la actividad antioxidante de *P. edulis*, en Perú, Japón, Polonia, en dichos países determinaron la actividad antioxidante en extractos clorofórmicos, de éter de petróleo y en el jugo de la fruta; en dichos estudios encontraron un IC_{50} de 0.051-0.058mg/ml por el método de DPPH; al observar estos resultados y compararlos con los obtenidos en la investigación se puede notar que los extractos de metanol y diclorometano obtenidos de la especie colectada en nuestro país presenta una menor actividad antioxidante ya que se determinó un IC_{50} 4.61-4.96mg/ml, respectivamente para cada extracto. Esta diferencia se puede deber a que se emplearon extractos diferentes, particiones que permiten un aislamiento selectivo de metabolitos, por lo que en las particiones analizada en los otros estudios pudieron aislar de interferentes a los metabolitos y por ello se presentó una mejor actividad antioxidante en dichos estudios. Además de las diferencias en los metabolitos que se pueden presentar en las plantas por el área de cultivo, época de colecta y entre otros factores.

10. Conclusiones

- 10.1. Se determinó que las especies presentan metabolitos que se han relacionado con la actividad antioxidante como lo son flavonoides y otros polifenoles.
- 10.2. Las pruebas macrométricas, en tubos, para la detección de flavonoides en las especies fueron positivas con todos los reactivos para la determinación de flavonoides, lo que indica que hay presencia de flavonoides en las tres especies de *Passiflora*. Así mismo, la cromatografía en capa fina permitió detectar la presencia de diferentes flavonoides en las especies de *Passiflora*, se detectó la presencia de quercetina en *P. edulis*.
- 10.3. Se determinó que todos los extractos en estudios presentaron actividad antioxidante por el método de DPPH en cromatografía en capa fina.
- 10.4. Los mejores resultados de actividad antioxidante por el método de cuantitativo de DPPH los presentaron los extractos metanólicos de *P. ligularis*, *P. edulis* y el extracto de diclorometano de *P. incarnata* con un IC₅₀ de 1.65mg/ml, 4.61mg/ml y 4.77mg/ml respectivamente; por otra parte el extracto que menor actividad presentó fue el de diclorometano de *P. ligularis* con un IC₅₀ de 5.48mg/ml.
- 10.5. El método ABTS sirve para la detección de actividad antioxidante para compuestos que presentan más características apolares, con este método los mejores resultados se presentaron con los extractos metanólicos de *P. ligularis*, *P. edulis* y el extracto de diclorometano de *P. edulis* con un IC₅₀ de 2.22mg/ml, 5.39mg/ml y 6.03mg/ml respectivamente; por otra parte el extracto que menor actividad presentó fue el de diclorometano de *P. ligularis* con un IC₅₀ de 8.39mg/ml.
- 10.6. *P. incarnata* presentó la mayor cantidad de flavonoides expresados como rutina (10.51%), seguida de *P. ligularis* (6.86%) y la más baja *P. edulis* (4.86%). Con la cuantificación de los flavonoides en base a vitexina, que es el representativo de las especies de *Passiflora*, la cuantificación de flavonoides en base a vitexina presentó mayor cantidad *P. incarnata*.

- 10.7. En la cuantificación de flavonoides en base a vitexina, flavonoide característico de la especie de *Passiflora*, la mayor cantidad la presentó *P. incarnata*.
- 10.8. La mayoría de extractos de metanol fueron los que mayor cantidad de fenoles totales presentaron, siendo los dos mayoritarios los extractos de metanol y de diclorometano de *P. ligularis* con 31.93 $\mu\text{g/g}$ y 30.80 $\mu\text{g/g}$ respectivamente; el extracto de metanol de *P. incarnata* presentó 22.38 $\mu\text{g/g}$. La cantidad más baja de fenoles totales se encontró presente en el extracto de metanol de *P. edulis* con 11.73 $\mu\text{g/g}$.
- 10.9. *Passiflora ligularis* fue la especie que mejores resultados mostró durante el estudio, ya que presentó la mayor cantidad de fenoles totales y sus extractos metanólicos en ambos métodos de cuantificación presentaron los mejores resultados de actividad antioxidante.
- 10.10. Los extractos de metanol de las especies de *Passiflora* presentaron los mayores equivalentes de Trolox en actividad antioxidante, lo cual tiene relación con los IC_{50} determinados por los métodos de DPPH y ABTS.
- 10.11. El extracto de metanol de *P. ligularis* presentó la mayor cantidad de equivalentes de Trolox de actividad antioxidante de 12.39mmol de Trolox/g de extracto, lo cual tiene relación con la actividad antioxidante en base al IC_{50} , ya que dicho extracto dio los mejores resultados.
- 10.12. El mejor rendimiento de extracto se obtuvo con el extracto metanólico de *P. incarnata* 16.02%; así mismo, el rendimiento más bajo de extracto se obtuvo con el extracto de diclorometano de *P. ligularis* 4.93%.

11. Recomendaciones

- 11.1. Para *Passiflora ligularis*, que fue la especie estudiada con mejores resultados de actividad antioxidante, realizar otro tipo de particiones y en ellos evaluar la actividad antioxidante; ya que con estas particiones se estarían seleccionando determinados metabolitos en cada extracto y con ello se potencializaría la actividad antioxidante que presenta la especie.
- 11.2. Analizar otras partes de la planta para determinar si la distribución de metabolitos es la misma que en las hojas y si presenta actividad antioxidante.
- 11.3. Emplear otros métodos de detección de actividad antioxidante, que no se basen en el secuestro de radicales libres, como lo puede ser la peroxidación del ácido linoleico o reducción de hierro.
- 11.4. Evaluar el posible uso de *P. ligularis* como preservante en formulaciones cosméticas.
- 11.5. Estudiar la actividad antioxidante en el fruto de estas especies, ya que el mismo es consumido como alimento en el territorio nacional.
- 11.6. Realizar otros estudios de actividad biológica para las diferentes especies de *Passiflora*.

11. Referencias

1. Brigelius-Flohé R, Traber M. 1999. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* 13: 1145–1155.
2. Bruneton, J. 1995. Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales. Intercepción, Ltd., Hampshire, Inglaterra.
3. Cáceres, A. 1996. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria. Colección de Monografías. Volumen No. 1. Universidad de San Carlos de Guatemala.
4. Cantrell, A., McGarvey, D.J., Truscott, T. G., Rancan, F. and B€ohmb, F. 2003. Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment *Archives of Biochemistry and Biophysics* 412: 47–54.
5. Chang. et.al. 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *PlantScience. ELSEVIER.* 7: 1161-1168.
6. Chatterjee, S. , Niaz, Z., Gautam, S., et al. 2006. Antioxidant activity of some phenolic constituents from green pepper (*Pipper nigrum* L.) and fresh nutmeg mace (*Myristica fragans*). Food Technology Division, Bhabha Atomic Research Centre. Mumbai, India.
7. Chaudière J, Ferrari-Iliou R. 1993. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol.* 37: 9–10, 949 – 962.
8. Córdova D., Menéndez C., et. al. Determinación y Cuantificación de la actividad antioxidante de especies nativas y su posible fuente para el desarrollo de nutricoséuticos. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Licenciatura de Química Farmacéutica. Guatemala agosto de 2009.
9. Dhawan K, Sharma A. 2002. Antitussive activity of the methanol extract of *Passiflora incarnata* leaves. *Fitoterapia.* 5:397-399.
10. German. 1999. J Food processing and lipid oxidation *Adv Exp Med Biol.* 459: 23–50.
11. Girgin, F. and Yildirim, E. 2004. Anti-inflammatory effects of dietary antioxidants. *Curr. Med. Chem.* 3:19-30.
12. Gudiel Lesly. Evaluación Fitoquímica y actividad antioxidante de *Polypodium triseriale* SW. (calahuala). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Licenciatura de Química Farmacéutica. Guatemala octubre de 2009.

13. Halliwell, B., Rafter, J. and Jenner, A. 2005. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?. *Am J Clin Nutr.* 81: 268S–76S.
14. Herrera E, Barbas C. 2001. Vitamin E: action, metabolism and perspectives *J Physiol Biochem.* 57: 43 – 56.
15. Imark Christian, et.al. 2000. Occurrence and activity of natural antioxidants in herbal spirits. *Innovative Food & Emerging Technologies.* ELVEVIER.6: 239-243.
16. Imlay J. 2000. Pathways of oxidative damage *Annu Rev Microbiol.* 57: 395–418.
17. Jacob R. 1995. Three eras of vitamin C discovery *Subcell Biochem.* 25: 1–16.
18. Juceni. et.al. 2007. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian *Caatiga* plants. *Fitoterapia,* ELVEVIER. 7: 215-218.
19. Knight J. 2001. Free radicals: their history and current status in aging and disease *Ann Clin Lab Sci.* 28: 331-46.
20. Krenn L. 2002. Passion Flower, *Passiflora incarnata* L. a reliable herbal sedative. *Wien Med Wochenschr;* 152:404-406.
21. Kuklinski, C. 2000. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentadas de origen natural. Barcelona, Omega 515.
22. Lock O. 1988. Investigación Fitoquímica. 2da edición. Perú: Universidad Pontifica Católica. 300.
23. Lutomski, J. 1960. Pasiflora incarnata L. Alkaloidy. Tesis, Instituto de Investigación de Plantas Medicinales, Pozán.
24. Lutomski, J., et al. 1975. Farmacoquímicas investigación de las materias primas de género *Passiflora*. 2. La estimación farmacoquímicas de jugos de los frutos de *Passiflora edulis* y *Passiflora edulis flavicarpa* forma." *Planta Med.* 27: 112-121.
25. Marwah, R., Fatope, M., Mahrooqi, R., et al. 2005. Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. Department of Chemistry. College of Science. Sultan Qaboos University. Arabia.
26. Mathew, S., Abraham, E. 2005. In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. Bioactive Polymer Engineering Section. Chemical Science Division. Regional Research Laboratory. Kerala, India.

27. Matill HA. 1947. Antioxidants. *Annu Rev Biochem* 16: 177–192.
28. Montero, M. 2007. Los radicales libres y las defensas antioxidantes. Editorial Ciencias Médicas. España. 1:54
29. Moreau and Dufraisse. 1992. *Comptes Rendus des Séances et Mémoires de la Société de Biologie*. **86**: 321.
30. Okonogi, S. *et.al.* 2007. Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. Chiang Mai University. Tailandia. Elsevier Ltd. 839-846.
31. Om P. Sharma. 2008. Revisión de ensayo antioxidante de DPPH. *ELSEVIER*. 2:154-160.
32. Pellegrini Nicoleta. 1998. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *ELSEVIER*.9:146-150
33. Plantas Medicinales Iberoamericanas. Mahabir P. Gupta Editos. 2008. Centro de Investigaciones Farmacognósticas de la Flora Panameña. Facultad de Farmacia Universidad de Panamá. Republica de Panama.
34. Ravishankara, *et.al.* 2002. Evaluation of antioxidant properties of root bark of *Hemidesmus indicus* R. Br. (Anantmul). Urban & Fischer Verlag. *Phytomedicine*. 9: 153-160.
35. Re, R. *et.al.* 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. International Antioxidant Research Center, Guy's, King's and St Thomas' School of Biomedical Sciences, Kings College-Guy's Campus. London, UK. *Free Radical Biology & Medicine*. USA. Elsevier Science Inc. 26: 1231-1237.
36. Real Farmacopea Española 2002. Segunda edición, Madrid. Ministerio de Sanidad y Consumo. 2801, 567, 549.
37. Ripa. *Et.al.* 2009. Antibacterial, Cytotoxic and Antioxidant Activity of *Passiflora edulis Sims*. *European Journal of Scientific Research* 31:592-598
38. Roginsky, V. 2003. Chain-breaking antioxidant activity of natural polyphenols as determined during the chain oxidation of methyl linoleate in Triton X-100 micelles. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414: 261–270.
39. Santa C. Manual Selección fitoquímica. Guía práctica para los laboratorios de Química de Productos Naturales y Fitoquímicas. USAC. Guatemala 92.
40. Sen C, Khanna S, Roy S. 2006. Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. *Life Sci*. 78: 2088 –2098.

41. Sharapin, N. 2000. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Cooperación Iberoamericana, Santafé de Bogotá, D.C. Colombia. 205-208, 247.
42. Sies H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem.* 215: 213–219.
43. Sies H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 82: 291-5.
44. Soobrattee, M. A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruomab, O.I. and Bahorun, T. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research* 579: 200–213.
45. Stahl, W. And Sies, H. 2003. Antioxidant activity of carotenoids *Molecular Aspects of Medicine* 24: 345–351.
46. STANDLEY, PC & L.O. WILLIAMS. 1970. Flora de Guatemala. USA. Fieldana Botany. Volumen 24. Parte 9.
47. Stohs S, Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions *Free Radic Biol Med.* 18: 321-336.
48. Toit Rene, et.al. 2001. Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as Vitamin C equivalents. *Toxicology ELSEVIER.* 4: 63-69.
49. Vademécum Nacional de Plantas Medicinales. 2007. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Guatemala.
50. Van Haaften, R., Haenen, G. Evelo, C. and Bast, A. 2003. Effect of Vitamin E on Glutathione-Dependent Enzymes. *Drug Metabolism reviews* 35: 215–253.
51. Vasco Catalina. 2008. El total de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de los frutos importantes de Ecuador. *ELSEVIER.* 22:167-170
52. Vaya, J. and Aviram, M. 2001. Nutritional Antioxidants: Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications *Curr. Med. Chem.* 1: 99-117.
53. Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. 2004. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr Pharm Des.* 10: 1677–1694.
54. Vila, R y Reig, M. 2003. Métodos de control de calidad. Manaus, UB Virtual, Imicromat. 39.
55. Wagner H, Blatt S., 1984. Plant Drug Analysis a thin layer chromatography Atlas. Belin Heidelberg New York Tokyo. 299-301.
56. Wang X, Quinn P. 1999. Vitamin E and its function in membranes» *Prog Lipid Res.* 38: 309 – 336.
57. WHO. 1998. Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva: WHO. 115.

58. Wolf G. 2005. The discovery of the antioxidant function of vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill *J Nutr.* 135: 363-6.

X. Anexos

1. Fichas técnicas de las especies en estudio

1.1. *Passiflora ligularis* Juss

Nombres comunes:

Granadilla, Carnal, Cranix, Granadilla real (Cáceres, 1996)

Esquema:



Descripción Botánica:

Es una enredadera larga, glabra; tallo recto, terete; estipulas ovado lanceoladas, 1-2.5cm de largo, agudas o acuminadas, delgadas a la base, enteras o serradas; pecíolos 4-10cm de largo, con 4-6 glándulas filiformes, 3-10mm de largo. Hojas anchamente ovadas, 8-19cm de largo, acuminadas, cordadas, cordadas a la base, enteras, membranosas. Flores 6-9cm de ancho, cáliz tubular campanulado; sépalos ovado-oblongos, 2.5-3.5cm de largo, agudos, verde por fuera blancos por dentro. Fruto ovoide, 6-8cm de largo, pericarpio amarillo, grueso, pulpa dulce. Semillas delgadas, 6mm de largo, tridentazas en el ápice (Cáceres, 1996, Standley, 1970; VNPM, 2007).

Hábitat:

Es nativa de las montañas de Guatemala, se encuentra en bosques mixtos, húmedos o secos, desde el sur de México, Centro y Sur América, en alturas de 900-1500msnm. En Guatemala se

ha descrito o se cultiva en Alta Verapaz, Chimaltenango, Huehuetenango, Jalapa, Quetzaltenango, Sacatepéquez, San Marcos y Suchitepéquez (Cáceres, 1996; VNPM, 2007).

Historia:

Género de más de 350 especies de la América tropical, 42 especies descritas en Guatemala; los exploradores españoles se impresionaron por la forma de la flor ya que creyeron ver los clavos, martillos y otros instrumentos de la crucifixión, de allí el nombre de “pasionaria” o “flor de la pasión”; desconocida en tiempos bíblicos la primera referencia a su nombre data de 1610. Ampliamente distribuida en América desde tiempos precolombinos por su fruto. Fue introducida en Hawaii a finales del siglo XIX y recientemente en Haití donde se ha aclimatado bien; se intentó su aclimatación en Israel pero fue infructuoso por el frío (Cáceres, 1996).

Agricultura:

Crece en suelos finos, volcánicos, de clima templado en regiones elevadas, no se le conocen variedades. Pueden propagarse por semillas o esquejes; para su desarrollo se requiere de un soporte que permita a la enredadera trepar. Se produce una sola cosecha al año. Los frutos son comidos por las ardillas y las semillas son devoradas por roedores. Las hojas tiernas se colectan durante la fructificación y se secan inmediatamente a la sombra; los frutos se colectan al madurar, pero a pesar de su epicarpio duro y grueso se deterioran rápidamente después de la cosecha (Cáceres, 1996).

Usos Medicinales Atribuidos:

El tallo y epicarpio del fruto se usan en decocción para tratar las afecciones digestivas (diarrea, disentería) y respiratorias (tos y catarro); el jugo del fruto se usa como sedante nervioso, en las afecciones hepáticas y para prevenir la fiebre amarilla. La infusión y tintura de las partes aéreas se usa para tratar hipertensión, diabetes, inflamación urinaria, anemia, paludismo, susto, afecciones gastrointestinales (diarrea, disentería, gastralgia, indigestión), respiratorias (tos, tuberculosis) y nerviosas (insomnio, nerviosismo); la decocción del fruto se usa como protector gástrico, contra litiasis biliar y rabia. La tintura se usa en homeopatía para el tratamiento de epilepsia (Cáceres, 1996; Mahabir, 2008).

Las hojas y tallos se usan en aplicación tópica en forma de baños en las afecciones de la piel y como cataplasma en hepatitis y cefalea. La tintura de las hojas se usa oral y tópicamente contra el dolor de cabeza. Las semillas se usan como sedante en los estados nerviosos.

Al fruto se le atribuye propiedades antihelmíntica, colagoga, diurética, emenagoga, emoliente, refrescante y tónico. A las hojas tiernas y flores se les atribuye propiedad analgésica, diurética, espasmolítica, estomáquica, sedante, vermífuga, antipirética, mucolítica y vulneraria. A las flores se les atribuye propiedad anodina, hipnótica y sedante (Cáceres, 1996; Mahabir, 2008).

Otros Usos Populares:

La pulpa fresca del fruto se come por su delicado sabor y sirve para preparar jugo, refrescos, helados y postres; el fruto verde se come cocido como vegetal. Algunas de las especies se cultivan en huertos y jardines como una enredadera decorativa. Los frutos son ampliamente vendidos en los mercados locales durante la época de fluctuación (Cáceres, 1996; Mahabir, 2008).

Farmacología:

Experimental.

Estudios antibacterianos demuestran que la tintura del fruto es inactiva contra enterobacterias (*S. enteritidis*, *S. Typha*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*); la tintura de las hojas es ligeramente activa contra *S. pneumoniae*, pero inactiva contra *S. aureus* y *S. pyogenes* (Cáceres, 1996).

La infusión de las hojas tiene actividad espasmolítica de tipo atropínico, pero no tienen actividad de tipo muscarínico (Cáceres, 1996).⁵¹

Composición Química:

La literatura revisada no reporta información fitoquímica sobre *P. ligularis* (Mahabir, 2008).

Al género se le atribuye la presencia de alcaloides (harmano) y flavonoides. La materia médica son las partes aéreas secas (Mahabir, 2008).

El análisis de 100g del fruto fresco contiene: 94 calorías, agua (76.3g), proteínas (2.4g), grasa (2.8g), carbohidratos (17.3g), fibra (4.2g), ceniza (1.2g), calcio (10mg), fósforo (64mg), hierro

(0.9mg), carotenos (40ug), riboflavina (0.4mg), niacina (1.5mg) y ácido ascórbico (20mg); el jugo de la pulpa contiene 51 calorías, agua (86.0g), proteínas (1.1g), carbohidratos (12.0g), fósforo (30mg) y niacina (2.1mg) (Mahabir, 2008).

Farmacognosia:

La materia médica son las partes aéreas secas, que deben reunir las mismas características fisicoquímicas y sanitarias de la materia prima usada para la elaboración de productos fitofarmacéuticos (Cáceres, 1996).

En la revisión de literatura realizada no se encontró información tendiente a su estandarización como materia prima o productos fitofarmacéuticos (Cáceres, 1996).

Toxicidad:

No se encontró información disponible sobre este tema (Cáceres, 1996).

Contraindicaciones:

Embarazo, lactancia e infancia (VNPM, 2007).

Precauciones y Reacciones Adversas:

Incompatible con bebidas alcohólicas (VNPM, 2007).

Indicaciones Terapéuticas:

No se encontró ninguna farmacopea y su indicación está basada en el uso popular, aunque sus propiedades no han sido confirmadas.

Pos sus propiedades analgésicas, espasmolíticas y sedantes está indicado su uso por vía oral en el tratamiento de ansiedad, hipertensión, migraña, neuralgia, convulsiones, histeria, insomnio, asma espasmódica, taquicardia nerviosa y trastornos climatéricos. El jugo se administra como colagogo y refrescante de la mucosa gástrica (Cáceres; 1996; VNPM, 2007; Mahabir, 2008).

Formas Galénicas/ Posología:

Administrar 2-3 veces/día después de las comidas durante 2-3 semanas en dosis de (VNPM, 2007):

- 0.25-1.0g/taza de infusión
- 0.5-1.0ml de extracto líquido 1:1 en alcohol 25%
- 0.5-2.0ml de tintura 1:8 en alcohol al 45%
- 1-4 cucharadas de jarabe por día.

1.2. *Passiflora edulis*:**Nombres Comunes:**

Maracuyá, granadilla silvestre (VNPM, 2007).

Esquema:**Descripción Botánica:**

Planta herbácea, glabra, estipulas lineales, enteras; pecíolos de 4cm de largo, bioglandulares en el ápice, hojas de 5-11cm de largo, trilobuladas, debajo de la mitad, redondeadas a la base, serradas; pedúnculos robustos; flores de 7cm de ancho; pétalos oblongos, obtusos, blancos; ovario ovoide, con finos vellos suaves y tupidos. Fruto ovoide globular, 4-5cm de largo, de color amarillo verdoso o púrpura, semillas ovaladas, 5-6mm de largo, 3-4mm de ancho con retículas diminutas (Standley, 1970; VNPM, 2007).

Hábitat:

Nativa del Brasil y norte de Argentina. Crece en climas subtropicales húmedos de 630-1300msnm. Raramente plantada en Guatemala en las tierras bajas de Ambos océanos y quizá se ha naturalizado ocasionalmente (VNPM, 2007).

Historia:

No se encontró información en la literatura consultada.

Agricultura:

Crece en suelos finos, volcánicos, de clima tropical húmedo. Se propaga por semillas o esquejes; para su desarrollo requiere de un soporte que le permita trepar. Se produce una sola cosecha al año. Las hojas y flores tiernas se colectan durante la fluctuación y se secan inmediatamente a la sombra; los frutos se colectan al madurar, a pesar de su epicarpio duro y grueso se deterioran rápidamente (VNPM, 2007).

Usos Medicinales Atribuidos:

La infusión de hojas y flores se usa oralmente para el tratamiento de bronquitis, asma, anemia, epilepsia, insomnio, hipertensión y otros estados nerviosos. Tópicamente se usa en las inflamaciones hemorroidales (VNPM, 2007).

Se le atribuye propiedad ansiolítica, sedante, diurética, febrífuga y antihipertensiva. El jugo del fruto se utiliza como bebida y para ictericia, dolores estomacales y tumores intestinales. Las semillas tienen un aceite fijo comestible (Standley, 1970).

Otros Usos Populares:

La fruta es tanto comestible como para la preparación de bebidas refrescantes (VNPM, 2007).

Farmacología:

El extracto etanólico de la planta entera no demostró actividad antiviral contra los virus de Coxsacke, Herpes tipo I, Sarampión, Polio tipo I y Semiliki (VNPM, 2007).

La administración de jugo de frutos en ratas produjo un efecto tranquilizante. El extracto acuoso de hojas demostró una potenciación del efecto producido por pentobarbital. El

extracto metabólico mostró actividad antiedema y el etanólico administrado IP en ratas mostró un efecto ansiolítico, aunque en estudios recientes la administración oral de varios extractos de hojas de *P. edulis* demostró actividad sedante y potenciación de barbitúricos pero no ansiolítica en comparación con el extracto de *P. incarnata* y diazepam (VNPM, 2007). El extracto etanólico de hojas frescas administrado a ratas por vía IG demostró un efecto cronotrópico negativo débil y un efecto diurético (VNPM, 2007).

Composición Química:

Diferentes partes de la planta presentan: alcaloides indólicos, aceites esencial (1,8 cineol, citronelal, acetato, citronelol, geraniol, hexanolactona, terpenos), saponinas, taninos, harmina, harmol, harmano, triptamina; varios sesquiterpenos, cumarina, ácidos cafeico, clorogénico, ciclopassiflorico y p-cumárico, hesperidina, pasiflorina, vitexina, quercetina, beta-sitosterol, estigmasterol, prunasina, compuestos azufrados, luteolina, glucósidos, umbeliferota, rutina, quercetina, passicol, edulan, dihidroedulan, neohesperidina y luteolina-6-C-fucósido (VNPM, 2007).

Los hallazgos sobre el principio activo responsable de la acción sedante son contradictorios, la actividad se ha atribuido al harmano, aunque éste es más bien un estimulante. Estudios por investigadores japoneses demostraron la presencia en la fracción alcaloide de un derivado de pirona (maltol) con propiedades sedantes en ratones. El harmano (loturina o pasiflorina) es un alcaloide indólico, prácticamente insoluble en agua, soluble en ácidos diluidos; se le atribuye propiedad analgésica y sedante (VNPM, 2007).

El flavonoide crisina aislado de las hojas tiene efecto ansiolítico, sedante y anticonvulsivante por su acción de ligando de receptores A del ácido gamma-aminobutírico (GABA) (VNPM, 2007).

Farmacognosia:

En la literatura consultada no se encontró información sobre este tema.

Toxicidad:

En la revisión de literatura y bases de datos no se encontró información toxicológica ni clínica de esta especie. La DL₅₀ del harmano por vía IP en ratón es de 50mg/Kg (VNPM, 2007).

Contraindicaciones:

Embarazo, lactancia e infancia; en algunos pacientes se puede presentar hipersensibilidad a la droga (VNPM, 2007).

Precauciones y Reacciones Adversas:

Incompatible con el uso de bebidas alcohólicas, antihistamínicos y sedantes. Evitar el uso prolongado y las dosis altas (VNPM, 2007).

Indicaciones Terapéuticas:

Por sus propiedades analgésicas, espasmolíticas y sedantes está indicada su uso por vía oral en el tratamiento de ansiedad, hipertensión, migraña, neuralgia, convulsiones, histeria, insomnio, asma espasmódica, taquicardia nerviosa, mialgia, dismenorrea y trastornos climatéricos (VNPM, 2007).

Formas Galénicas/Posología:

Administrar 1-2 tazas/día, en la noche durante 1-2 semanas en dosis de (VNPM, 2007):

- 1-3g/taza en infusión
- 0.5-1.0ml de extracto líquido 1:1 en alcohol 25%
- 0.5-2.0ml de tintura 1:8 en alcohol al 45%
- 1-4 cucharadas de jarabe.

1.3. *Passiflora incarnata*:**Nombres Comunes:**

Maracuyá, flor de pasión, granadilla, pasiflora, pasionaria, mburucuyá (Dhawan, 2002, 397)

Esquema:

Descripción botánica:

Hoja caduca, puede sobrevivir el invierno se congela y que comúnmente se llama maypop, así como flor de la pasión. Maypop es un rápido crecimiento de vid perenne que emplea zarcillos para agarrarse a los arbustos adyacentes, la estructura y otros apoyos a elevarse a las alturas de 8-12 pies (2.4-3.7 m). Las hojas dentadas grandes crecen en 5-6 (13-15 cm) de ancho por 6 a 8 en (15-20 cm) de largo. Suelen tener tres a cinco lóbulos y están dispuestas alternativamente en el tallo con flores y ramas que salen de la axila (la base del tallo de la hoja donde se inserta) (Dhawan, 2002, 397).

La flor tiene 2-3 en (5-7.6 cm) de diámetro y se componen de 10 tépalos blancos dispuestos en forma de cuenco poco profundo a partir del cual se organiza franja de filamentos de color púrpura y blanco, llamado corona. En el centro es el estigma blanco carnoso rodeado por cinco estambres (Krenn, 2002; Lutomski, 1960).

Hábitat:

Crece en áreas tropicales y semitropicales, en América del sur y Norte América (Krenn, 2002).

Historia:

Pasiflora fue “descubierta” por primera vez en el Perú por un médico español llamado Monardes en 1569 que documentó los usos indígenas y se lo llevó de vuelta al Viejo Mundo, donde se convirtió rápidamente en un favorito de té de hierbas relajantes y sedantes. Conquistadores españoles de México y América del Sur también aprendieron su uso de los indios aztecas y con el tiempo llegó a ser ampliamente cultivado en Europa. Desde su introducción en los sistemas europeos de la medicina herbaria, la pasiflora ha sido ampliamente utilizado como sedante, antiespasmódico y tónico nervioso. La infusión de hojas se introdujo en el norte de la medicina estadounidense a mediados de 1800 como un sedante a través de nativos y el uso de esclavos en el Sur. También fue utilizado para dolores de cabeza, moretones y dolor general, la aplicación de las hojas golpeadas por vía tópica en la zona afectada. En muchos países de Europa, los EE.UU. y Canadá, el uso de la pasiflora hojas para tranquilizar los nervios y resolver nervioso se ha documentado más de 200 años. Se empleó también para los cólicos, diarrea, disentería, dificultades menstruales, insomnio,

neuralgias, trastornos oculares, la epilepsia y las convulsiones y los espasmos musculares y el dolor (Lutomski, 1960; Bruneton, 1995).

Agricultura:

Crece en suelos finos, volcánicos, de clima tropical húmedo. Se propaga por semillas o esquejes; para su desarrollo requiere de un soporte que le permita trepar. Se produce una sola cosecha al año (VNPM, 2007).

Usos Medicinales Atribuidos:

Las partes secas aéreas de la pasiflora (*Passiflora incarnata*) se han usado históricamente como sedante e hipnótico (para el insomnio), y para las molestias gastrointestinales "nerviosas." Sin embargo, faltan pruebas clínicas claras controladas que apoyen ningún uso terapéutico en seres humanos. La evidencia preliminar indica que la pasiflora puede tener una acción calmante similar a aquella de las benzodiazepinas (Mahabir, 2008; Bruneton, 1995).

Otros usos populares:

El fruto de esta planta es refrescante, y agregándole al líquido las semillas (que contiene un ácido de los más apreciables), un poco de azúcar, vino blanco y nuez moscada, resulta una bebida fresca y deliciosa (Dhawan, 2002).

Farmacología:

Pasiflora (así como sus alcaloides harmane) han sido objeto de abundante investigación científica. Después de casi 100 años de estudio el efecto del sedante, antiespasmódico y analgésico efectos de esta vid tropical se han establecido firmemente en la ciencia. Los efectos analgésicos de la pasiflora fueron clínicamente por primera vez documentado en 1897, mientras que los efectos sedantes se registraron por primera vez en 1904. Antiespasmódico, anti-ansiedad y las acciones de las hojas de pasiflora hipotensores eran clínicamente validado en el decenio de 1980. Un extracto de la fruta demostrado efectos antiinflamatorios y tranquilizantes en estudios con animales. Además, un extracto de la hoja también ha demostrado tener actividad diurética en ratas (Lutomski, 1960; Bruneton, 1995).

La pasiflora se ha utilizado tradicionalmente como un afrodisíaco y los estudios clínicos recientes con ratones han verificado este uso también. En un estudio realizado en 2003, un extracto de la hoja se informó a mejorar la función sexual en general, el recuento de espermatozoides aumento, el potencial de la fertilización y el tamaño de la camada. Su uso tradicional para la tos también se ha confirmado recientemente. En un estudio realizado en 2002 con ratones un extracto de hoja de pasiflora ha demostrado ser comparable a la acción supresora de la tos de la codeína (Mahabir, 2008; Bruneton, 1995).

Composición Química:

Los químicos de las plantas principales de pasiflora son: alcaloides, alanina alfa, apigenina, aribine, Chrysin, ácido cítrico, la cumarina, ácidos cyclopassifloic AD, cyclopassifloides I-VI, malonato dietílico, edulan I, edulan II, flavonoides, glutamina, gynocardin, harmane, harmalina, harmalol, harmina, harmol, homoorientin, isoorientin, isoschaftoside, isovitexin, kaempferol, loturine, lucenin-2, lutenin-2, luteolina, n-nonacosano, orientin, passicol, passiflorine, ácido passifloric, pectina, ácidos fenólicos, la fenilalanina , prolina, prunasina, la quercetina, rafinosa, sambunigrin, saponarin, saponaretin, saponarine, schaftoside, escopoletina, serotonina, sitosterol, estigmasterol (Bruneton, 1995).

Contraindicaciones:

No se han descrito.

Precauciones y Reacciones Adversas:

No se han descrito.

Indicaciones Terapéuticas:

Por su propiedades analgésicas, espasmolíticas y sedantes está indicada su uso por vía oral en el tratamiento de ansiedad, hipertensión, migraña, neuralgia, convulsiones, histeria, insomnio, asma espasmódica, taquicardia nerviosa, mialgia, dismenorrea y trastornos climatéricos (VNPM, 2007).

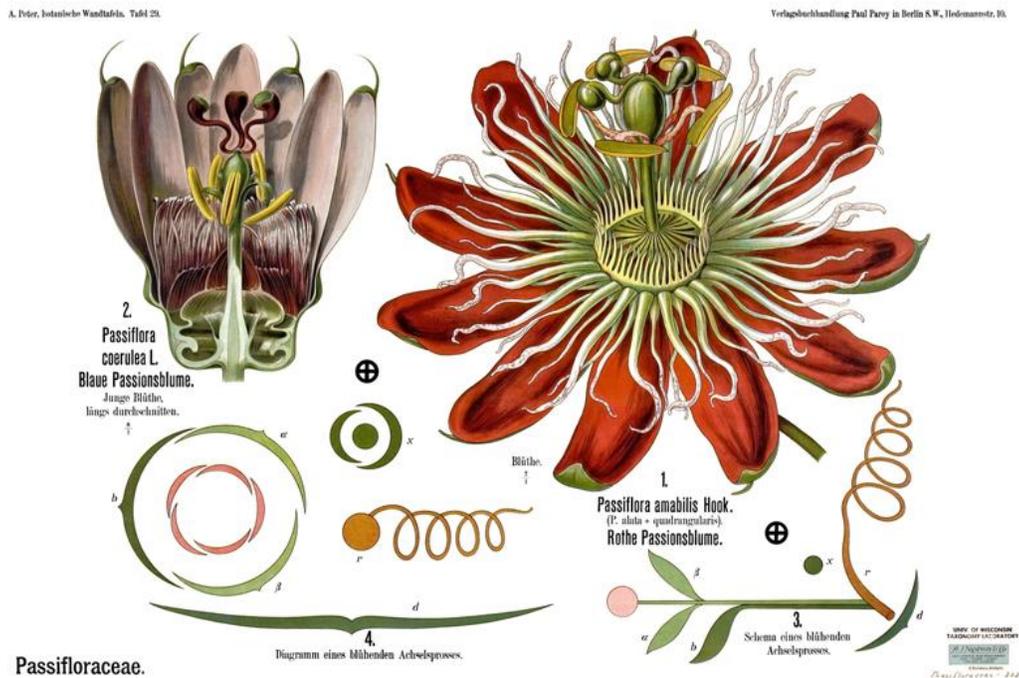
Formas Galénicas/Posología:

Las hojas se prepara normalmente en infusión estándar. Las dosis son de 1 taza 2-3 veces al día. De dos a tres gramos en tabletas o cápsulas 2-3 veces al día puede ser sustituido si lo desea (Bruneton, 1995).

1.4. Clasificación Científica:

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Dilleniidae
Superorden:	Violanae
Orden:	Violales
Familia:	Passifloraceae
Genero:	<i>Passiflora</i>

1.5. Esquema de la flor de *Passiflora*.



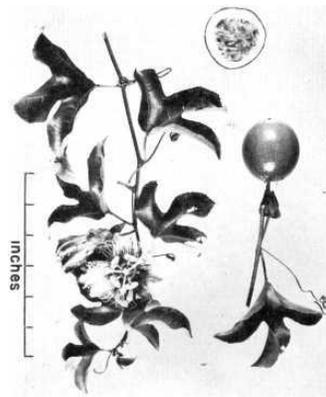
1.6. Dibujo de *Passiflora incarnata*.



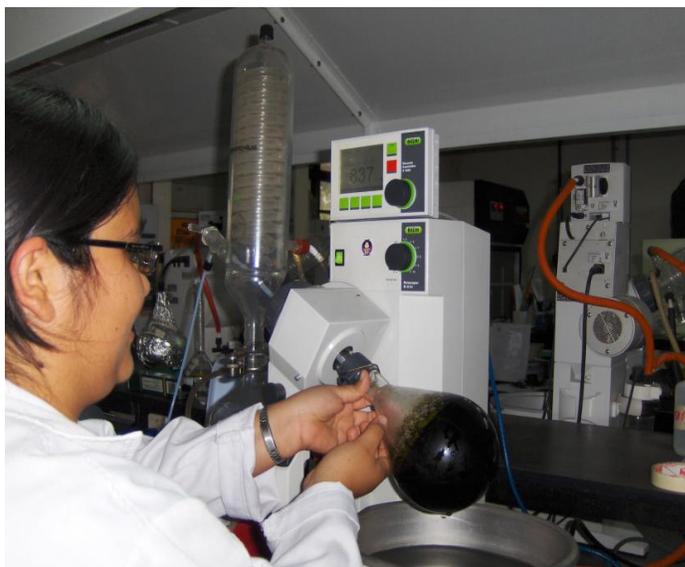
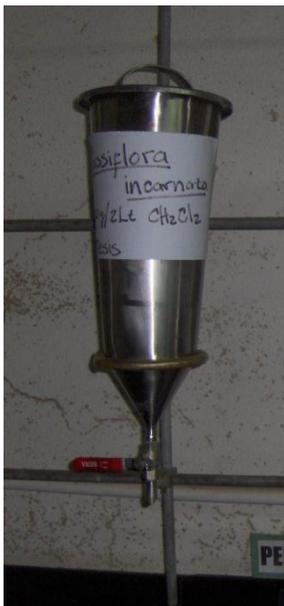
1.7. Dibujo de *Passiflora ligularis*



1.8. Dibujo de *Passiflora edulis*

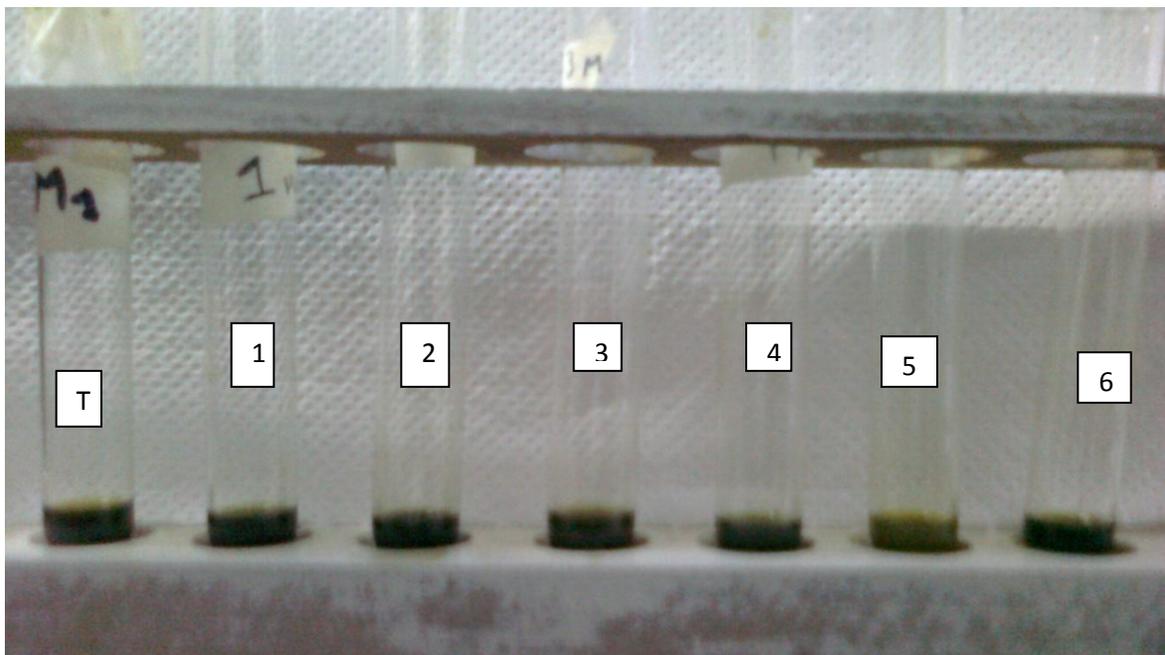


2. Fotos de percolación y rotavaporación para la obtención de extractos.



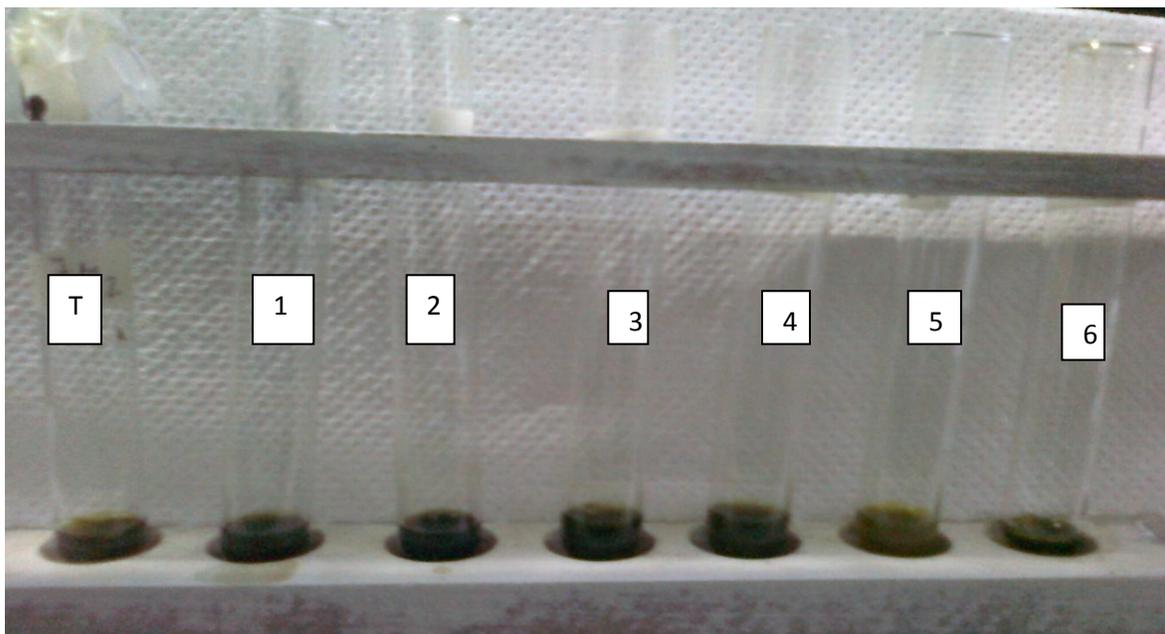
3. Fotos de pruebas macrométrico en tubos para la detección de flavonoides.

3.1 Tubos de *P. ligularis*



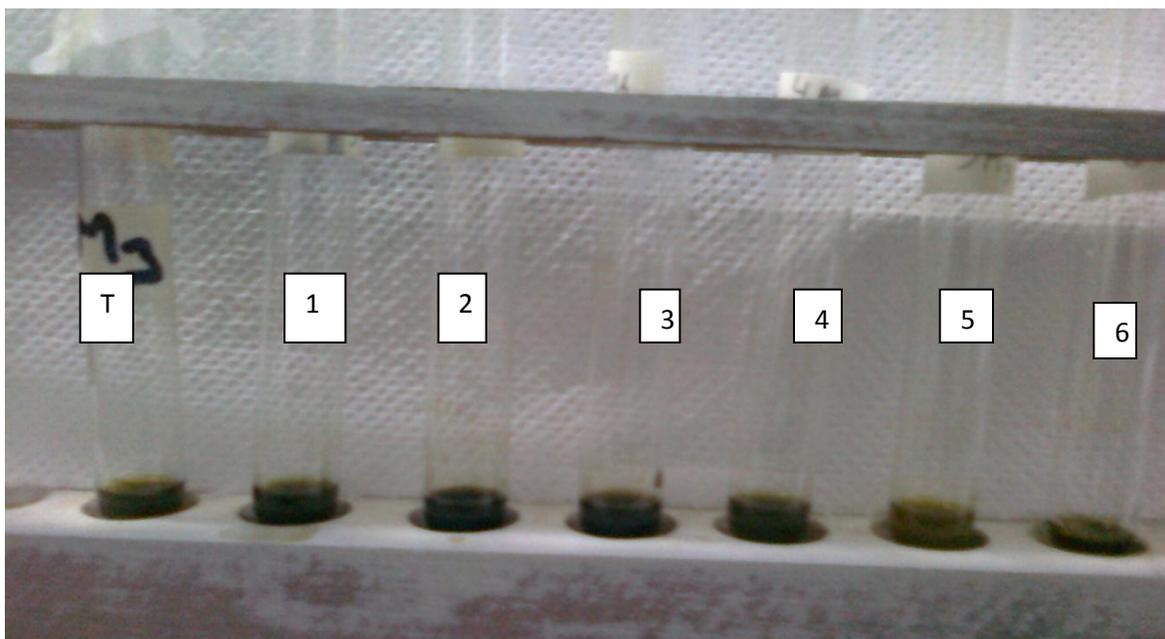
T: Testico, 1: H₂SO₄, 2: FeCl₃, 3: HCl y calentar, 4: Mg metálico, 5: álcali, 6: Ác. Bórico en anhídrido acético

3.2 Tubos de *P. incarnata*



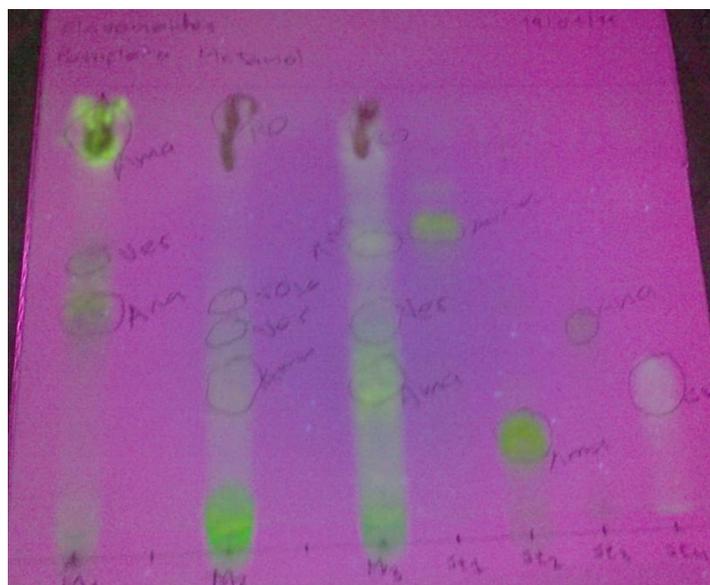
T: Testico, 1: H₂SO₄, 2: FeCl₃, 3: HCl y calentar, 4: Mg metálico, 5: álcali, 6: Ác. Bórico en anhídrido acético

3.3 Tubos de *P. edulis*



T: Testigo, 1: H₂SO₄, 2: FeCl₃, 3: HCl y calentar, 4: Mg metálico, 5: álcali, 6: Ác. Bórico en anhídrido acético

4. Foto de la cromatografía en capa fina de la detección de flavonoides.



M1: *P. ligularis* M2: *P. incarnata* M3: *P. edulis*

St1: Quercetina St2: Rutina St3: Hiperosido St4: Ácido clorogénico

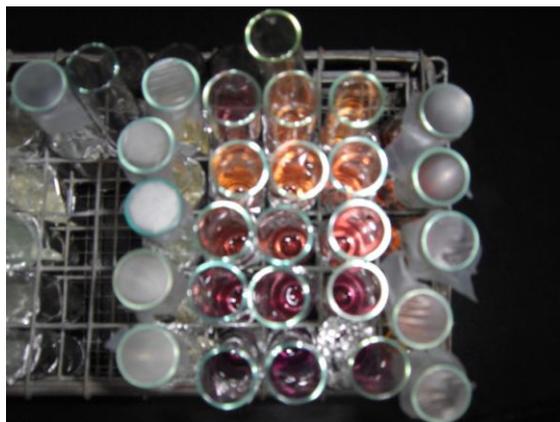
6. Foto de la cromatografía en capa fina de la detección de actividad antioxidante con revelador de DPPH



M2: MetOH *P. incarnata* M3: MetOH *P. edulis* D1: CH₂Cl₂ *P. ligularis*

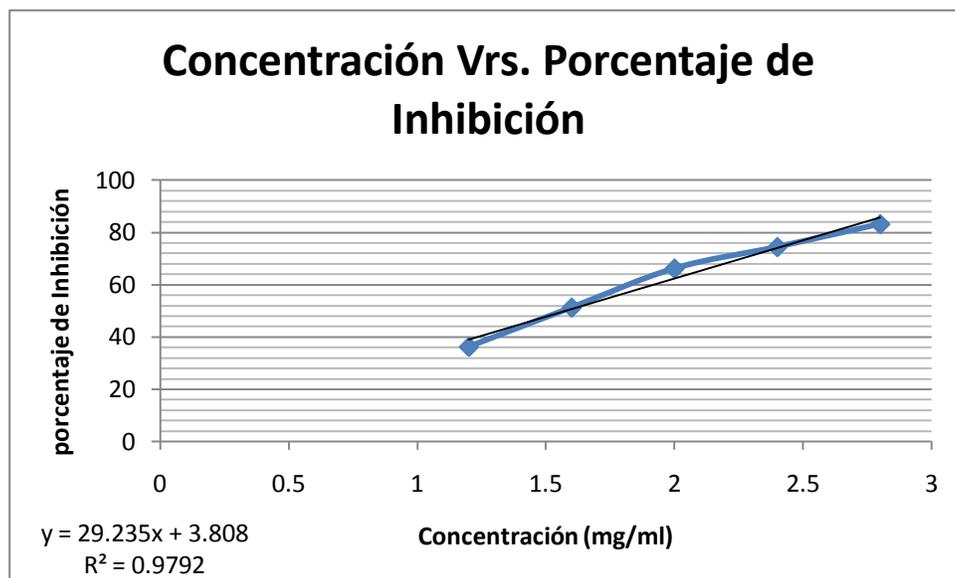
D2: CH₂Cl₂ *P. incarnate* D3. CH₂Cl₂ *P. edulis* M1: MetOH *P. ligularis*

7. Fotos del procedimiento de la cuantificación de la actividad antioxidante por DPPH



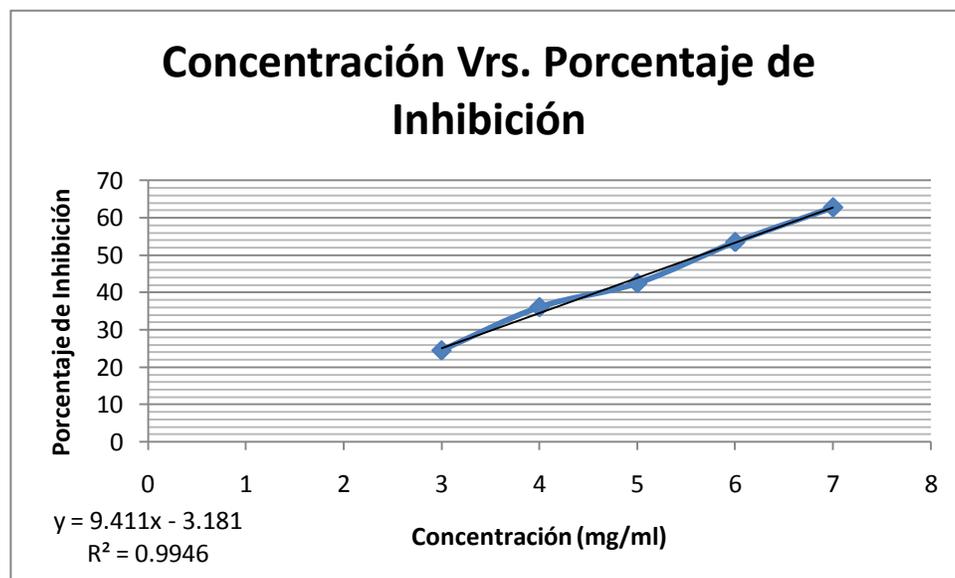
8. Curvas de calibración de las muestras y estándares, usadas en la determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH

8.1 Extracto de metanol de *P. ligularis*

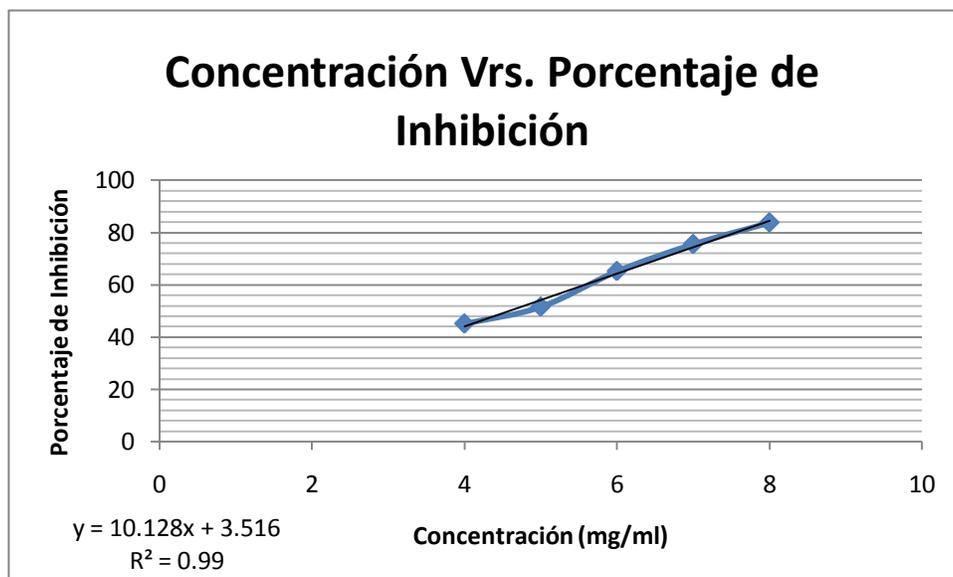


Fuente: Datos Experimentales

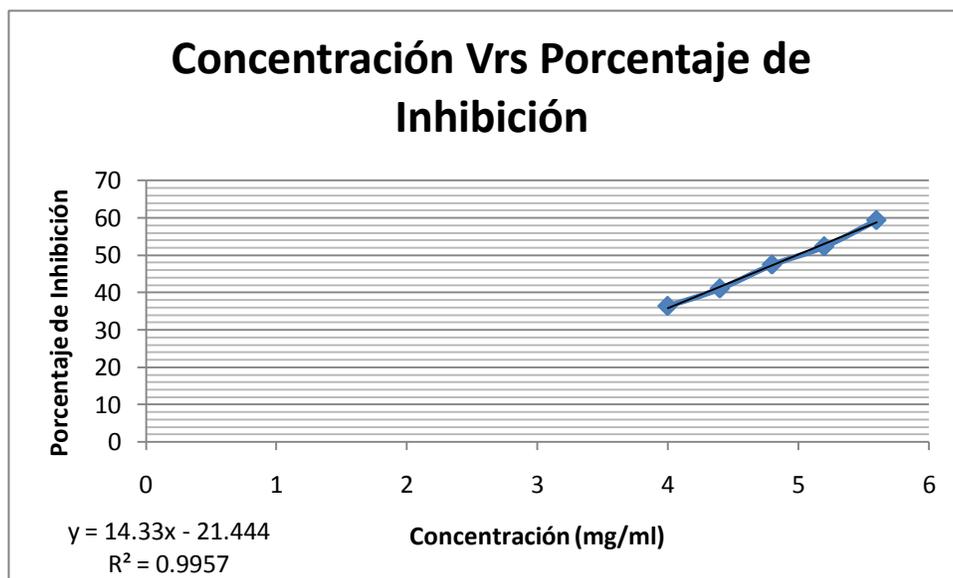
8.2 Extracto de diclorometano de *P. ligularis*



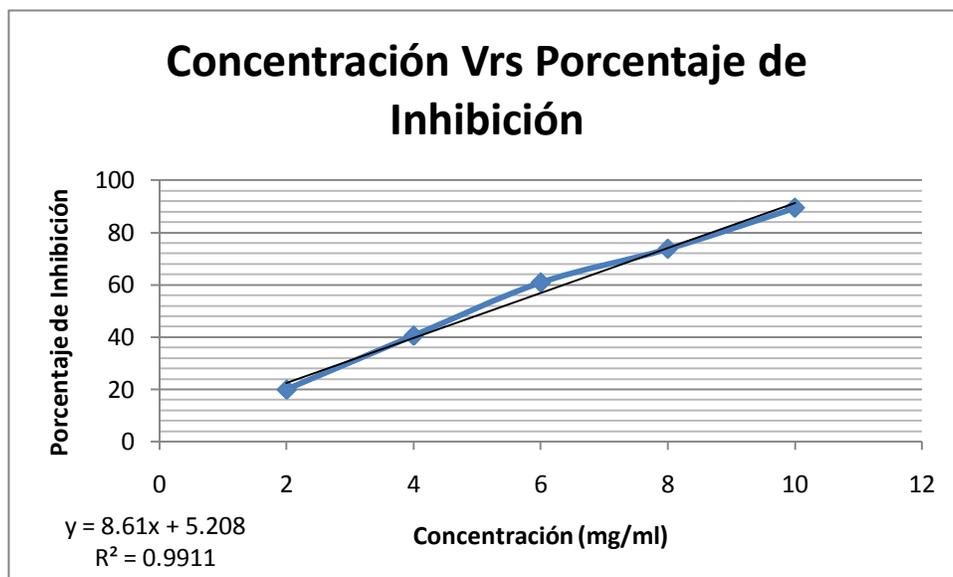
Fuente: Datos Experimentales

8.3 Extracto de metanol de *P. edulis*

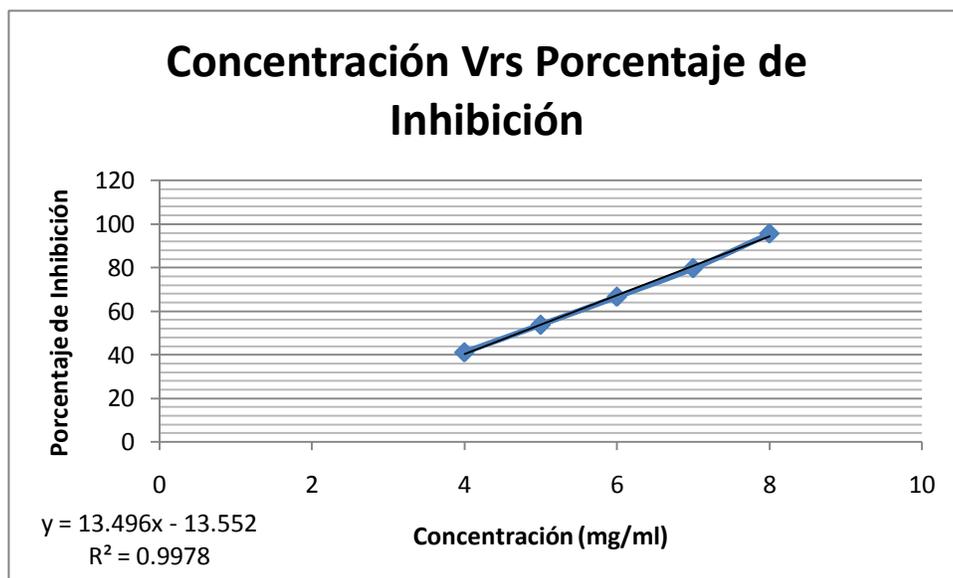
Fuente: Datos Experimentales

8.4 Extracto de diclorometano de *P. edulis*

Fuente: Datos Experimentales

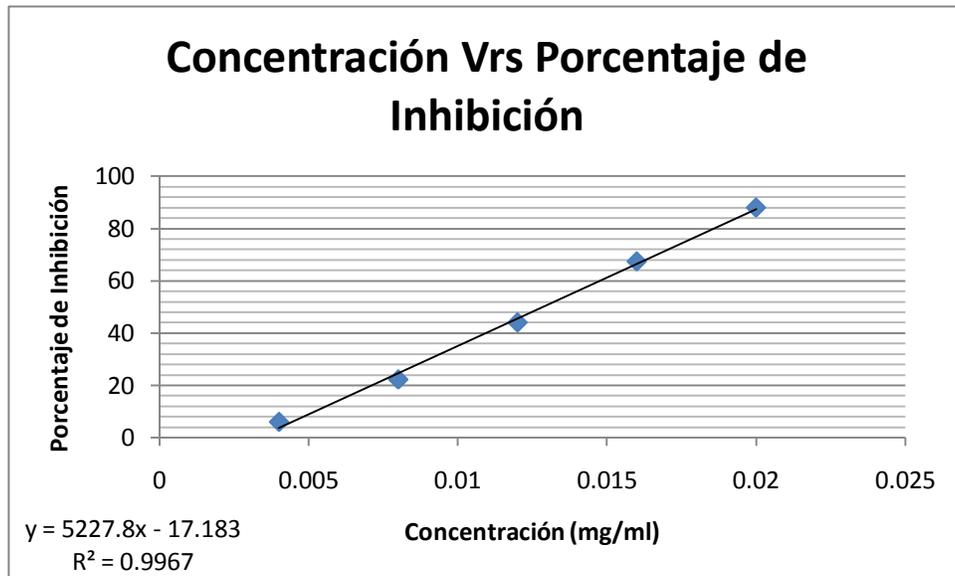
8.5 Extractos de metanol de *P. incarnata*

Fuente: Datos Experimentales

8.6 Extractos de diclorometano de *P. incarnata*

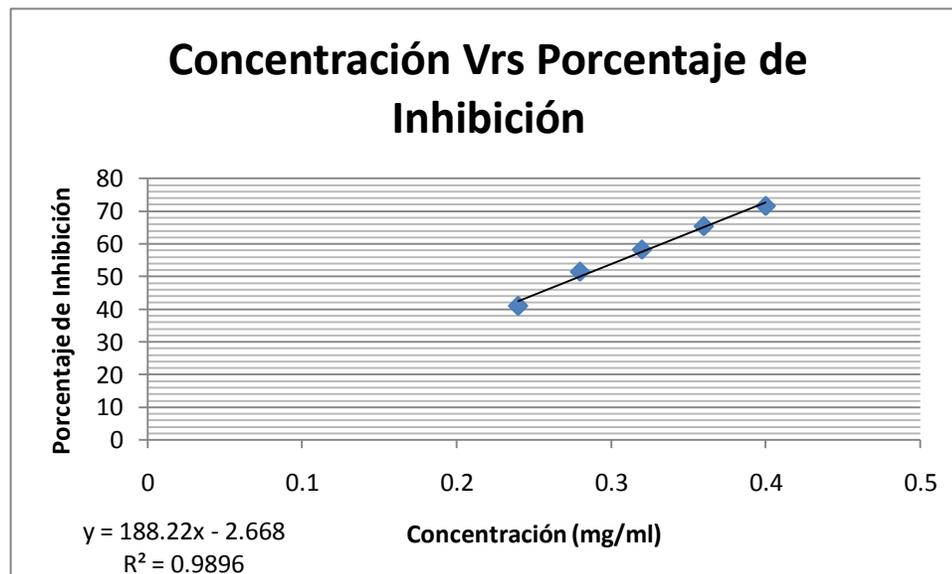
Fuente: Datos Experimentales

8.7 Vitamina C



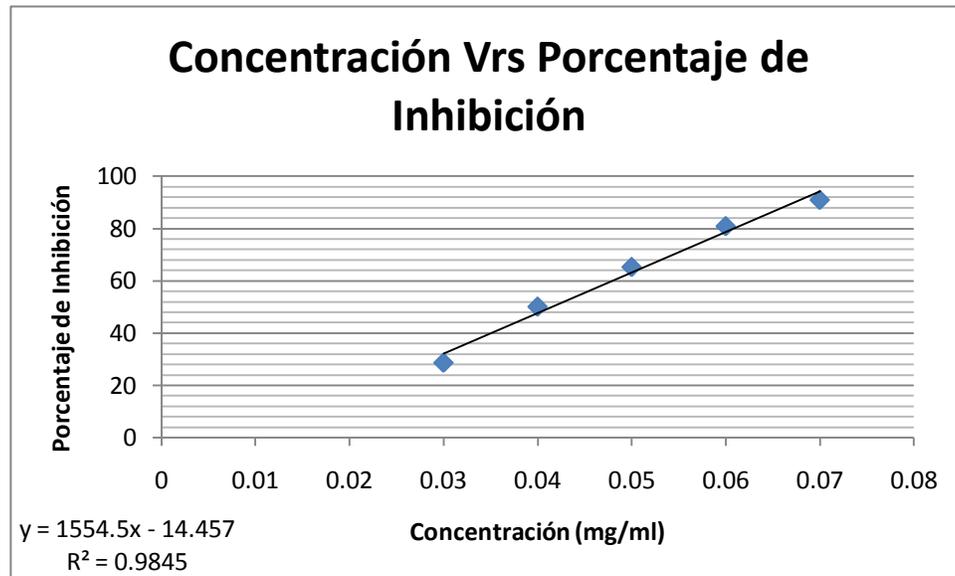
Fuente: Datos Experimentales

8.8 Vitamina E



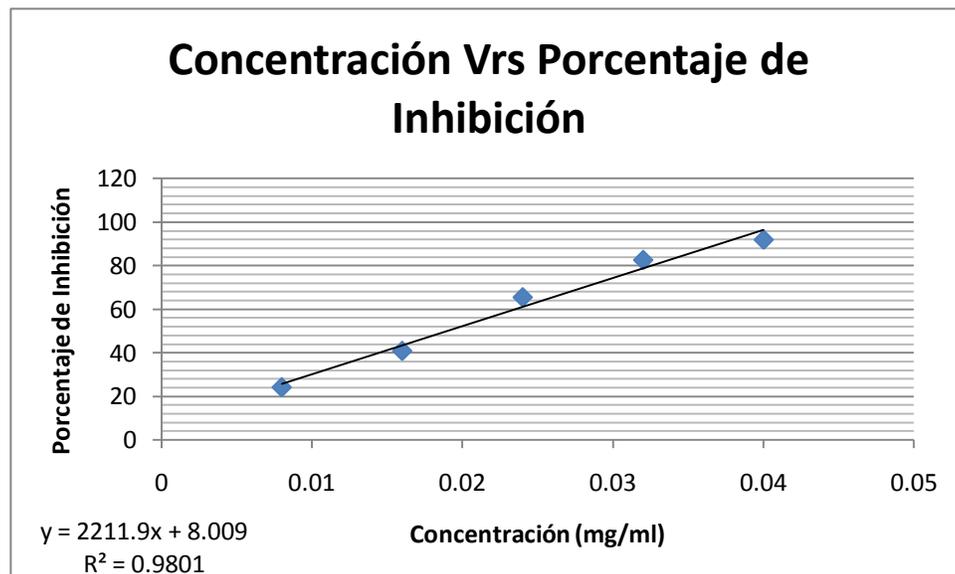
Fuente: Datos Experimentales

8.9 Quercetina



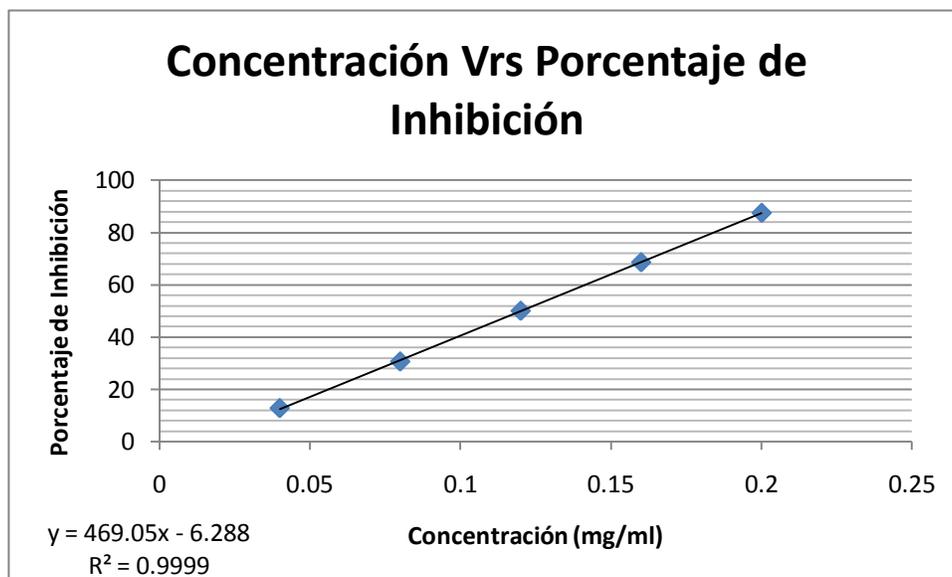
Fuente: Datos Experimentales

8.10 Rutina



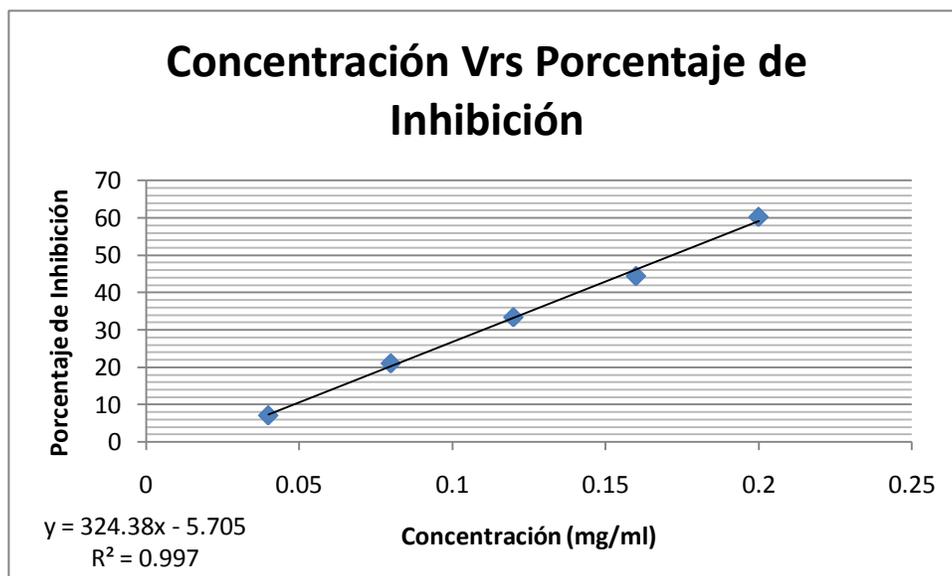
Fuente: Datos Experimentales

8.11 Ter-butil-hidroxiquinona (TBHQ)



Fuente: Datos Experimentales

8.12 Trolox



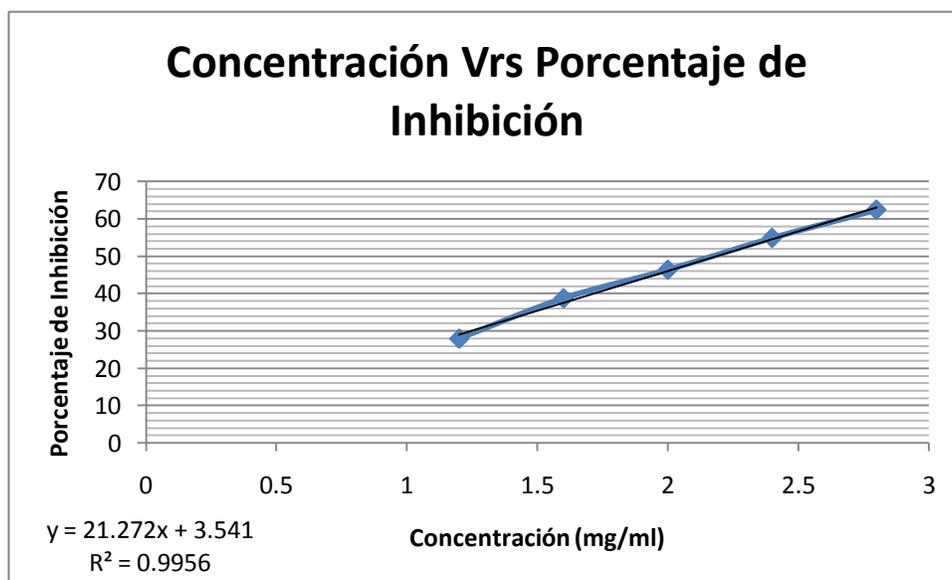
Fuente: Datos Experimentales

9. Fotos de los tubos de la cuantificación de la actividad antioxidante por ABTS

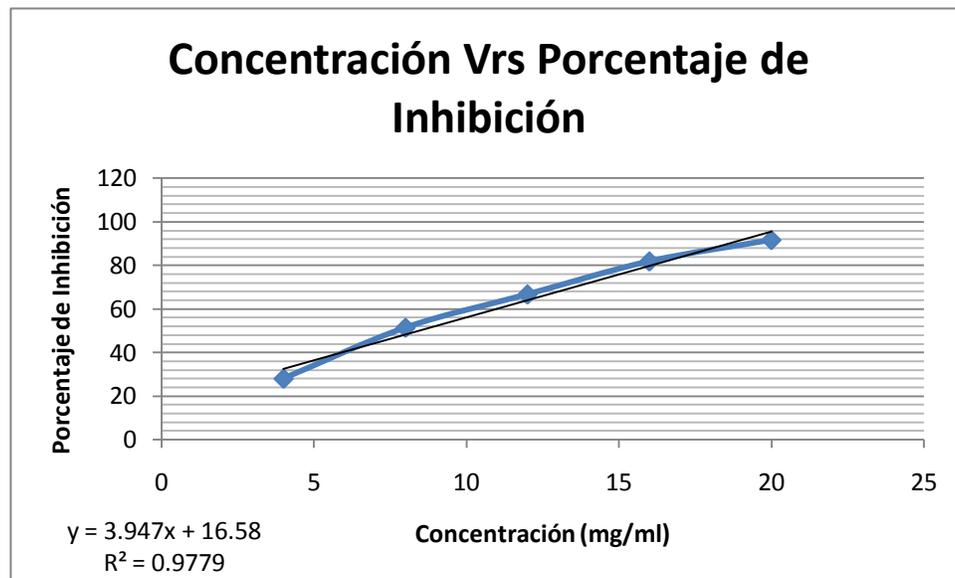


10. Curvas de calibración de las muestras y estándares, usadas en la determinación de la actividad antioxidante por el método de ABTS

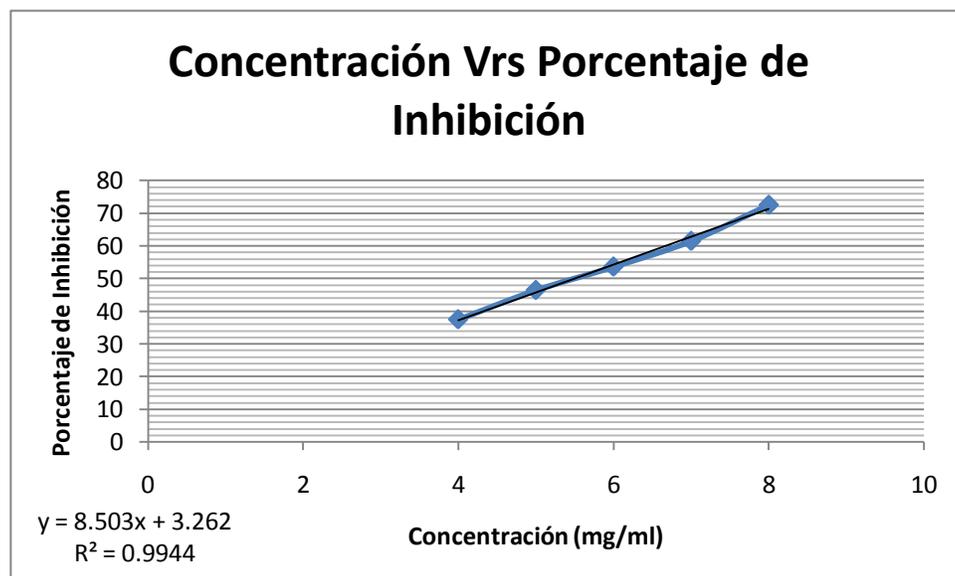
10. 1 Extracto de metanol de *P. ligularis*



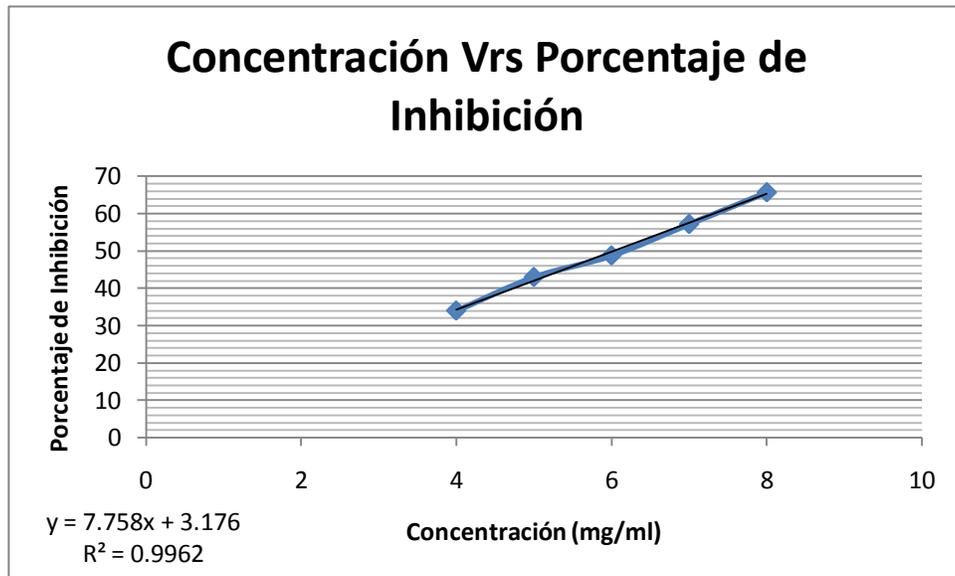
Fuente: Datos Experimentales

10.2 Extracto de diclorometano de *P. ligularis*

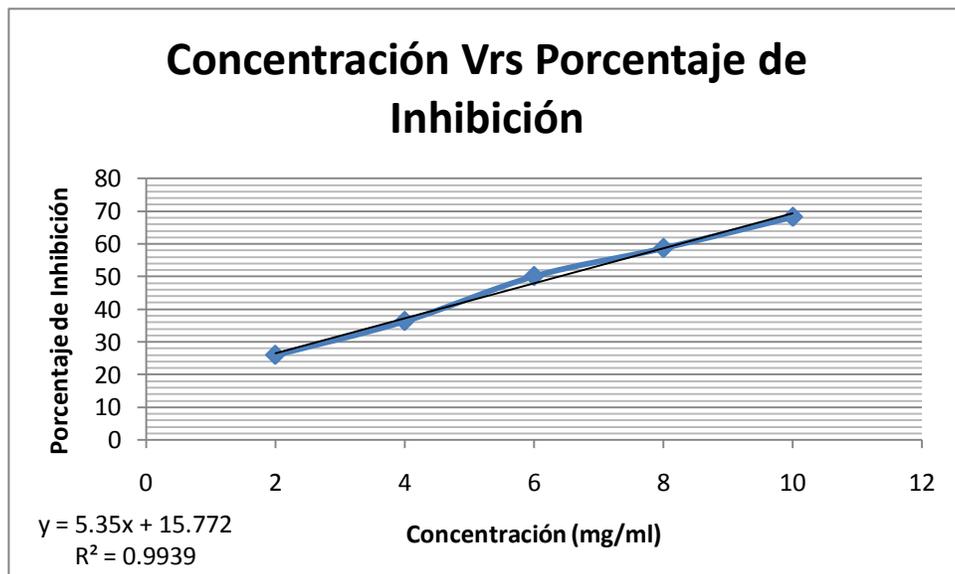
Fuente: Datos Experimentales

10.3 Extracto de metanol de *P. edulis*

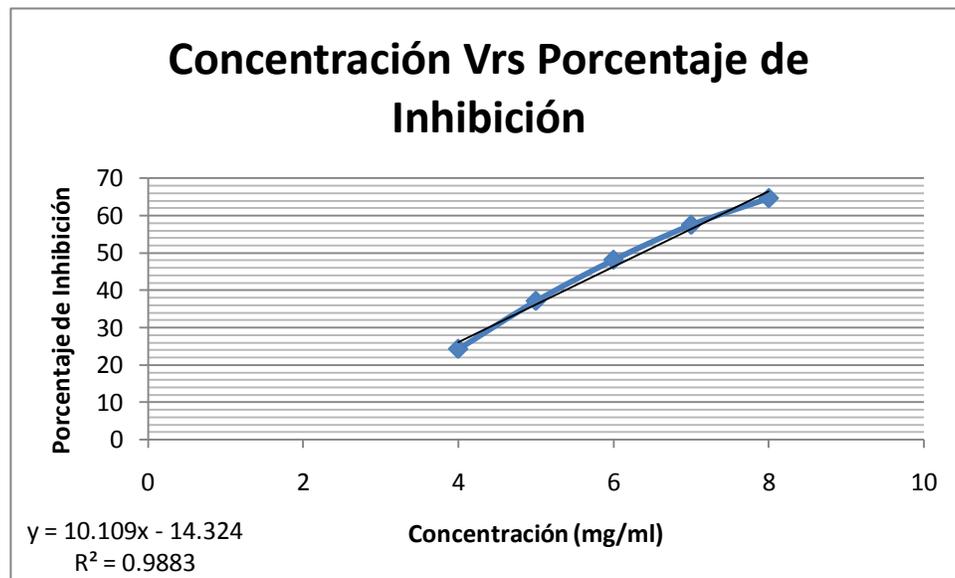
Fuente: Datos Experimentales

10.4 Extracto de diclorometano de *P. edulis*

Fuente: Datos Experimentales

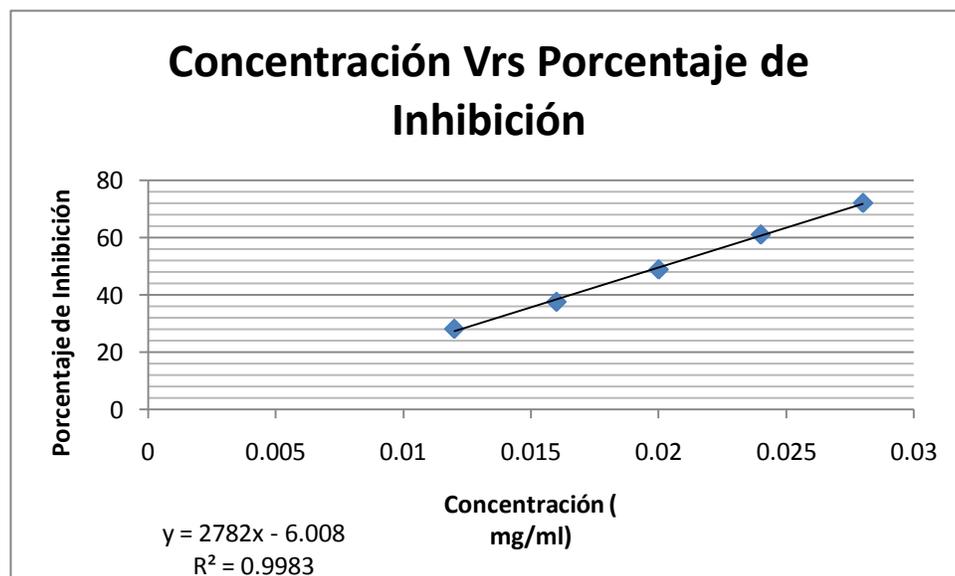
10.5 Extracto de metanol de *P. incarnata*

Fuente: Datos Experimentales

10.6 Extracto de diclorometano de *P. incarnata*

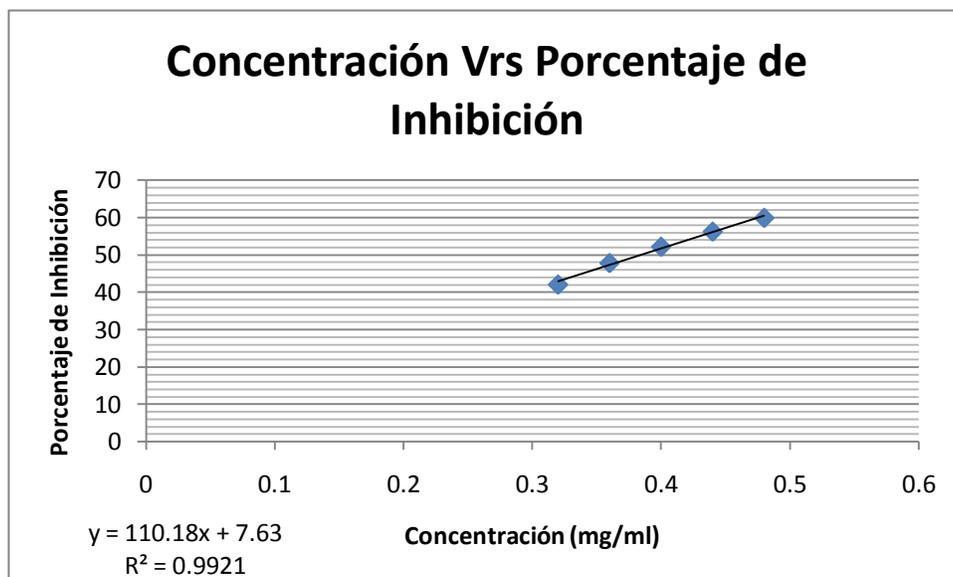
Fuente: Datos Experimental

10. 7 Vitamina C



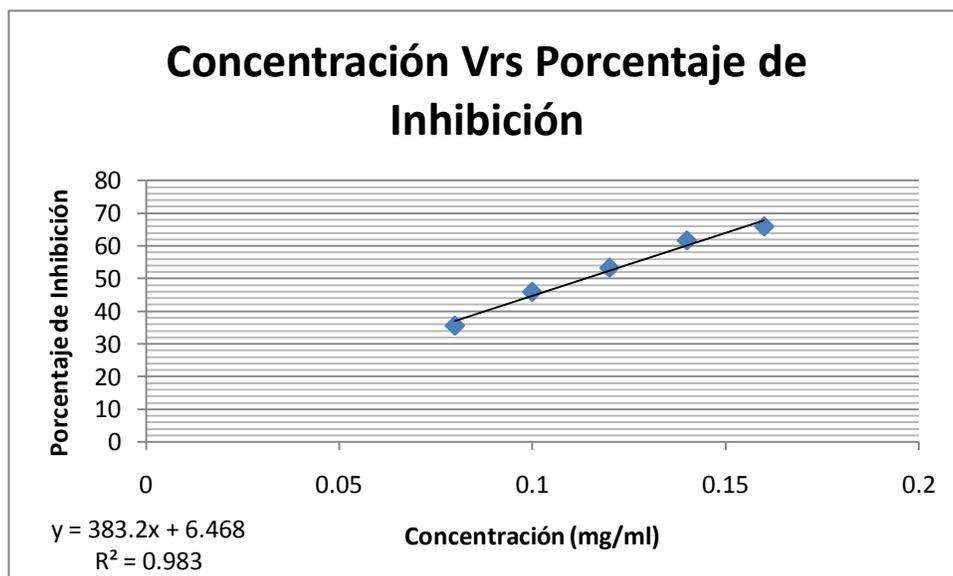
Fuente: Datos Experimentales

10.8 Vitamina E



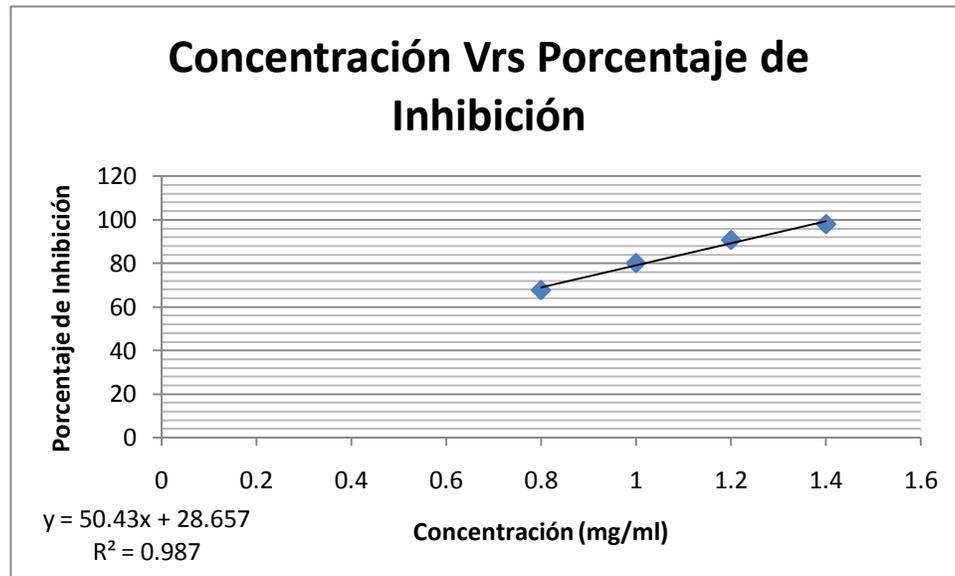
Fuente: Datos Experimentales

10.9 Quercetina



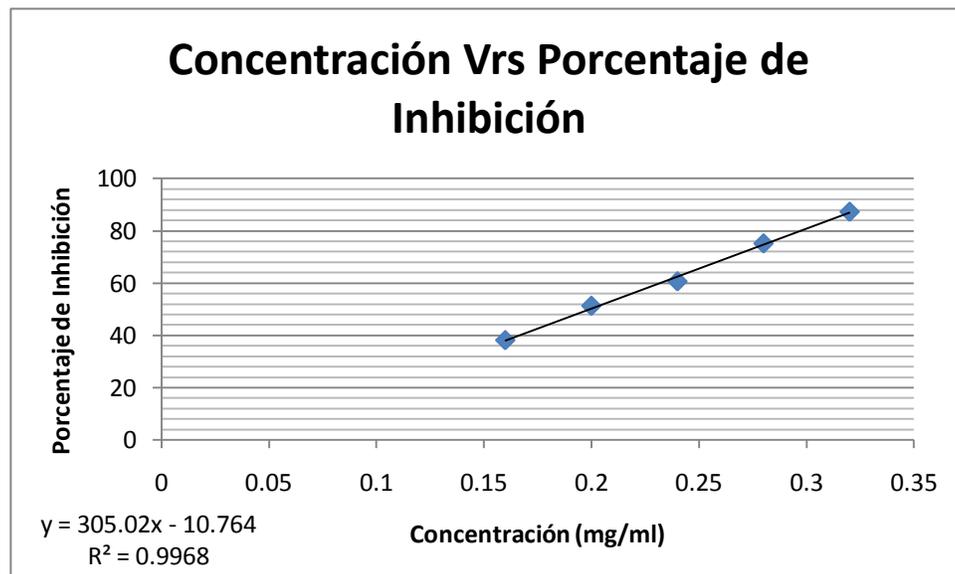
Fuente: Datos Experimentales

10.10 Rutina



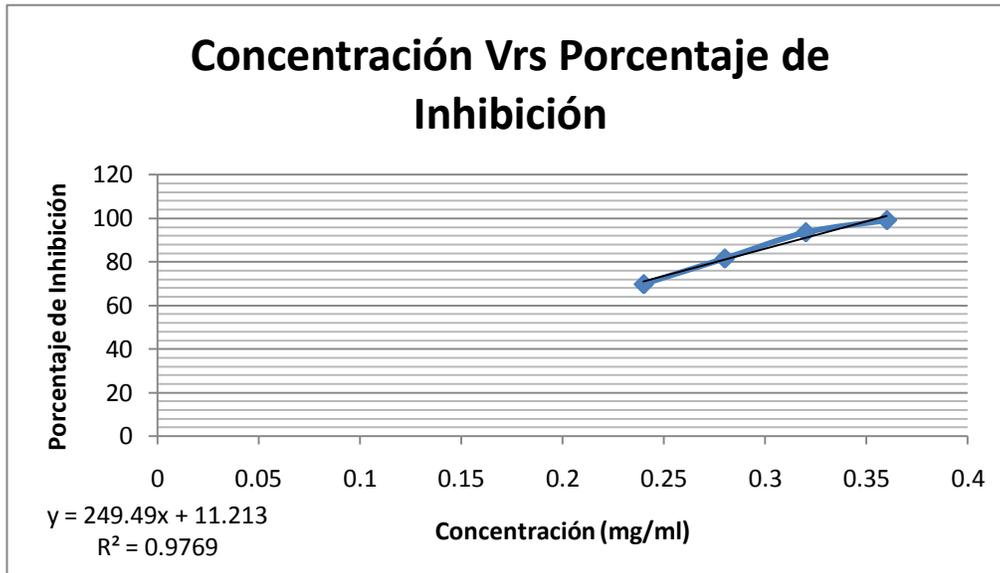
Fuente: Datos Experimentales

10.11 Ter-butil-hidroquinona (TBHQ)



Fuente: Datos Experimentales

10.12 Trolox



María Nereida Marroquín Tintí
Estudiante

Licda. Sully Margot Cruz V
Asesora

Licda. Aylin Santizó
Revisora

Licda. Lucrecia Martínez de Haase
Directora de Escuela

Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto Ph. D.
Decano