



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Aporte a la estandarización del
proceso de obtención de un extracto
de hojas de *Passiflora
quadrangularis***

Sandra Milena Echeverry González

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Área Curricular de Farmacia
Bogotá, Colombia

2017

Aporte a la estandarización del proceso de obtención de un extracto de hojas de *Passiflora quadrangularis*

Sandra Milena Echeverry González

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Farmacéuticas

Director (a):

DSc. Diana Marcela Aragón Novoa

Profesora Asociada, Universidad Nacional de Colombia

Codirector (a):

Ph.D. Geison Modesti Costa

Profesor Asistente, Pontificia Universidad Javeriana

Línea de Investigación:

Grupo de Investigación en Tecnología de Productos Naturales, TECPRONA

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Área Curricular de Farmacia

Bogotá, Colombia

2017

A mi familia.

Ustedes son mi motor y mi fuerza.

A Luis Fer.

*Sin tu amor y apoyo incondicional no hubiera
sido posible alcanzar esta meta.*

Agradecimientos

A mi abuelo, que desde el cielo siempre me ha acompañado y me ha dado la fuerza y la sabiduría en los momentos más difíciles. Gracias por ser mi ángel de la guarda.

A mis padres y mis hermanas por su comprensión y amor. No hay palabras que puedan describir mi amor y gratitud, ustedes son mi mundo y la razón por la que quiero cada día ser una mejor persona.

A Luis Fer, gracias por tenerme paciencia en mis momentos de desesperación y estrés, por apoyarme de manera incondicional, por amarme tal y como soy y por hacerme reír todos los días que he compartido junto a ti. No sé qué hubiera hecho sin tu locura.

A mis tutores, la Profe Marcela y Geison por su paciencia, compromiso, dedicación y acompañamiento durante el desarrollo de este trabajo. Dios no pudo colocar en mi camino dos seres humanos más increíbles que ustedes dos.

A mis compañeros de laboratorio y amigos: Johan, María Isabel, Ivonne, Diana, Laura y Lina. Muchachos gracias por los consejos, las risas y en general por todo su apoyo. Ustedes hicieron de esta época de mi vida algo inolvidable.

A Lisa, Angelita y César por estar junto a mi sin importar la distancia que hubiera entre nosotros.

Al Profesor Luis Fernando Ospina, del departamento de Farmacia por su asesoría y acompañamiento en el desarrollo de los ensayos farmacológicos.

A Ronnal Ortiz por su apoyo en el análisis estadístico de los datos.

A Don Jorge, Doña Patricia, Dorita y Diana gracias por su colaboración.

Al Grupo de Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia del Departamento de Química y especialmente a los profesores Leonardo Castellanos y Freddy Ramos por su asesoría y apoyo en el desarrollo de esta investigación.

A la Universidad Nacional de Colombia por apoyarme a través de la beca de exención de derechos académicos y al Departamento de Farmacia por permitirme crecer académicamente y profesionalmente.

A la Red Nacional para la Bioprospección de Frutas Tropicales-RIFRUTBIO por el apoyo financiero para la realización de este proyecto.

Resumen

Especies de *Passiflora* han sido ampliamente utilizadas en la medicina tradicional como calmante y sedante. Estudios farmacológicos realizados con diversas especies, incluyendo *P. quadrangularis* han corroborado el uso popular y han demostrado que los compuestos responsables de la actividad farmacológica sobre sistema nervioso central (SNC) son los flavonoides presentes en estas especies. Esta característica convierte a las *Passifloras* en materiales de interés para el desarrollo de productos fitoterapéuticos.

El objetivo principal de este trabajo fue realizar un aporte sobre la estandarización del proceso de obtención de un extracto de hojas de *Passiflora quadrangularis*, abordando aspectos como: la optimización del proceso de extracción de los flavonoides totales, la evaluación de la influencia de las variables de extracción sobre el contenido de quadrangulósido (saponina), la evaluación del efecto de la localidad y época de colecta sobre el contenido de flavonoides y de la saponina, la evaluación de la estabilidad bajo condiciones de estrés y la determinación del tiempo de vida útil del extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis*.

De acuerdo con los resultados obtenidos se logró determinar que una relación droga-disolvente 1:15, disolvente de extracción EtOH:H₂O en proporción 1:1 y un tiempo de percolación de 48 h permiten obtener la mayor concentración de flavonoides totales usando el método de percolación. No se detectó en hojas de *P. quadrangularis* la presencia de quadrangulósido, así que se caracterizó y evaluó la influencia de los factores de extracción sobre otra saponina (Pq-Sap2) encontrando que las condiciones de extracción que permiten la mayor extracción de flavonoides totales también permiten extraer un contenido alto de Pq-Sap2. La localidad y época de colecta influyen el contenido de ambos metabolitos, cuantificando la mayor concentración de flavonoides totales en la localidad de Neiva durante el periodo de sequía y el mayor contenido de Pq-Sap2 en la localidad de Neiva en época de lluvias. Con respecto a la estabilidad bajo

condiciones de estrés se encontró que el extracto optimizado es prácticamente estable en condiciones de estrés por hidrólisis y oxidación, lábil por condiciones de estrés con hidrólisis ácida y básica y fotoestable. Adicionalmente, se identificaron como productos de degradación los flavonoides isovitexina e isorientina. Por último, se determinó un tiempo de vida útil del extracto de 2 meses.

Palabras clave: *P. quadrangularis*, flavonoides C-glicosilados, saponinas, estandarización, estabilidad, y tiempo de vida útil aparente.

Abstract

Passiflora species have been widely used in traditional medicine as a sedative and tranquilizer. Pharmacological studies performed with several species, including *P. quadrangularis* have corroborated popular usage and have shown that the compounds responsible for pharmacological activity about the central nervous system (CNS) are the flavonoids present in these species. This characteristic makes Passifloras into materials of interest for the development of herbal medicines.

The main objective of this work was to make a contribution on the standardization of the process of obtaining an extract from *Passiflora quadrangularis* leaves, addressing aspects such as: optimization of the extraction process of total flavonoids, evaluation of the influence of the variables of extraction on the content of quadranguloside (saponin), evaluation of the effect of locality and collection period on the content of flavonoids and saponin, evaluation of stability under stress conditions and determination of the shelf life of the optimized extract from of *P. quadrangularis* leaves.

According to the results obtained it was able to determine that a drug-solvent ratio of 1:15, extraction solvent EtOH:H₂O in a ratio of 1:1 and a percolation time of 48 h allow to obtain the highest concentration of total flavonoids using percolation. The presence of quadranguloside was not detected in leaves from *P. quadrangularis*, so the influence of the extraction factors on other saponin (Pq-Sap2) was evaluated, finding that the extraction conditions that allow the maximum extraction of total flavonoids also allow to extract a high content of Pq-Sap2. The locality and collection period influences the content of both metabolites, quantifying the highest concentration of total flavonoids in the locality of Neiva during the dry period and the highest content of Pq-Sap2 in the locality of Neiva in the rainy season. With regard to stability under stress conditions it was found that the optimized extract is practically stable under conditions of stress by hydrolysis and

oxidation, labile by stress conditions with acidic hydrolysis and basic hydrolysis and photoestable. In addition, the isovitexin and isorientin flavonoids were identified as degradation products. Finally, a shelf life of the extract of 2 months was determined.

Key words: *P. quadrangularis*, C-glycosidic flavonoids, saponins, standardization, stability, and apparent shelf-life.

Contenido

Resumen.....	IX
Lista de figuras	XII
Lista de Tablas.....	XIII
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XIV
Introducción.....	1
1. Marco Teórico.....	3
1.1 <i>Passiflora quadrangularis</i>	3
1.1.1 Caracterización química de <i>P. quadrangularis</i>	4
1.1.2 Actividad farmacológica de <i>P. quadrangularis</i>	9
1.2 Estandarización de extractos.....	10
1.3 Estabilidad y vida útil aparente.	11
2. Objetivos.....	13
2.1 Objetivo General.....	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3. Evaluación del efecto de algunas variables del proceso de extracción sobre el contenido de flavonoides totales (FT) de hojas de <i>P. quadrangularis</i>.	15
3.1 Metodología.....	16
3.1.1 Colección de material vegetal	16
3.1.2 Secado y pulverización del material vegetal	16
3.1.3 Distribución de tamaño de partícula del material vegetal molido.....	17
3.1.4 Obtención de los extractos hidroalcohólicos	17
3.1.5 Cuantificación de flavonoides totales por CLAE-DAD	18
3.1.6 Evaluación de la actividad farmacológica sedante	19
3.1.7 Análisis estadístico	21
3.2 Resultados y discusión.....	22
3.2.1 Determinación de la distribución de tamaño de partícula del material vegetal molido de hojas de <i>P. quadrangularis</i>	22
3.2.2 Obtención de los extractos hidroalcohólicos	23

3.2.3	Evaluación de la actividad farmacológica sobre sistema nervioso central (SNC) del extracto optimizado en FT de hojas de <i>P. quadrangularis</i>	31
4.	Evaluación del efecto de algunas variables de extracción sobre el contenido de quadrangulósido en hojas de <i>P. quadrangularis</i>.....	34
4.1	Metodología	34
4.1.1	Condiciones cromatográficas establecidas para el desarrollo y validación de la metodología analítica	35
4.1.2	Identificación de las señales cromatográficas correspondiente a quadrangulósido y ácido oleanólico	36
4.1.3	Validación de la técnica por CLAE-DAD-ELSD para la cuantificación de la saponina Pq-Sap2	36
4.1.4	Análisis estadístico.....	40
4.2	Resultados.....	40
4.2.1	Identificación de la señal cromatográfica correspondiente a quadrangulósido y ácido oleanólico.	40
4.2.2	Validación de la metodología analítica	43
4.2.3	Influencia de los factores de extracción sobre la concentración de PqSap2.....	49
5.	Efecto de la localidad y época de colecta sobre la concentración de flavonoides totales y Pq-Sap2.	53
5.1	Metodología	53
5.1.1	Localidades de colecta del material vegetal	53
5.1.2	Épocas de colecta del material vegetal.	56
5.1.3	Cuantificación de flavonoides totales y Pq-Sap2.....	57
5.1.4	Análisis estadístico.....	57
5.2	Resultados y discusión	57
5.2.1	Efecto sobre la concentración de flavonoides totales	57
5.2.2	Efecto sobre la concentración de Pq-Sap2.....	61
6.	Estabilidad y determinación de la vida útil aparente del extracto de hojas de <i>P. quadrangularis</i>	65
6.1	Metodología	65
6.1.1	Estabilidad bajo condiciones de estrés: hidrólisis a condiciones neutras	66
6.1.2	Estabilidad bajo condiciones de estrés: hidrólisis ácida e hidrólisis básica.....	67
6.1.3	Estabilidad bajo condiciones de estrés: oxidación con H ₂ O ₂	69
6.1.4	Estabilidad bajo condiciones de estrés fotolítica.....	69
6.1.5	Estabilidad acelerada e intermedia	71
6.2	Análisis estadístico	72

6.3	Resultados y discusión	72
6.3.1	Estabilidad bajo condiciones de estrés: Hidrólisis	73
6.3.2	Estabilidad bajo condiciones de estrés: Hidrólisis básica	74
6.3.3	Estabilidad bajo condiciones de estrés: Hidrólisis ácida.....	80
6.3.4	Estabilidad bajo condiciones de estrés por oxidación con H ₂ O ₂	86
6.3.5	Estabilidad bajo condiciones de estrés fotolítica	89
6.3.6	Estabilidad Intermedia y acelerada	92
7.	Conclusiones y Recomendaciones.....	97
8.	Bibliografía	101

Anexo:A: Identificación taxónimica del materia vegetal

Anexo:B. Aval del comité de ética

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. Fotografía de las hojas, fruto y flor de <i>Passiflora quadrangularis</i>	4
Figura 1-2. Estructura química de algunas saponinas reportadas para <i>P. quadrangularis</i>	5
Figura 1-3. Estructura química de algunos flavonoides descritos para las hojas de <i>P. quadrangularis</i>	8
Figura 3-1. Ensayo de inducción del sueño por éter etílico.....	21
Figura 3-2. Distribución de tamaño de partícula para el material colectado en la localidad de Rivera, Huila.	22
Figura 3-3. Distribución de tamaño de partícula para el material colectado en la localidad de Neiva, Huila.	22
Figura 3-4. Perfil cromatográfico de un extracto optimizado de hojas de <i>P. quadrangularis</i>	24
Figura 3-5. Diagramas de superficie del contenido de flavonoides totales en extractos de hojas de <i>P. quadrangularis</i> en función de la interacción entre factores.	28
Figura 3-6. Efecto sedante de los extractos de hojas de <i>P. quadrangularis</i> sobre el tiempo de inducción del sueño por éter etílico evaluado en ratones por vía oral.	31
Figura 4-1. Perfiles cromatográficos por CLAE-ELSD del extracto optimizado de <i>P. quadrangularis</i> , quadrangulósido y Pq-Sap2.....	41
Figura 4-2. Perfiles cromatográficos por CLAE-DAD a 205 nm del extracto hidroalcohólico de <i>P. quadrangularis</i> , quadrangulósido y Pq-Sap2	42
Figura 4-3. Estructura química del compuesto Pq-Sap2 (9,19-ciclolanost-24-Z-en-1 β ,3 β ,21,26-tetraol-3-O- β -glucósido)	43
Figura 4-4. Curva de calibración con patrón interno para la cuantificación de una saponina (PqSap2) presente en el extracto hidroalcohólico de hojas de <i>P. quadrangularis</i>	47
Figura 4-5. Curva de regresión 1 realizada para la evaluación y determinación de LDD y LDC.	48
Figura 4-6. Perfiles cromatográficos por DAD a 205 nm de los extractos hidroalcohólicos obtenidos de los tratamientos del diseño factorial fraccionado 3 ³⁻¹	50
Figura 5-1. Cultivo de badea (<i>P. quadrangularis</i>) de la localidad de Neiva.	55

Figura 5-2. Cultivo de badea (<i>P. quadrangularis</i>) de la localidad de Rivera.	55
Figura 5-3. Efecto de la localidad y época de colecta sobre la concentración de flavonoides en hojas de <i>P. quadrangularis</i>	58
Figura 5-4. Perfiles cromatográficos de los extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>P. quadrangularis</i> colectadas en época de sequía y lluvia en la localidad de Neiva, Huila. Efecto sobre los flavonoides C-glicosídeos.	59
Figura 5-5. Efecto de la localidad y época de colecta sobre la concentración de Pq-Sap2 en hojas de <i>P. quadrangularis</i>	62
Figura 5-6. Correlación de Pearson entre la concentración de flavonoides totales vs el contenido de Pq-Sap2	64
Figura 6-1. Diagrama de decisión para la evaluación de la estabilidad bajo condiciones de estrés por hidrólisis.	67
Figura 6-2. Diagrama de decisión para la realización de estudios de estabilidad bajo condiciones de estrés con hidrólisis ácida y básica.	68
Figura 6-3. Diagrama de decisión para la realización de estudios de estabilidad bajo condiciones de estrés con peróxido de hidrógeno H ₂ O ₂	69
Figura 6-4. Prototipo cámara de fotoestabilidad.	70
Figura 6-5. Diagrama de flujo para la realización de estudios de estabilidad bajo condiciones de estrés fotolítica.	71
Figura 6-6. Concentración de flavonoides totales de un extracto optimizado de hojas de <i>P. quadrangularis</i> bajo condiciones de estrés con hidrólisis.	74
Figura 6-7. Concentración de flavonoides totales del extracto optimizado de hojas de <i>P. quadrangularis</i> bajo condiciones de estrés con hidrólisis básica (NaOH 0.1 N, Reflujo por 8 horas).	75
Figura 6-8. Perfil cromatográfico del extracto optimizado de <i>P. quadrangularis</i> en el punto final de la evaluación de estabilidad bajo condiciones de estrés por hidrólisis básica (NaOH 0.1 N, Reflujo por 8 horas).	76
Figura 6-9. Espectro UV del producto de degradación (C1) generado en la degradación del extracto optimizado de hojas de <i>P. quadrangularis</i> en reflujo con NaOH 0.1 N durante 8 horas.	77
Figura 6-10. Mecanismo de reacción en la degradación de flavonoides por exposición a medio básico.	78
Figura 6-11. Cantidad relativa de flavonoides presentes en el extracto optimizado de hojas de <i>P. quadrangularis</i> y productos de degradación en el estudio de estabilidad bajo condiciones de estrés con hidrólisis básica (NaOH 0.1 N, Reflujo por 8 horas).	79
Figura 6-12. Concentración de flavonoides totales del extracto optimizado de hojas de <i>P. quadrangularis</i> bajo condiciones de estrés con hidrólisis ácida (HCl 0.1 N, Reflujo por 8 horas).	81
Figura 6-13. Perfiles cromatográficos del extracto optimizado de <i>P. quadrangularis</i> en la evaluación de estabilidad bajo condiciones de estrés por hidrólisis ácida.	82

Figura 6-14. Cantidad relativa de flavonoides presentes en el extracto hidroalcohólico de hojas de <i>P. quadrangularis</i> y productos de degradación en el estudio de estabilidad bajo condiciones de estrés con hidrólisis básica (HCl 0,1 N, Reflujo por 8 horas).....	83
Figura 6-15. Mecanismo de reacción en la degradación de flavonoides C-diglicosilados por exposición a medio ácido y calentamiento.....	85
Figura 6-16. Cantidad relativa de flavonoides presentes en el extracto optimizado de hojas de <i>P. quadrangularis</i> y productos de degradación en el estudio de estabilidad bajo condiciones de estrés con peróxido de hidrogeno (H ₂ O ₂ al 30% durante 24 horas).....	87
Figura 6-17. Cantidad relativa de flavonoides presentes en el extracto optimizado de hojas de <i>P. quadrangularis</i> en el estudio de estabilidad bajo condiciones de estrés con peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂ al 30% por 24 horas).....	88
Figura 6-18. Estructura química de los núcleos de flavonas y flavonoles.	89
Figura 6-19. Concentración de flavonoides totales del extracto optimizado de hojas de <i>P. quadrangularis</i> bajo condiciones de estrés fotolíticas.	90
Figura 6-20. Cantidad relativa de flavonoides presentes en el extracto optimizado de hojas de <i>P. quadrangularis</i> en condiciones de estrés fotolítica.....	91
Figura 6-21. Concentración de flavonoides totales del extracto optimizado de hojas de <i>P. quadrangularis</i> en la evaluación de la estabilidad intermedia y acelerada.	92
Figura 6-22. Perfil cromatográfico del extracto optimizado de hojas de <i>P. quadrangularis</i> en la evaluación de estabilidad intermedia y acelerada (Día 180 de muestreo).....	95

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 3-1. Tratamientos evaluados en el diseño experimental para la determinación de las mejores condiciones de extracción de FT en hojas de <i>P. quadrangularis</i>	18
Tabla 3-2. Contenido de FT en cada uno de los extractos obtenidos de acuerdo al Diseño Factorial Fraccionado	24
Tabla 3-3. Análisis RSREG para determinar el tipo de efecto del modelo estadístico empleado para evaluar la influencia de algunos factores en la extracción de FT a partir de hojas de <i>P. quadrangularis</i>	26
Tabla 3-4. Análisis RSREG para determinar la significancia de los factores e interacciones del modelo estadístico empleado para evaluar la influencia de algunos factores en la extracción de FT a partir de hojas de <i>P. quadrangularis</i>	26
Tabla 3-5. Reproducibilidad del proceso de extracción optimizado en FT en hojas de <i>P. quadrangularis</i>	28
Tabla 4-1 Gradiente de elución de las fases móviles empleado para la cuantificación de una saponina en extracto hidroalcohólico de hojas de <i>P. quadrangularis</i>	36
Tabla 4-2. Resultados obtenidos en la evaluación del parámetro de precisión intra-día.....	44
Tabla 4-3. Resultados obtenidos en la evaluación del parámetro de precisión intermedia	45
Tabla 4-4. Parámetros estadísticos determinados en la evaluación de la linealidad del sistema cromatográfico para la cuantificación de una saponina (Pq-Sap2) en el extracto hidroalcohólico de hojas de <i>P. quadrangularis</i>	46
Tabla 4-5. Pendientes e interceptos hallados para las curvas de regresión 1 y 2.....	48
Tabla 4-6. Concentración de Pq-Sap2 en los extractos hidroalcohólicos del diseño experimental factorial fraccionado.....	51
Tabla 5-1. Caracterización de las localidades de Neiva y Rivera.	54
Tabla 5-2. Parámetros climatológicos de las localidades de colecta (Neiva y Rivera).	56
Tabla 5-3. Datos climatológicos de la localidad de Neiva en época de seca (2015) y época de lluvias (2016).	56

Tabla 5-4. Cantidad relativa de los flavonoides individuales presentes en los extracto hidroalcohólicos de hojas de <i>P. quadrangularis</i> colectadas en dos épocas de diferentes.....	60
Tabla 6-1. Condiciones evaluadas en el estudio de estabilidad intermedia y acelerada.....	72
Tabla 6-2. Cantidad relativa de flavonoides C-glicosilados presentes en el extracto optimizado de hojas de <i>P. quadrangularis</i> durante la evaluación de la estabilidad intermedia y acelerada.	94

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura Término

ACN	Acetonitrilo
ASE	Accelerated solvent extraction
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficiencia
CV	Coeficiente de variación
D.E	Desviación estándar
DAD	Detector de arreglo de diodos
DDE	Diseño de experimentos
DFF	Diseño factorial fraccionado
ELSD	Evaporative light scattering detector
EtOH	Etanol
FT	Flavonoides totales
HCl	Ácido clorhídrico
HR	Humedad relativa
ICH	International Committee of Harmonization
i.d	Internal diameter
IR	Infrarrojo
LDC	Límite de detección
LDD	Límite de cuantificación
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
MADR	Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural
Max	Máximo
MeOH	Metanol
MV	Material vegetal

Abreviatura Término

N	Normalidad
NaOH	Hidróxido de sodio
T	Temperatura
T	Tiempo
OMS	Organización mundial de la salud
PBS	Solución de buffer fosfatos
pH	Potencial de hidrogeniones
Pq-Sap2	9,19-ciclolanost- 24-Z-en-1 β ,3 β ,21,26-tetraol-3-O- β -glucósido
R	Coefficiente de regresión lineal
RSM	Response surface methodology
RSREG	Regresión de modelos con una superficie de respuesta cuadrática
SEM	Standard error of the mean
SNC	Sistema nervioso central
UCE	Ultrasonic circulating extraction
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization

Símbolos

Símbolos Término

%	Porcentaje
<	Menor a
\pm	Más o menos
°C	Grados Celsius
λ	Longitud de onda
Z	Indica posición <i>cis</i>
°	Grados

Unidades de medida

Símbolo Término

μ g	Microgramos
---------	-------------

mg	Miligramos
G	Gramos
Kg	Kilogramos
μ L	Microlitros
mL	Mililitros
L	Litros
min	Minutos
S	Segundos
μ m	Micrómetro
nm	Nanómetro
mm	Milímetros
cm	Centímetro
Lux	Luxes
h	Hora
mba	Milibares

Introducción

La familia Pasiflorácea es nativa de los trópicos y semi-trópicos de Norte, Centro y Suramérica, posee 18 géneros y 630 especies, siendo el género *Passiflora* el más importante debido a que abarca aproximadamente 500 especies diferentes (Hernández y Bernal, 2000).

Colombia es el país con la mayor diversidad de especies de *Passiflora* en el mundo con un registro de 167 especies, 24% más que Brasil y más del doble que Perú y Venezuela. De estas 167 especies, alrededor del 50% poseen un potencial económico y comercial importante, siendo las de mayor relevancia el maracuyá (*P. edulis* var. *flavicarpa*), la granadilla (*P. ligularis*), la gulupa (*P. edulis* var. *edulis*), cosechadas en su gran parte en los departamentos de Cundinamarca, Huila, Valle del Cauca, Antioquia y el eje cafetero; así mismo, cholupa (*P. maliformis*) y badea (*P. quadrangularis*) en el Huila y curuba (*P. tripartita* var. *mollissima*) principalmente en Boyacá, Norte de Santander y Tolima (MADR, 2005; Ocampo y Merlin, 2014).

Sin embargo, el potencial económico de las especies de *Passiflora* no se debe exclusivamente a la utilización de sus frutos en la industria alimentaria por sus cualidades de sabor y aroma. Recientemente, otros campos de acción se han interesado en el estudio de los frutos y hojas de diferentes especies de este género por el potencial uso y desarrollo de productos nutraceuticos, cosméticos y fitoterapéuticos (Carvajal et al., 2010).

Las hojas de las passifloras en la medicina tradicional son usadas como sedantes o calmantes, haciendo de gran interés el estudio de compuestos bioactivos presentes en este género. En el caso específico de *P. quadrangularis*, se conoce que las hojas han sido empleadas como calmante y para el tratamiento de golpes, artritis, hipertensión,

diabetes, neuralgias y descongestionante (Dhawan, Dhawan, y Sharma, 2004; Ingale y Hivrale, 2010).

En la década de los 70 la organización mundial de la salud (WHO-World Health Organization) se convirtió en la principal impulsora del reconocimiento del potencial de la medicina tradicional y de la utilización de las plantas medicinales en la salud pública. En la década de los 80 bajo la resolución WHO 40.33, se reglamentó aseguramiento de la calidad de los medicamentos derivados de medios vegetales tradicionales y aplicar estándares adecuados y buenas prácticas de manufactura. De ahí, áreas científicas como la fitoquímica, la farmacología y la etnofarmacología entre otras, pasaron de la caracterización, elucidación y evaluación de compuestos químicos y su actividad en la salud humana al desarrollo de productos fitoterapéuticos (Ponz, 2005).

De igual manera, la industria farmacéutica podría ver gran potencial no sólo en los frutos sino también en las hojas de esas especies como materia prima para la formulación productos cosméticos y fitoterapéuticos. Este último representaría un nuevo beneficio para todo el sector, debido a que se daría un valor agregado al cultivo de *Passiflora* en Colombia, en especial al de badea.

Es de resaltar que para el desarrollo de esta investigación se emplearon las hojas de *P. quadrangularis*, material que es uno de los subproductos de la cosecha del fruto el cual es comercializado. Es por esta razón, que los resultados en este proyecto contribuirán a la generación de valor agregado a este cultivo constituyendo un impacto positivo tanto en el campo ambiental como en el social de nuestro país.

Es así como el presente trabajo busca contribuir a la estandarización de un extracto de hojas de *P. quadrangularis* como etapa fundamental para el futuro diseño y desarrollo de productos fitoterapéuticos con actividad sedante.

1. Marco Teórico

1.1 *Passiflora quadrangularis*

Comúnmente conocida con los nombres de badea, granadilla gigante, granadina, parcha, tumbo y granadilla real. Es originaria del continente americano, de clima tropical y su cultivo se ha extendido por los trópicos bajos, encontrándose actualmente en países como Malasia, Tailandia, Indonesia y algunos países del lejano oriente (Robledo, 2004).

En Colombia la badea se cultiva entre 0-1500 m.s.n.m principalmente en los departamentos de Antioquia, Caldas, Chocó, Cundinamarca, Huila, Magdalena, Meta, Nariño, Norte de Santander, Quindío, Risaralda, Santander, Tolima y Valle del Cauca (Ocampo et al., 2007). Esta planta se caracteriza por ser una enredadera de abundante follaje, con tallos cuadrangulares y hojas elípticas de aproximadamente 30 cm de longitud. La flor es característica debido a su coloración morada, verde, blanco y rojo y entre 8 y 12 cm de diámetro. Su fruto es una baya oblongada y puede alcanzar tamaños hasta de 30 cm de largo y 15 cm de ancho y de acuerdo con su estado de maduración su color puede ser amarillo-verdoso. El mesocarpio es grueso, carnoso, dulce y de color blanco y semillas duras, aplanadas, obovadas, con arilo de color salmón traslucido, jugoso y subácido (Sarmiento, 1986).

Los frutos de badea son ampliamente utilizados ya que el arilo presenta características organolépticas bastante agradables en lo que respecta a sabor y aroma. Principalmente se usa para la preparación de jugos, postres, dulces, mermeladas y en mezcla con el mesocarpio se emplean para la elaboración de dulces, gelatinas y pasteles. Cuando el fruto aún no ha completado la maduración puede ser consumido como un vegetal (Duque y Pérez, 2005).

Figura 1-1. Fotografía de las hojas, fruto y flor de *Passiflora quadrangularis*.



Fotografía tomada por el Autor.

1.1.1 Caracterización química de *P. quadrangularis*

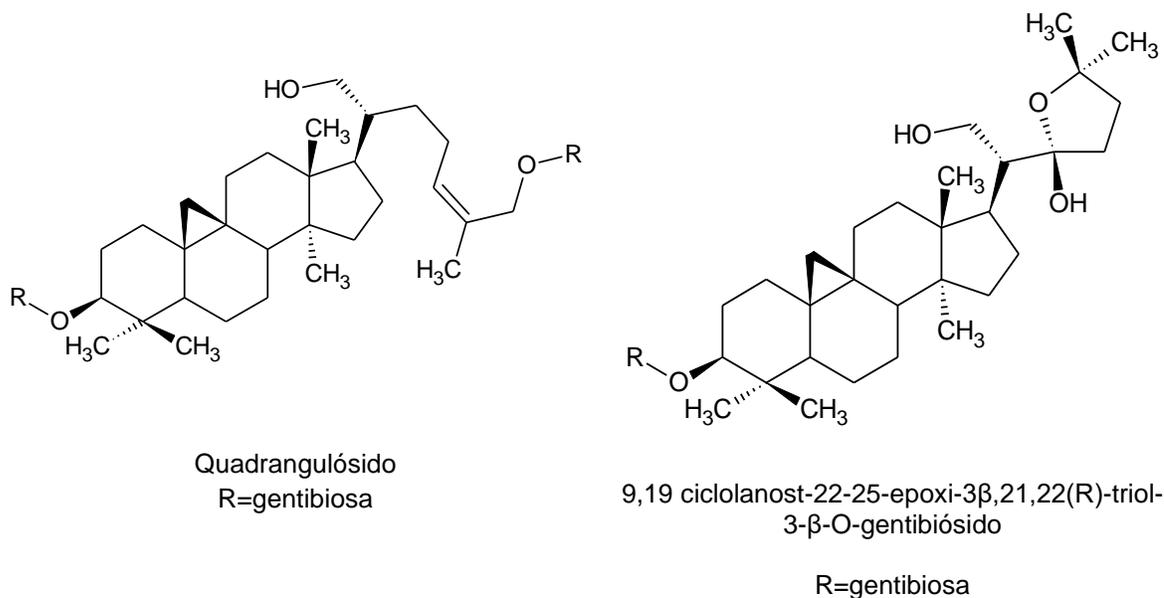
Para el fruto de badea se han realizado estudios químicos de compuestos volátiles debido a que estos son los responsables de ciertas características organolépticas del fruto. Se ha logrado determinar que cerca del 59,1% de dichos compuestos corresponden a alcoholes (monoterpenos o monoterpénos 28,8%, alcoholes alifáticos 23,3% y alcoholes aromáticos 7%), ácidos carboxílicos 32,8% y otros compuestos con estructura miscelánea 8,1% (Duque y Pérez, 2005). De igual forma, se han elucidado los siguientes monoterpenos para la pulpa de badea, ácido (2*E*)-2,6-dimetil-2,5-heptadienoico, ácido (2*E*)-2,6-dimetil-2,5-heptadienoico-D-glucopiranosiléster, (5*E*)-2,6-dimetil-5,7-octadien-2,3-diol, (3*E*)-3,7-dimetil-3-octen-1,2,6,7-tetrol; 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2*H*)-furanona- β -D-glucopiranosido (Osorio, Duque, Koami y Fujimoto, 1999; Osorio, Duque y Fujimoto, 2000).

Sin embargo, dentro de los primeros reportes que se encuentran con respecto a la caracterización química de *P. quadrangularis* se logró aislar y elucidar tres saponinas a

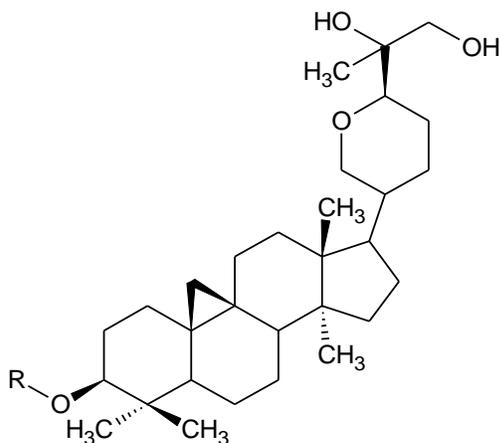
partir del extracto metanólico de hojas de *P. quadrangularis*. Estos compuestos correspondieron a triterpenos glicosidados de núcleo cicloartano, siendo el más característico de esta especie el 9,19-ciclanost-24-Z-en-3 β ,21,26-triol-3,26-di-O-gentiobiosido, también conocido como quadrangulósido. Las otras dos saponinas fueron elucidadas como 9,19-ciclanost-22,25-epoxi-en-3 β ,21,22(R)-triol-3 β -O-gentiobiosido (llamada también 22-hidroxi-iso-quadrangulósido) y 9,19-ciclanost-21,24-epoxi-en-3 β 25,26-triol-3 β -O-gentiobiosido. También fue descrita otra saponina de distinto núcleo, el ácido oleanólico 3-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosido (Orsini et al., 1985; Orsini et al.,1987).

Estudios más recientes corroboran la presencia del quadrangulósido reportado por Orsini (1985) en extractos acuosos de *P. quadrangularis*. Costa (2013) identifico la presencia de dicha saponina en hojas de badea además de aislar y elucidar la estructura química de 3 nuevas saponinas, las cuales fueron reportadas como: 9,19-ciclanost-24-Z-en-1 α ,3 β ,21,26-tetraol-3-O- β -D-glicopiranosido, 9,19-ciclanost-24-Z-en-1 β ,3 β ,21,26-tetraol-3-O- β -D-glicopiranosido y ácido-3-O- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil-oleanólico.

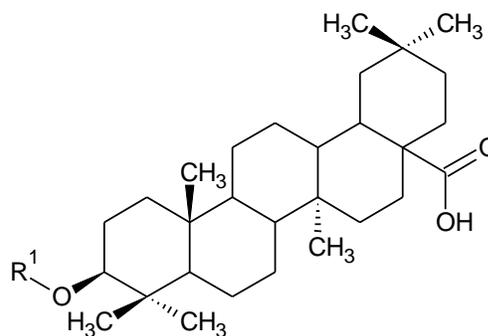
Figura 1-2: Estructura química de algunas saponinas reportadas para *P. quadrangularis*.



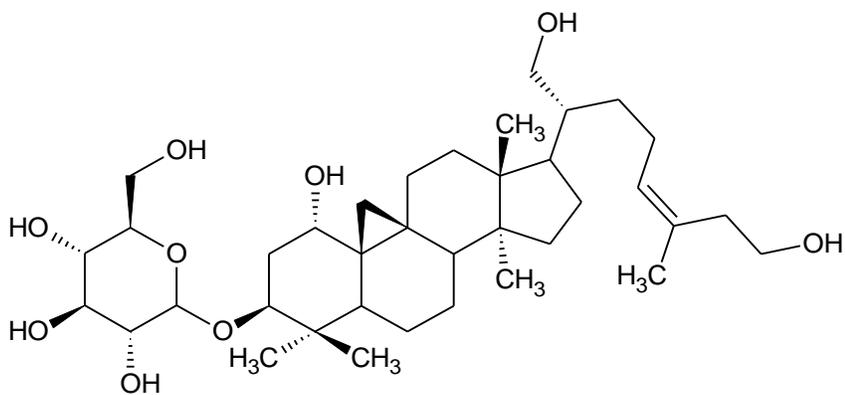
Aporte a la estandarización del proceso de obtención de un extracto de hojas de
Passiflora quadrangularis



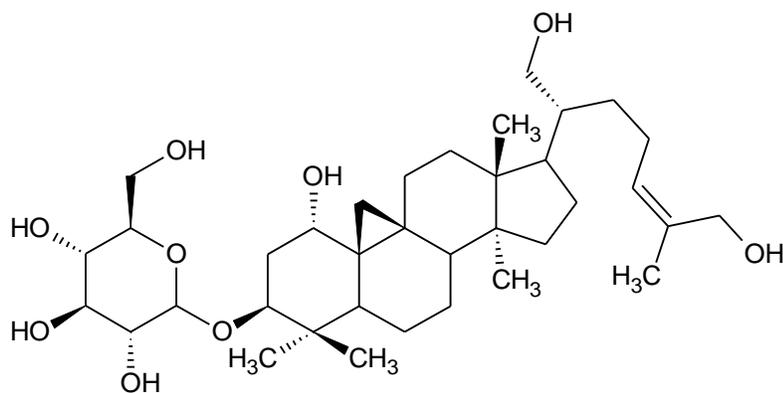
9,19-ciclanostano-21,24-epóxi-3 β -25,26-triol-
3 β -O-gentiobiosido
R=gentibiosa



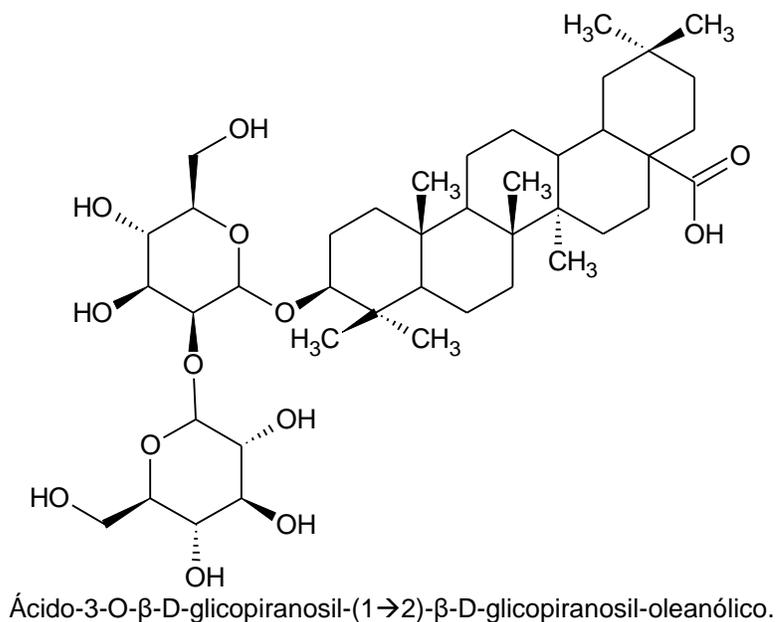
Ácido 3-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-
glucopiranosido oleanólico
R¹=glucosa



9,19-ciclanost-24-Z-en-1 α ,3 β ,21,26-tetraol-3-O- β -D-glicopiranosido

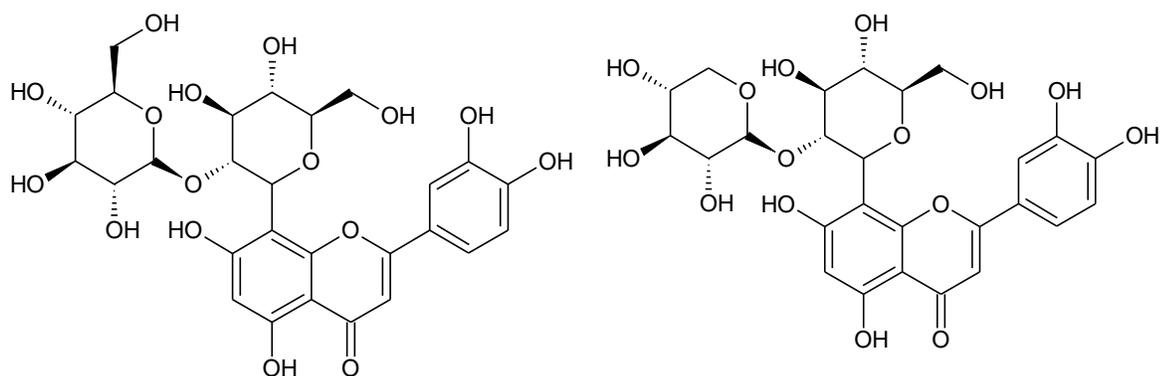


9,19-ciclanost-24-Z-en-1 β ,3 β ,21,26-tetraol-3-O- β -D-glicopiranosido



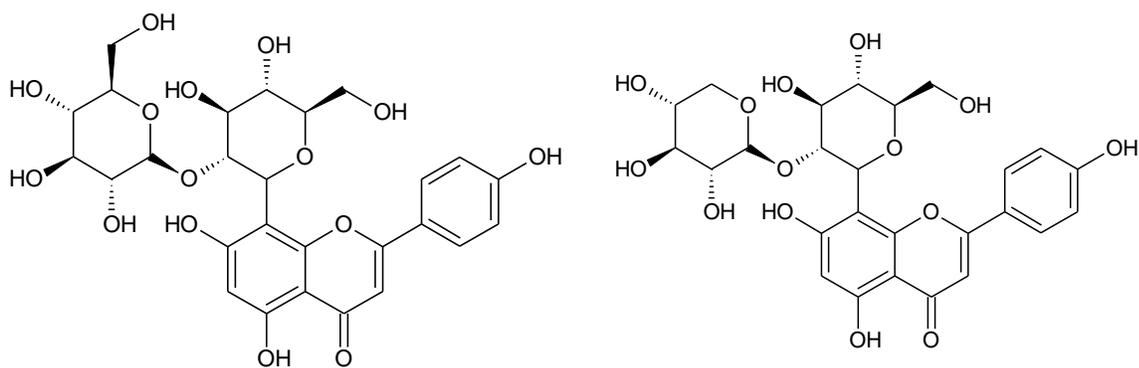
Otro grupo de metabolitos secundarios de gran para *P. quadrangularis* son los flavonoides, en especial flavonoides tipo C-glucósidos. Específicamente, para esta especie se ha reportado la presencia de vitexina-2''-O-glucósido, vitexina-2''-O-xilósido (flavonoides mayoritario), orientina-2''-O-glucósido, orientina-2''-O-xilósido y vitexina (Figura 1-3) (Sakalem, Negri y Tabach, 2011; Zucolotto et al., 2012; Costa et al., 2016). Adicionalmente, Costa et al. (2013) compararon los perfiles químicos de *P. quadrangularis* y *P. alata* con el objetivo de identificar posibles marcadores químicos que permitieran diferenciar estas dos especies similares morfológicamente, encontrando que los flavonoides mayoritarios (derivados de vitexina) podrían contribuir a la diferenciación de las especies, siendo para el extracto acuoso de *P. quadrangularis* el flavonoide mayoritario vitexina-2''-O-xilósido mientras que para *P. alata* fue vitexina-2''-O-ramnósido.

Figura 1-3. Estructura química de algunos flavonoides descritos para las hojas de *P. quadrangularis*



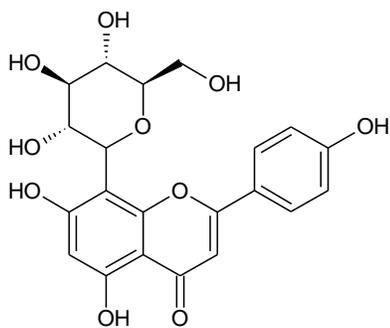
Orientina 2''-O-glicosido

Orientina 2''-O-xilósido



Vitexina 2''-O-glicosido

Vitexina 2''-O-xilósido



Vitexina

1.1.2 Actividad farmacológica de *P. quadrangularis*.

Se han realizado pocos estudios farmacológicos con extractos de *P. quadrangularis*, algunos de ellos con abordajes biodirigidos con el objetivo de identificar sustancias activas responsables de las actividades farmacológicas reportadas para esta especie. Dentro de las actividades reportadas para esta especie, se encuentran actividades sobre el sistema nervioso central (SNC), antihemorrágica, hemolítica y antihelmíntica (Otero et al.,2000; Ingale y Hivrale, 2010).

Con respecto a la actividad sobre el SNC, Castro et al. (2007) comprobaron en un sistema *in vivo* la actividad ansiolítica de extractos acuosos e hidroalcohólicos de hojas de *P. quadrangularis*. Las pruebas realizadas en este estudio fueron laberinto elevado, campo abierto y plataforma agujerada. Como control negativo utilizaron solución salina, como control positivo diazepam (2.5 mg/kg) mientras que las dosis de los extractos (acuoso e hidroalcohólico) evaluadas vía oral fueron 100, 250 y 500 mg/Kg. De acuerdo con la evaluación farmacológica llevada a cabo en este estudio, ambos extractos mostraron alteración del comportamiento de los ratones, causando disminución en la actividad motora espontanea. Sin embargo, se concluyó que fueron los extractos hidroalcohólicos los que tuvieron efecto ansiolítico debido a que en la prueba de laberinto elevado este extracto presentó un aumento en el tiempo de permanencia de los ratones en los brazos abiertos. De igual manera, se presentó un aumento en la deambulación en la prueba de campo abierto y en comparación con el diazepam, no se encontraron diferencias en los resultados obtenidos para los extractos en el modelo de la plataforma agujerada.

Gazola (2014) comprobó la actividad sedante de *P. quadrangularis* a través de la evaluación del extracto acuoso de las hojas de esta especie en los modelos de campo abierto e hipnosis inducida por éter etílico a dosis de 30, 60, 100, 300 y 600 mg/Kg administrados vía oral. En este estudio se concluyó que el extracto acuoso a 60 mg/Kg presento actividad de tipo sedante debido a la presencia de los flavonoides.

Gazola et al. (2015) también evaluaron la actividad sedante del extracto acuoso del pericarpio de *P. quadrangularis* identificando el compuesto mayoritario (apigenina) y

proponiendo la participación de la vía GABAérgica en su mecanismo de acción. La actividad sedante fue evaluada por el modelo de hipnosis inducido por éter etílico. La participación de los receptores GABA_A/Benzodiacepina en la actividad sedante de la apigenina, el flavonoide mayoritario del extracto se evaluó después de la administración intraperitoneal de flumazenil. Dentro de los resultados obtenidos se determinó que el extracto acuoso (100 y 300 mg/Kg) al igual que la apigenina a 0.6 mg/Kg (flavonoide mayoritario) administrados vía oral, presentan efecto sedante en ratones de laboratorio

Otra de las actividades reportadas para *P. quadrangularis* es la actividad anti-hemorrágica. El estudio el efecto de las hojas y ramas de *P. quadrangularis* sobre la neutralización del efecto hemorrágico del veneno *Bothrops atrox* fue reportado por Otero y colaboradores en 2000. Para la obtención del extracto el material vegetal fue sometido a percolación con etanol durante dos días. La evaluación de la actividad farmacológica (efecto antihemorrágico) se realizó inyectando en la cavidad abdominal el extracto etanólico o el veneno de *Bothrops atrox* disuelto en una solución de buffer fosfatos (PBS), y luego de dos horas los ratones fueron sacrificados por inhalación de éter para cuantificar el diámetro área hemorrágica. El veneno utilizado en el ensayo fue extraído por ordeño de 40 ejemplares capturados en la región. Los ensayos de neutralización del efecto hemorrágico del veneno se llevaron a cabo a nivel *in vitro* e *in vivo*. Dentro de los resultados encontrados se evidenció que el extracto de *P. quadrangularis* neutralizó el efecto hemorrágico del veneno de la serpiente en dosis superiores a 4 mg/ratón (Otero et al., 2000).

1.2 Estandarización de extractos

La estandarización es definida como el proceso de prescripción de un conjunto de normas, parámetros constantes, definiciones de valores cuantitativos y características cualitativas que permitan garantizar la calidad, la eficiencia, la seguridad y la reproducibilidad de una medicina herbal o fitoterapéutico (WHO ,1996a ; WHO, 1996b).

La estandarización junto con el control de calidad involucran aspectos desde la selección, almacenamiento y caracterización fisicoquímica de la droga hasta el suministro de la información del producto final al consumidor y la promoción del mismo (WHO, 1996a, WHO,1996b; Folashade, Omoregie y Ochogu, 2012).

Para el aseguramiento de la calidad de los fitoterapéuticos es necesario realizar un proceso de estandarización previo de las preparaciones herbarias de las cuales proceden. En dicho proceso se debe identificar, cuantificar y controlar el contenido del principio activo, evaluar la efectividad y garantizar la reproducibilidad en la concentración del principio activo en cada lote fabricado (WHO, 2000; Álvarez y Bagué, 2012).

Dentro de las preparaciones herbarias más usadas para el desarrollo de fitoterapéuticos se encuentran los extractos estandarizados, los cuales se caracterizan por tener una concentración fija de uno o más constituyentes a los que son atribuidos la actividad farmacológica (EMA,2009). Para la obtención de los extractos estandarizados es necesario minimizar la variabilidad de los factores y pasos involucrados en el proceso de producción. Variables como el proceso de extracción utilizado, el estado de división de la droga, agitación, temperatura, pH, naturaleza del disolvente y tiempo de extracción pueden afectar la concentración final de los principios activos, influyendo esto a su vez en la calidad, la eficiencia y la seguridad del extracto estandarizado (Sharapin, 2000; Soares y Farias, 2017).

1.3 Estabilidad y vida útil aparente

Otros factores como las condiciones de almacenamiento de los extractos también pueden afectar su calidad y seguridad, ya que durante este proceso se pueden transformar los principios activos presentes en el mismo y generarse productos de degradación, los cuales pueden no tener actividad farmacológica o presentar efectos adversos. Es por esta razón que cuando se están desarrollando productos farmacéuticos a base de material vegetal, en lo posible, se debe evaluar su estabilidad, toxicidad y posibles efectos secundarios (Cañigueral, Dellacassa y Bandoni, 2003).

La estabilidad es definida como la capacidad del principio activo de un producto en general, para mantener sus propiedades con respecto a su identidad, concentración y/o potencia, pureza y apariencia física. Por ende, el propósito de las pruebas de estabilidad es proporcionar evidencia de cómo la calidad de un principio activo o producto final varía con el tiempo bajo la influencia de una variedad de factores (WHO, 2003).

Dentro de las pruebas más usadas para evaluar la estabilidad, se encuentran las pruebas de estabilidad natural, intermedia o acelerada, las cuales son realizadas bajo condiciones controladas de almacenamiento y evalúan la influencia de factores como la temperatura, la humedad y la luz sobre la calidad del principio activo. Como resultado final de estas pruebas se puede establecer un tiempo de vida útil y recomendar condiciones de almacenamiento (WHO, 2017).

Otras pruebas comúnmente realizadas para evaluar la estabilidad de un principio activo son las pruebas de estabilidad bajo condiciones de estrés, las cuales tienen como objetivo evaluar la susceptibilidad del principio activo frente oxidación, fotólisis e hidrólisis a través de un rango justificado de valores de pH. Estas pruebas pueden ayudar a identificar los probables productos de degradación, lo que a su vez, puede ayudar a establecer las vías de degradación y la estabilidad intrínseca de la molécula (WHO, 2017).

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Contribuir a la estandarización del proceso de obtención de un extracto de hojas de *Passiflora quadrangularis*.

2.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de algunas variables del proceso de extracción de hojas de *P. quadrangularis* sobre el contenido de flavonoides totales y de quadrangulósido.
- Evaluar la influencia de la localidad y época de recolección sobre el contenido de flavonoides totales y el contenido del quadrangulósido en un extracto de hojas de *P. quadrangularis*.
- Determinar el tiempo de vida útil aparente del extracto obtenido de hojas de *P. quadrangularis* de acuerdo al contenido de flavonoides totales.

3. Evaluación del efecto de algunas variables del proceso de extracción sobre el contenido de flavonoides totales (FT) de hojas de *P. quadrangularis*.

Como se mencionó anteriormente, variables como el proceso de extracción utilizado, el estado de división de la droga, agitación, temperatura, pH, naturaleza del disolvente y tiempo de extracción influyen directamente en la concentración final del compuesto o compuestos de interés en el extracto estandarizado.

Lograr establecer cuáles de estas variables son las que específicamente influyen y en qué nivel deben trabajarse para optimizar el proceso puede llegar a ser todo un desafío debido al número de ensayos que deberían realizarse. Para reducir el número de experimentos se recurre al diseño de experimentos (DDE), los cuales son técnicas estadísticas dirigidas a organizar la experimentación de forma que se realicen el mínimo de pruebas posibles y maximizar la información obtenida de los experimentos, facilitando la interpretación de los resultados obtenidos y optimizando la configuración de un proceso o producto (Luceño y González, 2004).

La metodología de superficie de respuesta (RSM, por sus siglas en inglés, *response surface methodology*) es un conjunto de técnicas avanzadas de diseño de experimentos (DDE). Suele utilizarse para refinar los modelos después de determinar los factores importantes utilizando los diseños factoriales, generando las ecuaciones que explican la manera en que los cambios en las variables afectan la respuesta de interés y los gráficos donde se muestra el modelamiento de la variable respuesta. Esto permite entender e identificar una región específica en los gráficos de superficie de respuesta hallando los niveles de las variables que optimizan la respuesta (Lewis, Mathieu y Phan-Tan-Luu, 1999).

En el presente trabajo, la variable respuesta a optimizar es el contenido de flavonoides totales que pueden ser extraídos de hojas de *P. quadrangularis*, ya que reportes previos los han relacionado con la actividad farmacológica sobre sistema nervioso central (Gazola, 2014).

3.1 Metodología

3.1.1 Colección de material vegetal

La recolección de las hojas de *Passiflora quadrangularis* se llevó a cabo en las localidades del Neiva (Longitud: 75° 12' 5.839; Latitud: 2° 52' 01.599) y Rivera (Longitud: 75° 13' 94.938; Latitud: 2° 45' 41.899) del departamento de Huila, Colombia. La identificación del material vegetal fue realizada por el profesor Carlos Albero Parra del Instituto Nacional de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia y se depositó una copia de los especímenes de cada localidad en el Herbario de la Universidad Nacional, los cuales fueron identificados con números de colección COL 589240 y COL 589241 respectivamente (Anexo A).

3.1.2 Secado y pulverización del material vegetal

Con el objetivo de establecer el tiempo adecuado del secado del material se realizó un ensayo preliminar de secado del material vegetal a condiciones de 50°C±2, en el que se evaluó el contenido de materia seca cada 24 horas durante 72 horas. A partir de este se estableció que el material colectado debía someterse al proceso de secado en un horno con aire circulante a 50°C durante 72 horas para obtener así una humedad residual de 11% adecuada para mantener la estabilidad química y microbiológica del mismo (Sharapin, 2000). Posteriormente el material vegetal (MV) fue pulverizado en un molino de cuchillas.

3.1.3 Distribución de tamaño de partícula del material vegetal molido.

Para determinar la distribución de tamaño de partícula se utilizó el método de retención por tamices para lo cual se colocó 100 g de material vegetal pulverizado en una batería de tamices que se dejó en vibración durante 10 minutos. Los tamices empleados fueron USP No. 20, 40, 60, 80 y 100, los cuales corresponde a luz de malla de 0.850; 0.425, 0.250; 0.180 y 0.059 mm respectivamente.

3.1.4 Obtención de los extractos hidroalcohólicos

Con base en reportes previos acerca de la influencia del método de extracción sobre la concentración de flavonoides, se encontró que utilizando percolación se logra una mayor extracción de estos compuestos en comparación con otros métodos como maceración (Hong, Santana, Rodríguez y Aguilar, 1999 ; Xiuling y Wei, 2005; Chanda y Kaneria, 2012). Por esta razón y pensando en un posible escalado, se escogió la percolación como método para extracción de los flavonoides presentes en las hojas de *P. quadrangularis*, además de ser un método de extracción exhaustivo que no involucra calentamiento, lo cual no causa degradación de los compuestos presenten en el material a evaluar por acción de temperatura.

Una vez escogido el método de extracción se procedió a establecer, con base en la literatura, las variables que serían incluidas dentro del diseño experimental para optimizar la extracción de flavonoides totales del material vegetal. Como resultado de la revisión bibliográfica se escogieron la relación droga-disolvente, el disolvente de extracción (proporción EtOH: H₂O) y el tiempo de extracción como las variables o factores a analizar en el proceso de optimización del extracto en términos de contenido de flavonoides totales. Cada una de estas variables se analizó en tres niveles diferentes (alto, medio y bajo) y el diseño de los tratamientos se estableció mediante un diseño factorial fraccionado (DFF) 3³⁻¹ obteniéndose al final nueve tratamientos, los cuales son descritos en la Tabla 3.1.

Tabla 3-1. Tratamientos evaluados en el diseño experimental para la determinación de las mejores condiciones de extracción de flavonoides totales en hojas de *P. quadrangularis*.

Tratamiento	Relación Droga: Disolvente	Disolvente de extracción EtOH: H ₂ O	Tiempo de extracción (h)
1	1:10	1:3	24
2	1:10	1:1	72
3	1:10	3:1	48
4	1:15	1:1	48
5	1:15	1:3	72
6	1:20	1:3	48
7	1:15	3:1	24
8	1:20	1:1	24
9	1:20	3:1	72

Una vez obtenidos los extractos hidroalcohólicos correspondientes a cada uno de los tratamientos, se eliminó el etanol por presión reducida utilizando un rotaevaporador bajo condiciones de 40°C (baño de María) y presión de 100 mba por un tiempo de 2 horas aproximadamente. Posteriormente, se congelaron los extractos a -20±2 °C y fueron liofilizados para eliminar el agua remanente.

3.1.5 Cuantificación de flavonoides totales por CLAE-DAD

La determinación del contenido de flavonoides totales se realizó de acuerdo a la metodología de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) reportada por Medina (2014). Los análisis fueron realizados en un cromatógrafo líquido Shimadzu® con desgasificador DGU-20, dos bombas binarias LC-6AD, sistema detector de arreglo de diodos SPD M20-A, horno para columna CTO-20A, automuestreador SIL-20A HT y módulo de comunicación CMB-20A. El software con el cual se realizó la adquisición y posterior procesamiento de datos fue *LabSolutions LC software*.

Como fase móvil se trabajó un gradiente de elución, donde la fase móvil A correspondió a H₂O: ACN: CH₃COOH (90:10:1) y la fase móvil B fue ACN: H₂O: CH₃COOH (90:10:1), con flujo de 1.0 mL/min. Como fase estacionaria se utilizó una columna C18 Phenomenex® (250 mm x 4,6 mm i.d.; 5 µm), con una temperatura del horno de 28°C y

detección a 340 nm. Se inyectaron 10 μ L del extracto liofilizado disuelto en MeOH: H₂O (1:1) en una concentración de 1 mg/mL y previamente filtrado en membrana PVDA (0.22 μ m). La cuantificación de flavonoides totales fue realizada por el método del estándar externo, utilizando vitexina como compuesto de referencia (Fluka®, 96%).

Por último, la cuantificación de los flavonoides se determinó mediante la ecuación previamente reportada por Medina (2014) en la validación de la metodología analítica.

Ecuación 3-1

$$y = 16856x + 5351.1$$

Donde y corresponde a la sumatoria de las áreas de las señales cromatográficas correspondientes a los flavonoides de orientina 2"-O-glucósido, orientina 2"-O-xilósido, orientina, vitexina 2"-O-glucósido, vitexina 2"-O-xilósido y vitexina.

Adicionalmente, la cantidad relativa (expresada en porcentaje) de cada uno de los flavonoides mencionados anteriormente fue calculada mediante la ecuación 3-2.

Ecuación 3-2

$$\text{Cantidad relativa (\%)} = \frac{\text{Área de la señal cromatografica del compuesto}}{\text{Sumatoria de las áreas de todas la señales cromatograficas}} \times 100$$

3.1.6 Evaluación de la actividad farmacológica sedante

Con el fin de comprobar si la actividad farmacológica demostrada en trabajos previos para las hojas de *P. quadrangularis* y atribuida a los flavonoides totales (Gazola, 2014) se mantenía en el extracto optimizado, se evaluó la actividad sedante mediante la inducción del sueño por éter etílico, siguiendo los lineamientos reportados por Gazola et al. (2015).

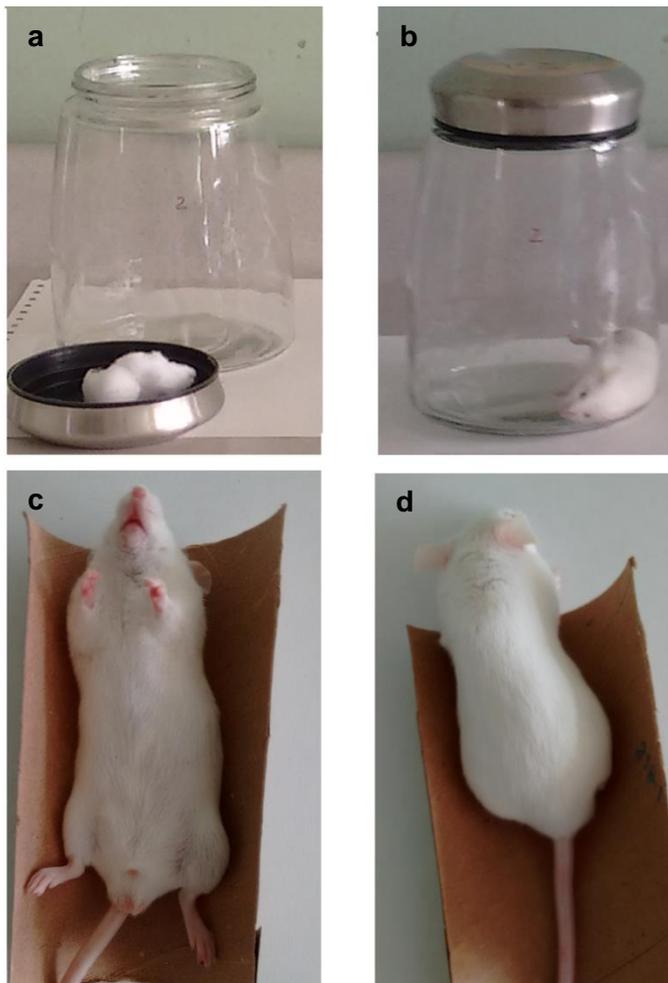
Para esto, se utilizaron ratones macho Suizos ICR de 10-12 semanas de edad y aproximadamente 35 g de peso. Los animales fueron suministrados por el bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia y estuvieron bajo

condiciones de temperatura constantes ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$), ciclos de 12 horas de luz/oscuridad y consumo de agua y alimento *ad libitum*. El bioensayo contó con el aval Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional (Acta 02 de la reunión realizada el día 7 de marzo de 2016-Anexo B).

El ensayo se llevó a cabo con 4 grupos de animales (n=10 animales por grupo), los cuales correspondieron al vehículo (agua destilada), diazepam como control positivo (1 mg/Kg disuelto en agua destilada), el extracto obtenido por infusión de hojas de *P. quadrangularis* (60 mg/Kg resuspendido en agua destilada) y el extracto hidroalcohólico estandarizado (60 mg/Kg resuspendido en agua destilada). La infusión fue preparada de acuerdo con el procedimiento reportado por Medina (2014).

Previo ayuno de 12 horas, todos los tratamientos fueron suministrados por vía oral (0.1 mL/mg) una hora antes del inicio de ensayo, exceptuando el control positivo el cual se suministró 30 minutos antes. Pasado este tiempo cada animal fue colocado en una cámara de vidrio (previamente saturada con 5 mL de éter etílico durante 5 minutos) durante un minuto y medio para garantizar la pérdida del reflejo postural. Posteriormente, se sacaron de la cámara y se colocaron en posición de supino dorsal y se cronometró el tiempo hasta que retomaran la posición de supino ventral.

Figura 3-1 Ensayo de inducción del sueño por éter etílico



a) Cámara de vidrio sin saturar. La tapa del recipiente fue adaptada para colocar un trozo de algodón para la incorporación de éter etílico. b) ratón en la cámara saturada con 5 mL de éter etílico, c) ratón en posición de supino dorsal y d) ratón en posición de supino ventral.

3.1.7 Análisis Estadístico

El procedimiento RSREG del Software SAS versión 9.0 fue utilizado para la realización de la metodología de superficie de respuesta con covariables. Para el análisis de los datos de la actividad sedante farmacológica se utilizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba Dunnett (95%) utilizando el software GraphPad Prism Version 7.0

3.2 Resultados y discusión

3.2.1 Determinación de la distribución de tamaño de partícula del material vegetal molido de hojas de *P. quadrangularis*.

La reducción del tamaño de partícula tiene 3 finalidades principales, las cuales son facilitar la manipulación, el almacenamiento y la realización de procesos extractivos. A continuación, se muestran los histogramas de distribución de tamaño de partícula para el material vegetal secado y molido recolectado en cada una de las localidades en estudio.

Figura 3-2. Distribución de tamaño de partícula para el material colectado en la localidad de Rivera, Huila.

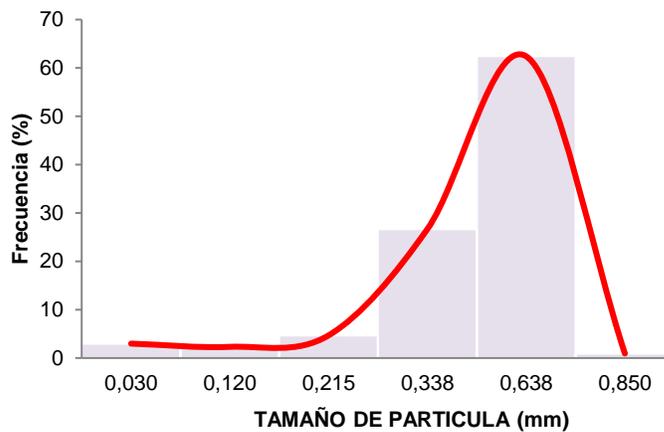
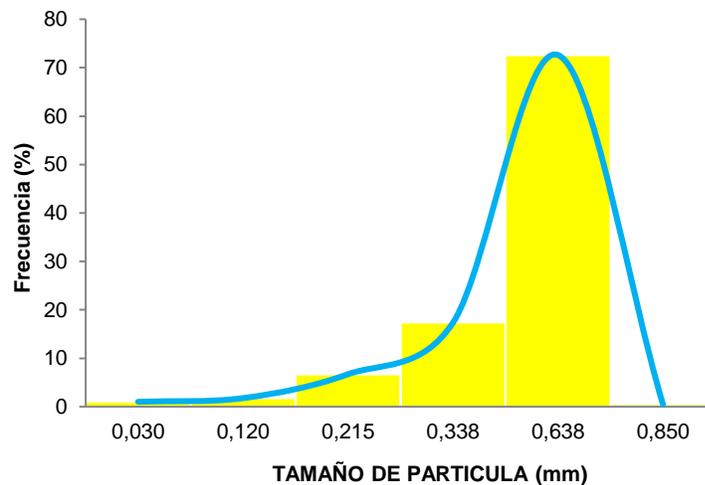


Figura 3-3. Distribución de tamaño de partícula para el material colectado en la localidad de Neiva, Huila.



Como se puede apreciar en las Figuras 3-3 y 3-4, aproximadamente el 90% del material vegetal se retuvo entre los tamices 60 y 40. Por ende, se decidió agrupar el material vegetal retenido en los tamices 40 (tamaño nominal de apertura 0.425 mm) y 60 (tamaño nominal de apertura 0.250 mm) en una proporción 70:30 respectivamente, lo cual nos permite clasificarlo de acuerdo a las especificaciones de la guía “Quality control methods for medicinal plant materials” de la WHO como moderadamente grueso (WHO, 2011), el cual es el tamaño de partícula recomendado por la farmacopea Brasileira para la producción de extractos o tinturas a nivel industrial (Agencia Nacional de vigilancia sanitaria, 2010)

3.2.2 Obtención de los extractos hidroalcohólicos

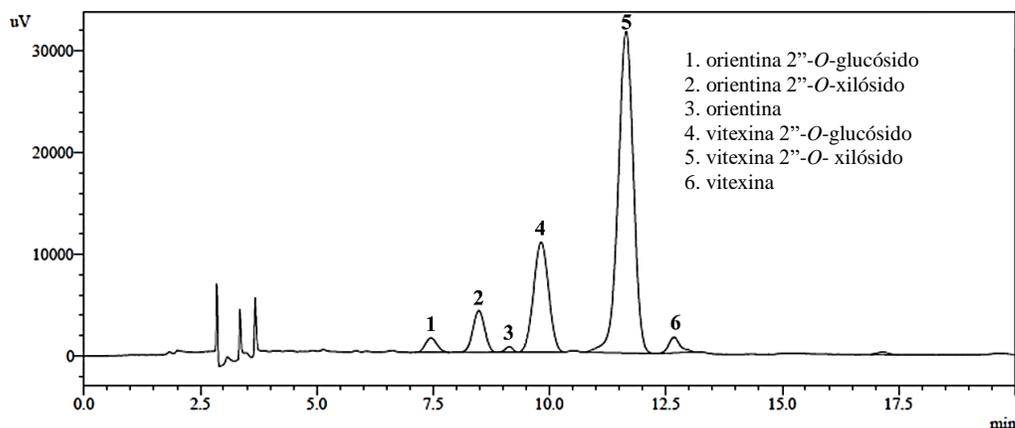
Una vez obtenidos los extractos secos correspondientes a cada tratamiento se realizó la cuantificación de los flavonoides totales por CLAE, igualmente se calculó la abundancia relativa de cada uno de los flavonoides presentes con el fin de evidenciar un posible cambio en el perfil de flavonoides del extracto. La concentración de flavonoides totales se muestra en la Tabla 3-2.

En los perfiles cromatográficos obtenidos para los nueve tratamientos se encontró la presencia de orientina, flavonoide que anteriormente no había sido reportado en los *extractos acuosos obtenidos por infusión de hojas de P. quadrangularis* (Costa, 2013; Costa et al., 2013; Medina, 2014). Este resultado se puede deber a que al cambiar algunas variables principalmente una disminución en la polaridad del disolvente que favorece la extracción de este flavonoide de la matriz. A manera de ejemplo, en la Figura 3.4 se muestra el perfil cromatográfico de uno de los extractos hidroalcohólicos obtenidos

Tabla 3-2. Contenido de flavonoides totales en cada uno de los extractos obtenidos de acuerdo con el diseño factorial fraccionado.

TTO	Concentración de flavonoides totales (FT)*	Cantidad relativa de cada flavonoide presente en el extracto (%)					
		orientina 2''-O-glucósido	orientina 2''-O-xilósido	orientina	vitexina 2''-O-glucósido	vitexina 2''-O-xilósido	Vitexina
1	61.883±2.31	3.8 ± 0.01	10.6 ± 0.35	0.4 ± 0.01	21.1 ± 0.06	63.1 ± 0.71	1.2 ± 0.08
2	68.012±3.01	2.0 ± 0.12	6.9 ± 0.14	0.5 ± 0.08	22.3 ± 0.08	67.1 ± 0.30	1.1 ± 0.05
3	61.697±0.74	2.0 ± 0.02	7.0 ± 0.05	0.6 ± 0.02	22.5 ± 0.08	66.7 ± 0.02	1.2 ± 0.05
4	71.049±0.81	2.6 ± 0.16	8.3 ± 0.12	0.6 ± 0.01	21.8 ± 0.08	65.7 ± 0.16	1.0 ± 0.19
5	61.854±2.14	3.7 ± 0.03	11.2 ± 0.05	0.5 ± 0.01	21.2 ± 0.03	62.3 ± 0.18	1.1 ± 0.18
6	64.440±2.02	2.7 ± 0.67	7.8 ± 0.12	0.5 ± 0.04	22.0 ± 0.07	65.9 ± 0.61	1.2 ± 0.07
7	68.888±0.58	2.0 ± 0.18	6.9 ± 0.09	0.5 ± 0.03	22.3 ± 0.26	66.8 ± 0.76	1.5 ± 1.01
8	65.157±0.29	2.0 ± 0.15	6.8 ± 0.14	0.5 ± 0.09	22.3 ± 0.06	67.2 ± 0.40	1.3 ± 0.04
9	75.819±0.16	2.0 ± 0.10	6.7 ± 0.19	0.6 ± 0.02	22.4 ± 0.08	67.2 ± 0.50	1.2 ± 0.01

* Concentración de flavonoides totales (FT) expresada como mg-equivalente de vitexina/g extracto seco. Número de réplicas analíticas n=3. Los datos se presentan como la media de las observaciones ± Error Estándar.

Figura 3-4. Perfil cromatográfico de un extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis*

La cuantificación de FT se realizó bajo las siguientes condiciones cromatográficas: Fase Estacionaria: Columna C18 Phenomenex Luna® (250 mm x 4,6 mm i.d. 5 µm). Fase Móvil: Fase A agua:acetonitrilo:ácido acético (90:10:1); Fase B acetonitrilo:agua:ácido acético (90:10:1), el gradiente inicia en 11% de la fase B de 0 a 5 minutos, 11% a 15% de la fase B de 5 a 20 min en gradiente lineal. Flujo de 1 mL/min. Temperatura del horno: 28 °C. Volumen de inyección: 10 µL. Longitud de onda de detección (λ): 340 nm.

Como se puede observar en la Tabla 3-2, se presentaron diferencias significativas entre la concentración de flavonoides totales de los diferentes extractos elaborados de acuerdo con el diseño estadístico experimental. Sin embargo, en todos ellos vitexina 2"-O-xilósido se presentó como el flavonoide mayoritario. Este resultado es coherente con el reportado por Costa et al. (2013) y Costa et al. (2016) donde identifica este compuesto como mayoritario en el extracto acuso de hojas de *P. quadrangularis*, además de proponerlo como marcador químico para la diferenciación entre esta especie y *P. alata*.

Con respecto a los derivados de orientina, el contenido de estos flavonoides varió levemente de acuerdo con las condiciones de extracción de cada tratamiento. Se evidenció un ligero aumento en el contenido de orientina 2"-O-glucósido y orientina 2"-O-xilósido así como una disminución importante del contenido de los flavonoides derivados de vitexina en los tratamientos 1 y 5 donde se utilizó en el disolvente de extracción la proporción EtOH: H₂O 1:3. Este comportamiento pudo deberse a la afinidad del disolvente empleado la cual aumenta con el aumento en la proporción de agua dentro de la mezcla. Este hecho favorece la extracción de los flavonoides derivados del núcleo luteolina los cuales presentan un mayor número de hidroxilos fenólicos generando una mayor polaridad en estos compuestos.

Al analizarse los datos únicamente con el modelo del diseño experimental de factorial fraccionado se podría concluir que el mejor tratamiento para la extracción del mayor contenido de flavonoides totales fue bajo las condiciones de relación droga: disolvente 1:20, con una relación de EtOH:H₂O 3:1 por un periodo de 72 horas (Tratamiento 9. Tabla 3). Sin embargo, este diseño tiene la limitante de no permitir analizar las interacciones triples, por ende no es modelo más adecuado para la optimización del proceso de extracción. Para establecer las condiciones óptimas de extracción se decidió utilizar la metodología de superficie de respuesta (MSR) con un diseño de tipo central compuesto (DCC).

Al realizarse el análisis por la MSR, se determinó cuáles factores fueron significativos en el proceso de extracción y en qué niveles estos favorecieron el aumento del contenido de FT en el extracto optimizado. En las Tablas 3-3 y 3-4 se muestran los resultados obtenidos aplicando el procedimiento RSREG (Regresión de modelos con una superficie

de respuesta cuadrática) del Software SAS versión 9.0 donde se establece el tipo de modelo que describe la variable respuesta a optimizar (Contenido de flavonoides totales) y la significancia de cada factor dentro del proceso de extracción.

Tabla 3-3. Análisis RSREG para determinar el tipo de efecto del modelo estadístico empleado para evaluar la influencia de algunos factores en la extracción de FT a partir de hojas de *P. quadrangularis*.

Regresión	GL*	Suma de cuadrados	R cuadrado	valor F	Pr > F
Lineal	3	301.083609	0.5246	39.4	0.0001*
Cuadrática	2	37.429771	0.0652	7.35	0.0050
Producto Cruzado	3	192.106256	0.3347	25.14	0.0001*
Modelo Total	8	530.619637	0.9246	26.04	0.0001*

* Valor significativo ($p=0.005$)

Tabla 3-4. Análisis RSREG para determinar la significancia de los factores e interacciones del modelo estadístico empleado para evaluar la influencia de algunos factores en la extracción de FT a partir de hojas de *P. quadrangularis*.

Factor	GL	Estimado	Error Estándar	Pr > [t]
Intercepto	1	17.158713	11.399565	0.15060
Relación Droga-Disolvente	1	7.638003	2.034603	0.00160*
Disolvente de extracción	1	-0.478175	0.298813	0.12800
Tiempo de extracción	1	0.046431	0.091251	0.61740
Relación Droga-Disolvente x Disolvente de extracción	1	0.039862	0.005940	0.00010*
Relación Droga-Disolvente x Tiempo de extracción	1	-0.022365	0.011120	0.06040
Disolvente de extracción x Tiempo de extracción	1	0.007243	0.002116	0.00320*

* Valor significativo ($p<.005$)

Con base en estos resultados se estableció que el modelo que describe el comportamiento de las variables es de tipo lineal y altamente significativo (Tabla 3-3) y se determinó que el factor de la relación droga – solvente fue el único parámetro significativo en el proceso de extracción. El comportamiento de esta variable muestra un perfil en forma de n, es decir que la concentración de FT aumenta a medida que aumenta la relación droga - solvente hasta 1:15 y disminuye cuando aumenta 1:20. No obstante,

la interacción de relación droga-disolventextiempo de extracción y la relación droga-disolvente x disolvente de extracción también tuvieron un efecto sobre la variable respuesta.

Igualmente se estableció que la ecuación de regresión que describe el comportamiento de la variable respuesta (Ecuación 3-2) es:

Ecuación 3-3

$$FT = 17.158713 + 7.638003 f1 + 0.039862f1 * f2 + 0.007243f2 * f3$$

Dónde:

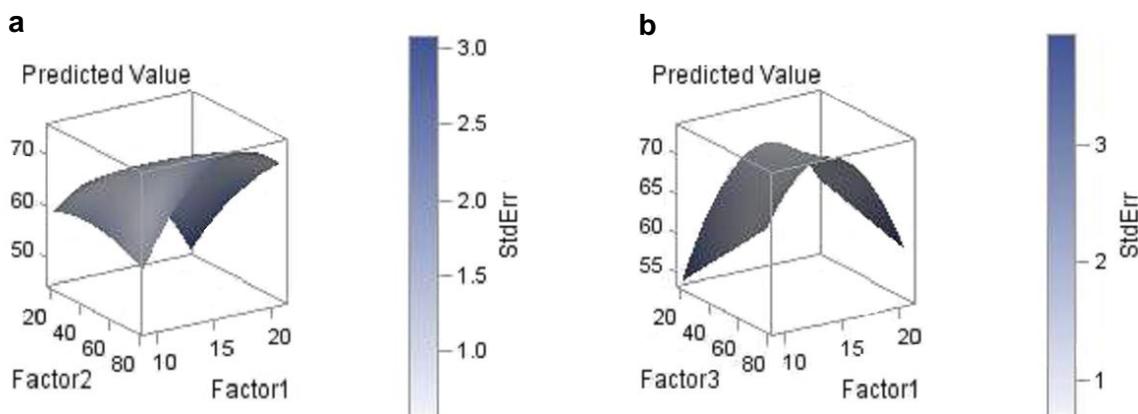
f1 = Relación droga- disolvente

f2 = Disolvente de extracción (EtOH:H₂O).

f3 = tiempo de percolación

Por medio del procedimiento RSREG también se logró elaborar los diagramas de superficie de respuesta, los cuales permiten ver el comportamiento entre los factores evaluados (Figura 3-5a y 3-5b). A través de estos diagramas se identifica el punto donde la curvatura alcanza su máximo; este punto llamado punto estacionario es escogido como el punto óptimo cuando se encuentra ubicado dentro de la región experimental evaluada. De acuerdo con los diagramas de superficie obtenidos en el análisis de MSR para la optimización del contenido de flavonoides totales de hojas de *P. quadrangularis* se alcanzó el punto estacionario cuando el factor 1 (relación droga-disolvente) fue 15.192, el factor 2 (disolvente de extracción) 50.962 y el factor 3 (tiempo de percolación) 48.923. Por ende, se definió como condiciones óptimas de extracción de los FT utilizando el método de percolación, una relación droga-disolvente 1:15, con una proporción EtOH:H₂O de 1:1(o Etanol al 50%) y un tiempo de percolación de 48 h.

Figura 3-5. Diagramas de superficie del contenido de flavonoides totales en extractos de hojas de *P. quadrangularis* en función de la interacción entre factores.



a) Factor 1 x Factor 2: Relación Droga-Disolvente x Disolvente de extracción

b) Factor 1 x Factor 3: Relación Droga-Disolvente x Tiempo de extracción

Una vez establecidas estas condiciones se realizaron tres lotes de extracto con el fin de evaluar la reproducibilidad del proceso. Los resultados se muestran en la Tabla 3-3. De acuerdo con los coeficientes de variación obtenidos, los cuales no fueron superiores al 5%, se establece que el proceso de extracción de flavonoides totales de hojas de *P. quadrangularis* es reproducible.

Tabla 3-5. Reproducibilidad del proceso de extracción optimizado en FT en hojas de *P. quadrangularis*

LOCALIDAD	Concentración de Flavonoides Totales*			Promedio	S	CV
	Lote 1	Lote 2	Lote 3			
Rivera	65.714	67.132	63.027	65.291	2.085	3.193

* Concentración de flavonoides totales (FT) expresada como mg-equivalente de Vitexina / g extracto seco.

Al comparar el contenido de FT para el extracto optimizado por percolación obtenido con el material vegetal colectado en Rivera (65.291 ± 2.085 mg- equivalentes de vitexina/g de extracto) respecto al hallado para el extracto obtenido por infusión reportado por Medina (2014) (55.1 mg-equivalentes de Vitexina/g de extracto liofilizado) se evidenció un incremento de los flavonoides del 17.0% en el extracto hidroalcohólico con respecto al extracto acuoso, lo que demuestra que todo el proceso de optimización realizado para aumentar la concentración de FT fue efectivo. El porcentaje de rendimiento de los

extractos también mostró diferencias significativas entre ellos, ya que para el extracto acuoso obtenido por infusión el porcentaje de rendimiento fue del 2.1% mientras que para el extracto hidroalcohólico fue del 38.0%.

Otros autores también han estandarizado y optimizado procesos extractivos de flavonoides con base en el diseño de experimentos. Por ejemplo, Noriega et al. (2012) trabajaron en la extracción de flavonoides de hojas de *P. alata* y *P. edulis* considerando el método de extracción (percolación y maceración) y la mezcla en diferentes proporciones de etanol y agua como factores dentro del diseño experimental. De acuerdo con los resultados en esta investigación, el tipo de extracción no tiene un efecto significativo sobre la concentración de FT (determinado por espectrofotometría UV) mientras que la concentración de etanol influye sobre la variable respuesta, específicamente en el rango de 50-75% de etanol aumentó la extracción de flavonoides y disminuyó cuando el disolvente de extracción fue solamente etanol. Este último resultado es similar al obtenido en el proceso de optimización del extracto de hojas de *P. quadrangularis* en términos de contenido de flavonoides totales en donde se estableció como disolvente de extracción una proporción de EtOH:H₂O (1:1).

Gomes y colaboradores trabajaron en el desarrollo de un método para la extracción de compuestos fenólicos, principalmente flavonoides, de 17 especies de *Passiflora* – incluyendo *P. quadrangularis*– empleando extracción acelerada con disolventes (ASE- *Accelerated solvent extraction*) donde los factores evaluados fueron la temperatura, el disolvente y los ciclos de extracción. La parte de la planta estudiada en las 17 especies fueron las hojas y los flavonoides cuantificados fueron orientina, isorientina, vitexina, isovitexina y rutina. Se establecieron como condiciones óptimas de extracción de flavonoides por el método de ASE temperatura de 80 °C. 64% (v/v) de etanol y 5 ciclos de extracción encontrando específicamente en las hojas de *P. quadrangularis* orientina en concentraciones detectables, vitexina en concentraciones por debajo del límite cuantificable, isovitexina en concentración de 2.60± 0.079 mg/g extracto mientras isorientina y rutina no fueron detectadas en la muestra (Gomes et al., 2017). Es importante resaltar que estos autores son los primeros en reportar la presencia de isovitexina en extractos de esta *passiflora*, no obstante, este resultado será discutido más

adelante en el capítulo 6 referente a la estabilidad y determinación de la vida útil aparente del extracto de hojas de *P. quadrangularis*.

En flores de *Trollius chinensis* también se han optimizado procesos para la extracción de vitexina y orientina. En este caso, el método de extracción empleado por ellos fue “Ultrasonic circulating extraction (UCE)” encontrando que las condiciones operacionales optimas fueron etanol al 60%, una velocidad de agitación de 1000 rpm, temperatura de 30°C, tiempo de sonicación de 28 min, una relación droga-disolvente de 1:10 y una amplitud de 738 W (Chen, Zhang, Liu, Gu y Yang, 2017).

En dicho estudio, la concentración de etanol tuvo un efecto significativo sobre la concentración de estos dos flavonoides, encontrándose que cuando la fracción volumétrica de etanol aumentaba de 0 a 60%, la extracción de orientina se incrementaba mientras que el contenido de vitexina no mostro cambio evidente. Este resultado es coherente con los encontrados durante el proceso de optimización de la extracción de flavonoides en hojas de *P. quadrangularis* donde se encontró orientina en los extractos hidroalcohólicos a diferencia del extracto obtenido por infusión. Por el contrario, el contenido de ambos compuestos disminuyó drásticamente cuando la fracción volumétrica de etanol de 60 – 95%. Este comportamiento puede ser explicado por el hecho de que la adición de etanol conduce a la reducción de la constante dieléctrica del disolvente de extracción, facilitando así la solubilidad y difusión de los compuestos (Bonfigli, Godoy, Reinheimer y Scenna, 2017). Sin embargo, porcentajes altos de etanol puede generar la deshidratación de las células y la desnaturalización de las proteínas de la pared celular, lo que dificulta su difusión al medio (Amendola et al., 2010; Galvan D’Alessandro et al., 2012).

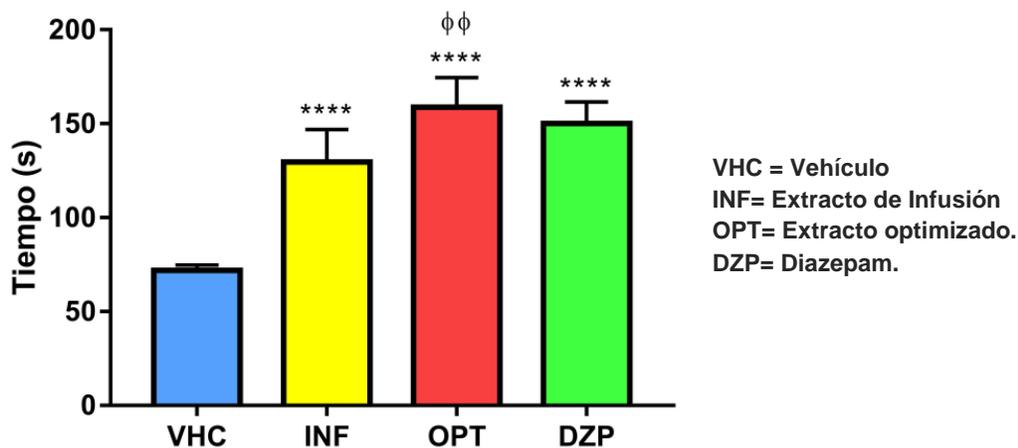
Los DDE han sido empleados en otras técnicas de extracción para la optimización de la extracción de flavonoides totales en otros materiales vegetales. Tal vez las más reportadas actualmente son aquellas relacionadas con la extracción asistida por ultrasonido (Espada-Bellido et al., 2017; Grosso et al., 2014; P. Huang et al., 2017; W. Huang, Xue, Niu, Jia, & Wang, 2009; Pan, Yu, Zhu, & Qiao, 2012) pero no son las únicas. Bimakr et al., compararon la cantidad de flavonoides totales extraída por soxhlet versus la cantidad obtenida por extracción con fluidos súper críticos (CO₂) de hojas de *Mentha*

spicata L. encontrando que, aunque el rendimiento fue mayor por Soxhlet con etanol al 60% el perfil cromatográfico del extracto obtenido por CO₂ supercrítico mostraba mayor variedad de flavonoides individuales.

3.2.3 Evaluación de la actividad farmacológica sobre sistema nervioso central (SNC) del extracto optimizado en FT de hojas de *P. quadrangularis*.

Para la evaluación de la actividad sedante tanto del extracto optimizado como de la infusión fue utilizado el material colectado en la localidad de Neiva en época seca. Los resultados obtenidos en este el test de inducción del sueño por éter etílico fueron analizados estadísticamente utilizando una prueba de comparación de medias ANOVA de una vía seguido de un test de Dunnet ($p < 0.05$) y son mostrados en la Figura 3.6

Figura 3-6. Efecto sedante de los extractos de hojas de *P. quadrangularis* sobre el tiempo de inducción del sueño por éter etílico evaluado en ratones por vía oral.



Diazepam (DZP dosis de 1 mg/kg p.o.) fue utilizado como control positivo. El vehículo fue agua destilada. Los Extractos (Infusión e hidroalcohólico) fueron suministrados vía oral a una concentración de 60 mg/Kg (p.o.). Cada grupo se trabajó con un $n=10$ animales. Los datos son expresados como el promedio \pm SEM y fueron analizados mediante un ANOVA de una vía seguido de una prueba Dunnet con un valor de $p < 0.05$. Los valores de significancia están dados por **** $p < 0.0001$ respecto al grupo vehículo, $\phi\phi$ $p < 0.01$ respecto al extracto obtenido por infusión.

De acuerdo con el análisis estadístico de los datos obtenidos, se encontró que tanto el patrón positivo (diazepam) como los extractos de hojas de *P. quadrangularis* (infusión y optimizado) presentaron diferencias altamente significativas con respecto al vehículo, es decir que, el tiempo de sueño aumentó con estos grupos tratados. Este resultado corrobora la actividad sedante previamente reportada para esta especie en hojas (Gazola, 2014).

Por otra parte, al contrastar la respuesta de los extractos entre ellos por medio de una prueba de comparaciones múltiples (ANOVA de una vía seguido por una prueba Tukey ($p < 0.05$) se determinó que si hay una diferencia significativa entre el extracto obtenido por infusión vs el extracto optimizado, lo cual nos permite establecer que el proceso de optimización de la extracción de flavonoides totales del material vegetal contribuye de manera relevante y positiva en el mejoramiento de la actividad farmacológica de las hojas de *P. quadrangularis*.

Previamente, Gazola (2014) demostró bajo este mismo modelo de inducción del sueño por éter etílico, y otros ensayos, que el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* tiene la actividad farmacológica sedante y propuso a los flavonoides totales como los responsables de dicha actividad. Como explicación a este comportamiento, se sugiere como mecanismo de acción de los flavonoides la ruta GABAérgica, debido a que se demostró que los receptores GABA_A/benzodiazepina están implicados en la actividad *in vivo* e *in vitro* de vitexina 2"-O-xilósido (flavonoides mayoritario presente en las hojas de *P. quadrangularis*).

La actividad sedante de otros órganos de esta especie, por ejemplo el pericarpio del fruto, también ha sido reportada previamente. Gazola et al. (2015) encontraron que en dosis de 100-300 mg/Kg el extracto acuoso del pericarpio tuvo efecto sedante aunque a dosis mayores dicho extracto no mostró actividad.

Castro et al. (2007) evaluaron el efecto ansiolítico de dos extractos (acuoso e hidroalcohólico) de hojas de *P. quadrangularis* utilizando los modelos de laberinto en cruz elevado, campo abierto y tablero agujereado. Al comparar los resultados entre los extractos en todas las pruebas antes mencionadas el extracto hidroalcohólico mostró una

mayor actividad, siendo estos resultados coherentes con los encontrados para el extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* versus la infusión.

Igualmente, para otras pasifloras se ha reportado actividad sobre sistema nervioso central, más específicamente actividad sedante y ansiolítica. Este efecto neurofarmacológico esta principalmente atribuido a los flavonoides ampliamente distribuidos en este género y característicos de cada especie (Dhawan et al., 2004)

4. Evaluación del efecto de algunas variables de extracción sobre el contenido de quadrangulósido en hojas de *P. quadrangularis*.

Las saponinas son el segundo grupo de metabolitos derivados de material vegetal que son ampliamente usados en la industria farmacéutica debido a sus propiedades. En estudios previos realizados para extractos de hojas de *P. quadrangularis* se ha reportado la presencia de la saponina 9,19–ciclolanost-24-Z-en-3 β ,21,26-triol-3,26-di-O-gentiobiosido, comúnmente conocido como quadrangulósido (Orsini, et al.,1987; Costa, 2013). Con base en estos hallazgos se decidió para la realización de este trabajo desarrollar una metodología analítica que permitiera la identificación y posterior cuantificación de este compuesto, como una contribución a la caracterización del extracto hidroalcohólico optimizado en flavonoides de hojas de *P. quadrangularis*.

4.1 Metodología

La metodología analítica empleada para la identificación y cuantificación de la saponina presente en hojas de *P. quadrangularis* fue cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) acoplada al detector de arreglo de diodos (DAD) y al detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD-evaporative light scattering detection). El método de patrón interno fue utilizado para la cuantificación del compuesto de interés (quadrangulósido), ya que esa saponina no se encuentra disponible comercialmente.

4.1.1 Condiciones cromatográficas establecidas para el desarrollo y validación de la metodología analítica

Se utilizaron como base para el desarrollo de la metodología analítica para la cuantificación de la saponina en el extracto hidroalcohólico las condiciones cromatográficas descritas por Costa (2013). Los análisis se llevaron a cabo en un equipo HPLC Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000® equipado con módulos de inyección automática, bomba cuaternaria y detector de UV de arreglo de diodos (DAD). El cromatógrafo líquido se acopló a un detector universal evaporativo de dispersión de luz SEDEX LT-ELSD Model 85 LT®. Por último, la integración de los datos se realizó mediante el software Chromeleon Client Versión 6.80.

Como fase estacionaria se usó una columna Phenomenex Bondclone® Fenil (300 x 3.9 mm i.d.; 10 µm). Para la fase móvil se trabajó un gradiente de elución compuesto en su Fase A por H₂O y en la Fase B por ACN, con un flujo de la fase móvil de 1.200 mL/min. El sistema de gradiente se muestra en la Tabla 4.1. La temperatura del horno fue de 30°C y se inyectó un volumen de 5 µL de la muestra y/o estándar.

La adquisición de los perfiles cromatográficos se realizó por UV a 205 nm y las condiciones manejadas para el ELSD fueron: ganancia=12, filtro de 3.0 y temperatura nominal de 80°C. Para la evaluación de los parámetros de validación de la técnica analítica se trabajó con los valores de las áreas obtenidas por DAD a 205 nm.

Como patrón interno se utilizó ácido oleanólico (Sigma Aldrich®). La identificación de la señal cromatográfica correspondiente a quadrangulósido se realizó utilizando el compuesto aislado previamente de hojas de *P. alata* (Costa, 2013).

Tabla 4-1 Gradiente de elución de las fases móviles empleado para la cuantificación de la saponina en el extracto hidroalcohólico de hojas de *P. quadrangularis*.

TIEMPO (min)	Flujo (mL/min)	% Fase móvil A (H ₂ O) %	Fase móvil B (ACN)
0.00	1.200	72.5	27.5
8.00	1.200	71.0	29.0
20.00	1.200	30.0	70.0
21.00	1.200	20.0	80.0
25.00	1.200	25.0	75.0

4.1.2 Identificación de las señales cromatográficas correspondientes a la saponina y ácido oleanólico

Para la identificación de las señales cromatográficas correspondientes al compuesto quadrangulósido y al patrón interno de ácido oleanólico fueron inyectadas soluciones de cada uno en el cromatógrafo¹.

4.1.3 Validación de la técnica por CLAE-DAD-ELSD para la cuantificación de la saponina

En este apartado se mostrará la metodología realizada para llevar a cabo la validación y se especificará detalladamente los parámetros evaluados.

¹ La saponina quadrangulósido no fue identificada en el material vegetal evaluado, por ende se cuantifico el compuesto 9,19-ciclolanost-24-Z-en-1 β ,3 β ,21,26-tetraol-3-O- β -glucósido, el cual para fines del presente escrito será identificado como Pq-Sap2

4.1.3.1 Preparación de las soluciones patrón de la saponina, ácido oleanólico (patrón interno: PI) y muestras

- **Solución de ácido oleanólico utilizada como patrón interno**

Se utilizó como stock una solución de ácido oleanólico a una concentración de 0.5 mg/mL, la cual se preparó disolviendo 5 mg de ácido oleanólico con MeOH (Grado HPLC) y llevando a volumen en un balón aforado de 10 mL.

- **Solución de la saponina Pq-Sap2**

En un micro vial fueron pesados 2 mg de la saponina y se adicionó 1 mL de agua destilada. La muestra fue sometida a agitación constante por 1 minuto en un mezclador de vórtice, para luego tomar alícuotas que permitieran obtener concentraciones finales de 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 y 0.8 mg Pq-Sap2/mL con adición del patrón interno en concentración de 0.25 mg/mL.

- **Muestras de los extractos hidroalcohólicos**

Para la preparación de las muestras se pesaron 100 mg de los extractos hidroalcohólicos secos y se disolvieron en agua destilada hasta alcanzar un volumen de 10 mL en balón aforado. Las muestras fueron agitadas en vórtex hasta la disolución total del extracto. Posteriormente, se tomó una alícuota de 500 μ L de la muestra, se le adicionó 500 μ L de la solución stock de ácido oleanólico y nuevamente se agitó en vórtex para ser filtradas al final con membrana de 0.22 μ m antes de ser inyectada. La concentración final del extracto en la muestra a inyectar en el CLAE fue de 5 mg/mL con adición de estándar interno a una concentración de 0.25 mg/mL.

4.1.3.2 Precisión

De acuerdo con la guía Q2(R1) (Validación de los procedimientos analíticos: texto y metodología) de la ICH, la precisión se define como el procedimiento analítico que expresa la proximidad (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas del

muestreo múltiple de la misma muestra homogénea en las condiciones prescritas. La precisión puede considerarse en tres niveles: repetibilidad (precisión intra-ensayo), precisión intermedia (precisión intermedia) y reproducibilidad y se expresa normalmente como la varianza, la desviación estándar o el coeficiente de variación de una serie de mediciones.

- **Precisión intra-ensayo.** Se evaluó haciendo la inyección de una solución de Pq-Sap2 + PI repetidas veces en el mismo día (10 veces). La concentración de Pq-Sap2 en la solución evaluada fue de 0.5 mg/mL mientras que la del patrón interno fue de 0.25 mg/mL.
- **Precisión intermedia.** Se realizó haciendo la cuantificación de tres soluciones de Pq-Sap2 + PI de diferentes concentraciones del compuesto aislado. Las soluciones empleadas correspondieron a las concentraciones de Pq-Sap2 de 0.3, 0.5 y 0.8 mientras que el patrón interno se encontraba en concentración de 0.25 en cada solución. Cada solución se inyectó por triplicado en tres días diferentes.

4.1.3.3 Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad (dentro de un intervalo dado) para obtener una respuesta que sea directamente proporcional a la concentración (cantidad) del analito en la muestra.

Para la evaluación de este parámetro se realizaron tres curvas de calibración cada una compuesta por cinco diferentes concentraciones de Pq-Sap2 (0.3, 0.4, 0.5, 0.6 y 0.8 mg/mL) todas enriquecidas con ácido oleanólico como patrón interno a una concentración constante (0.25 mg/mL). Cuando se trabaja con el método de patrón interno, la linealidad está dada por la concentración del analito de interés sobre la concentración del patrón interno versus el área del analito de interés sobre el del patrón interno.

4.1.3.4 Límite de detección (LDD) y límite de cuantificación (LDC)

Definido el límite de detección (LDD) por la ICH como la cantidad más baja del analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto. Por otra parte, el límite de cuantificación (LDC) de una metodología analítica es la cantidad más baja del analito en una muestra que se puede determinar cuantitativamente con precisión y exactitud.

El LDD y el LDC se determinaron, realizando seis veces la inyección de tres concentraciones de Pq-Sap2 + PI menores a las del primer punto de las curvas de linealidad. Con los resultados obtenidos se elaboraron dos curvas de regresión. En la curva 1 se graficó la concentración vs el área, mientras que en la curva 2 la concentración vs la desviación estándar de las 6 inyecciones para cada concentración; esto con el objetivo de hallar los valores de Y_{bl} y S_{bl} respectivamente. Estos valores calculados son reemplazados en las siguientes ecuaciones:

Ecuación 4-1 Ecuación empleada en la determinación del límite de detección

$$LDD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b}$$

Ecuación 4-2 Ecuación empleada en la determinación del límite de cuantificación

$$LDC = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b}$$

Dónde:

Y_{bl} : Intercepto curva 1

S_{bl} : Intercepto curva 2

b : La pendiente de la curva establecida en el parámetro de linealidad.

4.1.4 Análisis Estadístico

Se empleó el software Microsoft Excel® para realizar las pruebas estadísticas y las gráficas necesarias para el desarrollo y la validación de la metodología analítica por CLAE-DAD-ELSD. Para evaluar la influencia de los factores sobre la concentración del compuesto de interés se utilizó el procedimiento GML del software SAS.

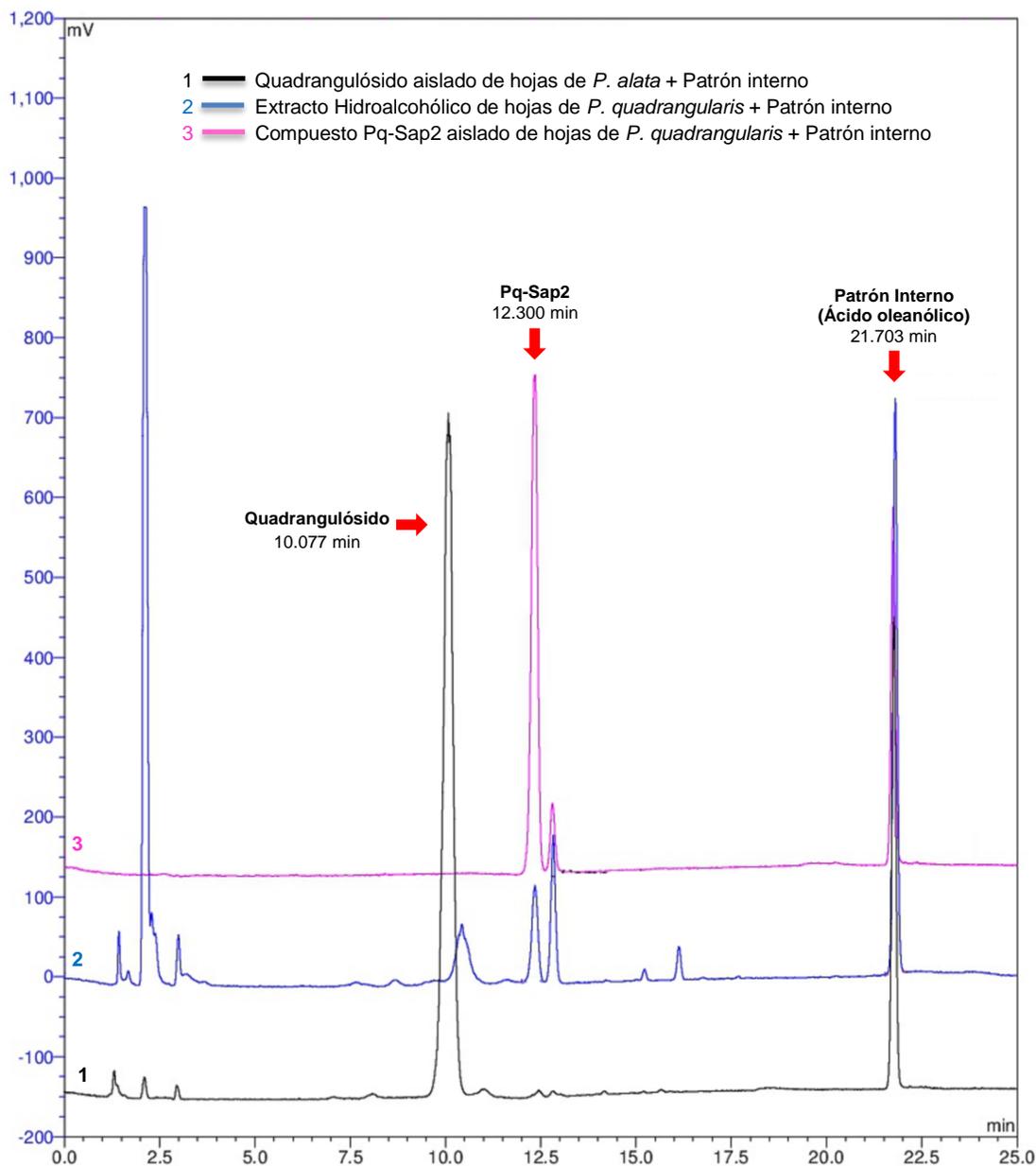
4.2 Resultados

4.2.1 Identificación de la señal cromatográfica correspondiente a quadrangulósido y ácido oleanólico.

Al analizar los perfiles cromatográficos del extracto optimizado obtenidos por DAD a 205 nm y por ELSD (Figuras 4-1 y 4-2) no se evidenció la presencia de una señal cromatográfica en el mismo tiempo de retención del compuesto quadrangulósido (10.07 min) que indicara la presencia de este en la matriz analizada. Después de hacer varias con-inyecciones con estándares y hacer modificaciones sobre condiciones del sistema, se descartó que se presentaran cambios en los tiempos de retención entre inyecciones, ya que ambos patrones (quadrangulósido y ácido oleanólico) presentaron el mismo tiempo de retención (21.70 y 10,07 min) respectivamente.

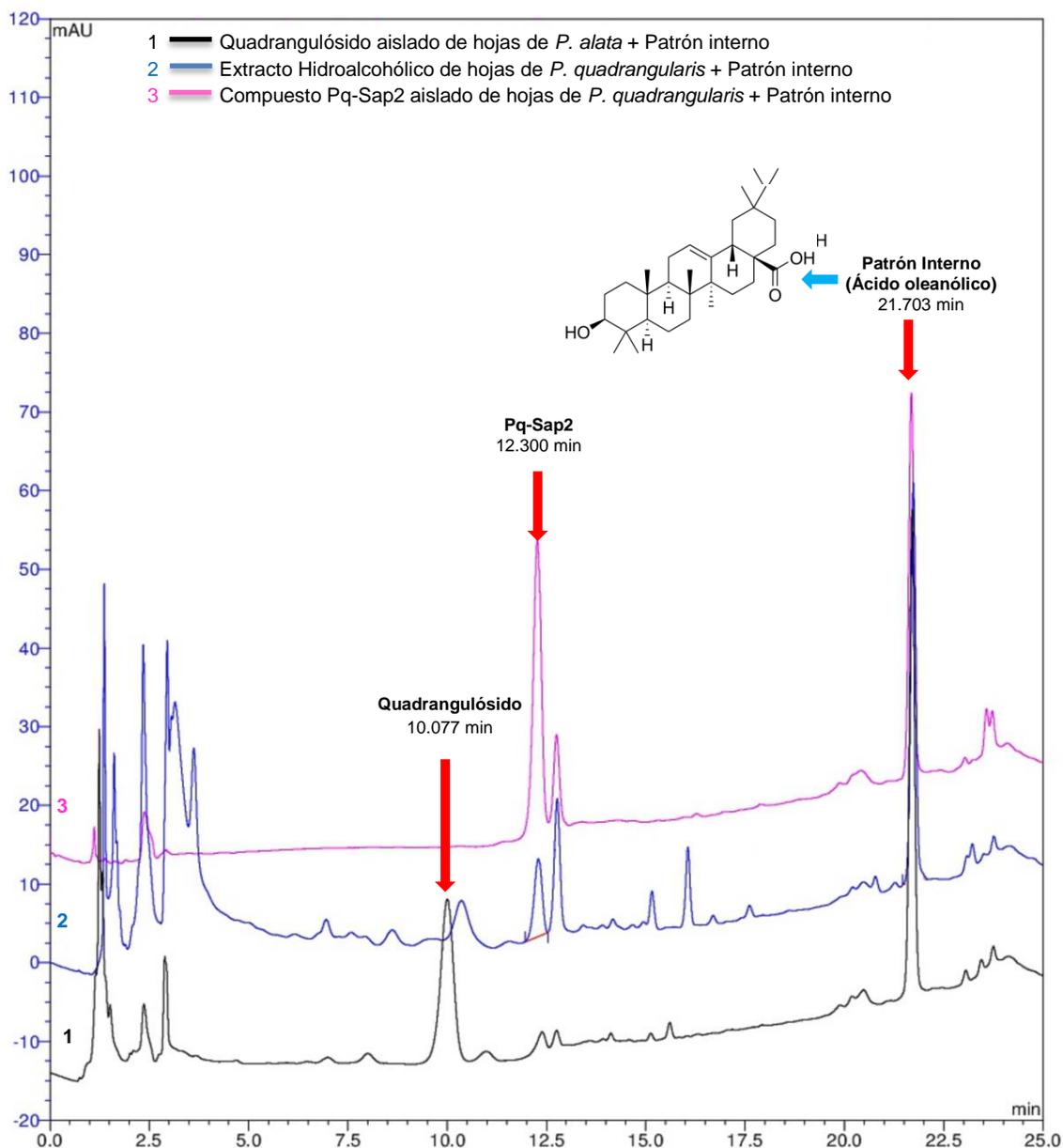
Estos resultados son contradictorios con los reportes previos de la composición química de saponinas identificadas en las hojas de esta *Passiflora* (Orsini et al., 1987; Costa, 2013). Sin embargo, de acuerdo a los resultados hallados en el desarrollo de una tesis de maestría llevada a cabo en paralelo en el grupo de investigación de “Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia” en la que se aislaron y elucidaron las saponinas presentes en un extracto acuso de hojas de *P. quadrangularis* se corroboró que en esta matriz no se encuentra el compuesto quadrangulósido (Urrego, 2017).

Figura 4-1. Perfiles cromatográficos por CLAE-ELSD del extracto optimizado de *P. quadrangularis*, quadrangulósido y Pq-Sap2



La cuantificación de Pq-Sap2 se realizó bajo las siguientes condiciones cromatográficas: Fase Estacionaria: Columna Phenomenex Bondclone® Fenil (300 x 3.9 mm i.d.; 10 µm). Fase móvil A: H₂O; Fase móvil B: ACN. El gradiente inicia en 27.5-29.0% de la fase B de 0 a 8 minutos, 29.0 -70% de la fase B de 8-20 min, 70.0 - 80.0 % de la fase B de por un minuto y finaliza en 75% de la fase B al minuto 25. El Flujo de 1.200 mL/min. Temperatura del horno: 30 °C. Volumen de inyección: 5 µL. Las condiciones manejadas para el ELSD fueron: ganancia:12, filtro:3.0 y temperatura nominal de 80°C.

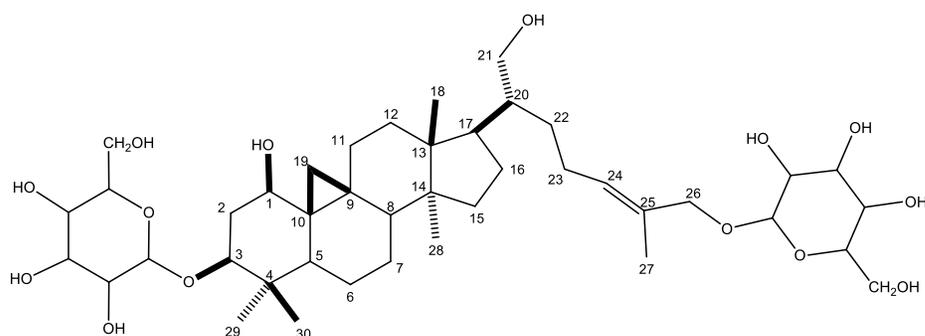
Figura 4-2. Perfiles cromatográficos por CLAE-DAD a 205 nm del extracto hidroalcohólico de *P. quadrangularis*, quadrangulósido y Pq-Sap2



La cuantificación de Pq-Sap2 se realizó bajo las siguientes condiciones cromatográficas: Fase Estacionaria: Columna Phenomenex Bondclone® Fenil (300 x 3.9 mm i.d.; 10 µm). Fase móvil A: H₂O; Fase móvil B: ACN. El gradiente inicia en 27.5-29.0% de la fase B de 0 a 8 minutos, 29.0 -70% de la fase B de 8-20 min, 70.0 - 80.0 % de la fase B de por un minuto y finaliza en 75% de la fase B al minuto 25. El Flujo de 1.200 mL/min. Temperatura del horno: 30 °C. Volumen de inyección: 5 µL. Longitud de onda de detección (λ): 205 nm.

Por ende, fue necesario de acuerdo con las saponinas aisladas y ya identificadas por este grupo de investigación, reemplazar el quadrangulósido por otro compuesto para desarrollar la validación de la metodología para la cuantificación de una saponina en el extracto hidroalcohólico. El compuesto elegido fue 9,19-ciclolanost-24-Z-en-1 β ,3 β ,21,26-tetraol-3-O- β -glucósido, el cual para fines del presente escrito será identificado como **Pq-Sap2**. En la Figura 4.3 se muestra su estructura molecular.

Figura 4-3. Estructura química del compuesto Pq-Sap2 (9,19-ciclolanost- 24-Z-en-1 β ,3 β ,21,26-tetraol-3-O- β -glucósido)



El compuesto Pq-Sap2 fue inyectado bajo las condiciones cromatográficas descritas anteriormente con adición del estándar interno arrojando una señal cromatográfica en el tiempo de retención de 12.300 min. Al comparar el perfil cromatográfico del extracto hidroalcohólico con el obtenido para Pq-Sap2 se encontró que la muestra también presenta una señal cromatográfica cercana al tiempo de retención de la saponina (12.3 min), lo que indicaría la presencia de este compuesto en la muestra. El extracto hidroalcohólico fue enriquecido con una solución de la saponina aislada, encontrándose un aumento en el área y altura del pico cromatográfico de interés, lo que permite corroborar que la señal cromatográfica del extracto en el tiempo de retención de 12.3 min corresponde al compuesto Pq-Sap2.

4.2.2 Validación de la metodología analítica

A continuación, se presentan los resultados obtenidos durante la validación de una metodología analítica por CLAE-DAD-ELSD para la cuantificación de la saponina Pq-Sap2 presente en el extracto hidroalcohólico de hojas *P. quadrangularis*. De igual manera

se estableció como afectan las condiciones de extracción sobre la concentración final de este compuesto en el extracto.

4.2.2.1 Precisión

Al evaluar la precisión del sistema con los datos obtenidos por ELSD se encontró que no existía reproducibilidad entre las inyecciones de un mismo vial. Por ende, la validación de la metodología analítica para la cuantificación de la saponina (Pq-Sap2) en el extracto hidroalcohólico de hojas de *P. quadrangularis* se realizó con las mediciones del detector de DAD a 205 nm.

- **Precisión intra- día:** Como se puede observar en la Tabla 4-2 el coeficiente de variación (CV) entre las áreas obtenidas para Pq-Sap2 y el PI de las 10 inyecciones realizadas fue menor al 2%. Este resultado estuvo acorde con los lineamientos aceptados por la ICH, donde se estipula que para muestras complejas el CV debe ser inferior al 5%.

Tabla 4-2. Resultados obtenidos en la evaluación del parámetro de precisión intra-día

Solución de Pq-Sap2 0.5 mg/mL + PI 0.25 mg/MI		
#Inyección	AREA Pq-Sap2	AREA PI
1	52441	73600
2	52608	75423
3	53047	75287
4	53149	75251
5	52281	75510
6	52633	75753
7	52219	75012
8	52030	75830
9	52510	75849
10	52121	74990
PROM.	52504	75251
S	37.880	657.761
CV (%)	0.7	0.8

- **Precisión intermedia:** En la Tabla 4-3 se muestran las áreas halladas para las concentraciones de Pq-Sap2 de 0.3, 0.5 y 0.8 mg/mL en los 3 días en que se llevó a cabo la evaluación de la precisión intermedia. Como se puede observar el coeficiente de variación para cada una de las concentraciones no fue superior al 5%.

Tabla 4-3. Resultados obtenidos en la evaluación del parámetro de precisión intermedia.

Día	Réplica	Concentración PqSap2 mg/mL		
		0.3	0.5	0.8
1	1	34130	55272	85371
	2	34208	55302	86308
	3	34218	55196	86447
2	1	33094	51002	83424
	2	33317	52119	83712
	3	33465	52932	83725
3	1	36751	54819	80841
	2	36720	55214	79512
	3	36884	54853	79939
PROMEDIO		34754	54079	83253
S		1575	1629	2629
CV (%)		4.5	3.0	3.157

Los resultados hallados indican que la metodología analítica desarrollada cumple con el parámetro de precisión.

4.2.2.2 Linealidad.

La linealidad fue determinada utilizando cinco concentraciones diferentes de Pq-Sap2 con adición de un patrón interno inyectándose en el equipo cada concentración por triplicado. Para cada curva realizada estimo los intervalos de confianza para la pendiente y el intercepto y se calculó a través de una prueba estadística si existieron diferencias significativas entre las curvas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4-4.

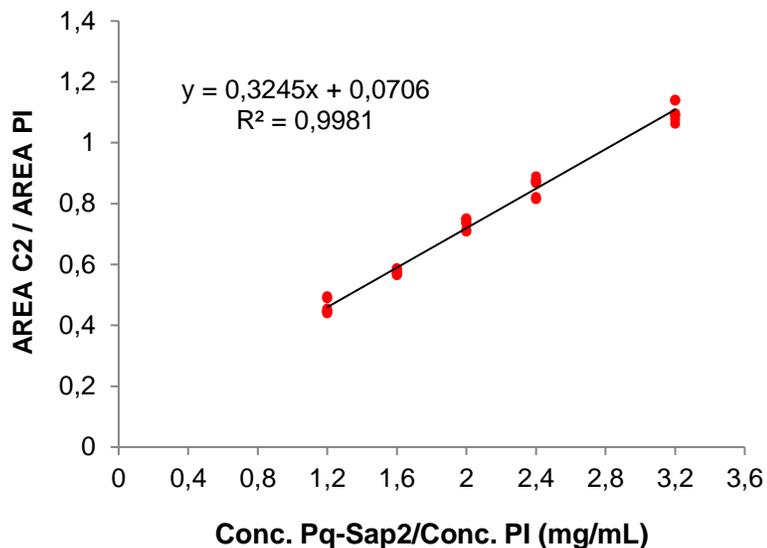
Tabla 4-4. Parámetros estadísticos determinados en la evaluación de la linealidad del sistema cromatográfico para la cuantificación de una saponina (Pq-Sap2) en el extracto hidroalcohólico de hojas de *P. quadrangularis*.

Parámetro	Curva 1	Curva 2	Curva 3
Pendiente	0.313 ± 0.0147	0.349 ± 0.008	0.311 ± 0.019
Ordenada de Origen	0.0802 ± 0.032	0.0313 ± 0.017	0.1 ± 0.042
Coefficiente de regresión lineal	0.993	0.998	0.989
t_r	21.40	43.66	16.213
Intervalo de confianza de la pendiente	0.267 - 0.360	0.323 - 0.374	0.251 - 0.372
Intervalo de confianza del origen	-0.022 - 0.182	-0.024 - 0.0867	-0.032 - 0.234

De acuerdo con el análisis estadístico no se encontró diferencia significativa entre las pendientes ni entre los interceptos de las tres curvas realizadas, por ende, es estadísticamente posible hacer un agrupamiento de los datos y establecer una única línea de calibración la cual es mostrada en la Figura 4-4.

Con base en los resultados obtenidos es válido afirmar que el método analítico validado cumple el criterio de linealidad en el rango de concentración del compuesto PqSap2 de 0.3 – 0.8 mg/mL.

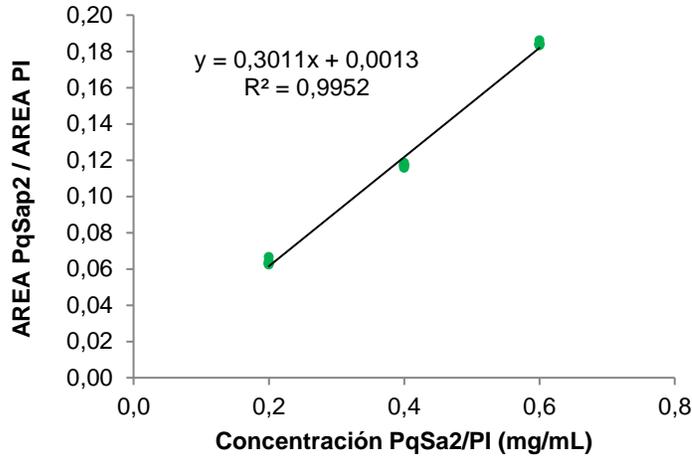
Figura 4-4. Curva de calibración con patrón interno para la cuantificación de una saponina (PqSap2) presente en el extracto hidroalcohólico de hojas de *P. quadrangularis*.



Es importante aclarar dentro de este parámetro, que una vez se utilice esta curva para la cuantificación de las muestras, es necesario que el valor hallado bajo la curva sea multiplicado por la concentración del patrón interno (0.25 mg/mL) con el fin de calcular únicamente la concentración de Pq-Sap2.

4.2.2.3 Límite de detección (LDD) y límite de cuantificación (LDQ)

Para evaluar este parámetro se trabajaron las concentraciones de 0.05, 0.10 y 0.15 mg/mL del compuesto de PqSap2. Con base en estos resultados se construyeron las respectivas curvas descritas en la metodología y se estimaron los valores para las pendientes e interceptos mostrados en la Figura 4-5 y Tabla 4-6.

Figura 4-5. Curva de regresión 1 realizada para la evaluación y determinación de LDD y LDC.**Tabla 4-5.** Pendientes e interceptos hallados para las curvas de regresión 1 y 2.

Curva	Eje x	Eje y	Pendiente	Intercepto
1	[Pq-Sa2] / [PI]*	Pq-Sa2 / PI**	0.321	0.0013
2	[Pq-Sa2] / [PI]	S***	-0.0015	0.0018

* $[Pq-Sa2] / [PI]$ = Concentración de Pq-Sap2 (mg/mL) / Concentración de PI (0.25 mg/mL).

** $PqSa] / PI$ = Área de Pq-Sap2 / Área de PI concentración.

*** **S** = Desviación estándar de las 6 inyecciones de cada una de las concentraciones evaluadas para la determinación de LDD y LDC.

Con base en estos resultados se calcula el LDD y LDC de acuerdo con las ecuaciones 4-1 y 4-2.

$$LDD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} = \frac{0.0013 + 3(0.0018)}{0.324} = 0.020$$

$$LDC = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} = \frac{0.0013 + 10(0.0018)}{0.324} = 0.059$$

Sin embargo, estos valores calculados hacen referencia a la relación entre la concentración de Pq-Sap2 sobre la concentración de PI, por ende si éstos valores son

multiplicados por 0.25 mg/mL se halla el Limite de detección y de cuantificación solamente para Pq-Sap2, los cuales fueron 5.169 $\mu\text{g/mL}$ y 14.891 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

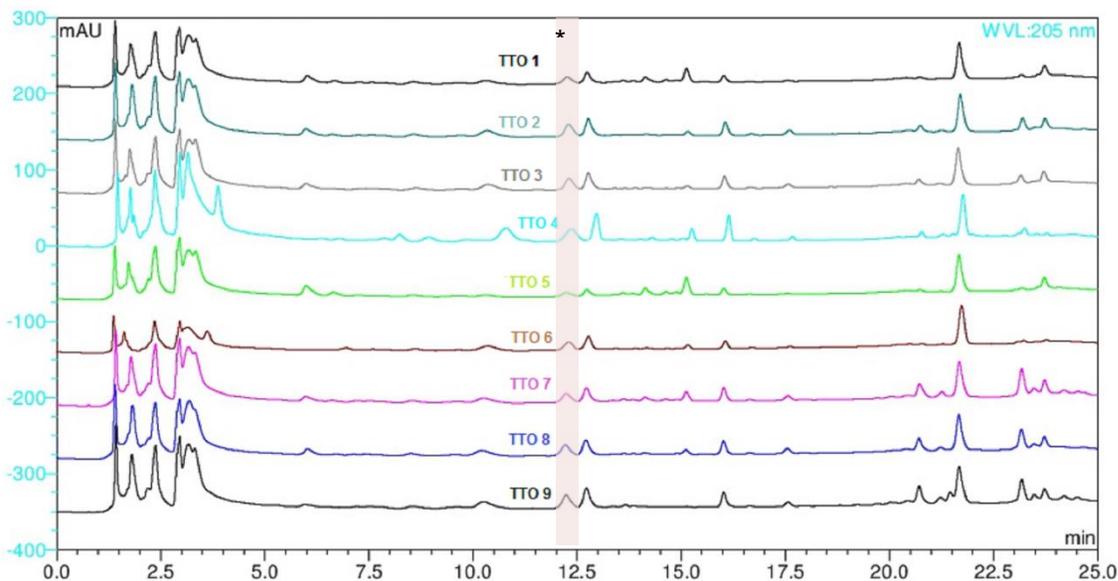
4.2.3 Influencia de los factores de extracción sobre la concentración de PqSap2

Una vez validada la técnica analítica se cuantificó el contenido de Pq-Sap2 en los extractos hidroalcohólicos obtenidos de los tratamientos del diseño factorial fraccionado (3^{3-1}) utilizado el proceso de optimización de flavonoides totales descritos en el capítulo 3 Tabla 3-1.

Para flavonoides totales se empleó una metodología de superficie de respuesta ya que se quería optimizar las condiciones de extracción para obtener la mayor concentración de estos compuestos debido a que son los que están relacionados con la actividad farmacológica sobre sistema nervioso central (SNC) del extracto. Sin embargo, para Pq-Sap2 no se empleó MSR debido a que este no era el objetivo, sino únicamente evaluar la influencia de la relación droga-disolvente, disolvente de extracción y tiempo de extracción sobre la concentración de la saponina.

En la Figura 4-6 se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos para los nueve extractos hidroalcohólicos del diseño factorial fraccionado. Como se puede observar en dicha figura hay ligeras variaciones entre la intensidad de las señales cromatográficas de algunos compuestos incluyendo la señal de Pq-Sap2 localizada en 12.3 minutos aproximadamente.

Figura 4-6. Perfiles cromatográficos por DAD a 205 nm de los extractos hidroalcohólicos obtenidos de los tratamientos del diseño factorial fraccionado 3^{3-1}



*Señal cromatográfica correspondiente a Pq-Sap2 .TTO abreviación de tratamiento. La cuantificación de Pq-Sap2 se realizó bajo las siguientes condiciones cromatográficas: Fase Estacionaria: Columna Phenomenex Bondclone® Fenil (300 x 3.9 mm i.d.; 10 μ m). Fase móvil A: H₂O; Fase móvil B: ACN. El gradiente inicia en 27.5-29.0% de la fase B de 0 a 8 minutos, 29.0 -70% de la fase B de 8-20 min, 70.0 -80.0 % de la fase B de por un minuto y finaliza en 75% de la fase B al minuto 25. El Flujo de 1.200 mL/min. Temperatura del horno: 30 °C. Volumen de inyección: 5 μ L. Longitud de onda de detección (λ): 205 nm.

Al hacer la cuantificación de este compuesto en las muestras evaluadas y posteriormente el análisis estadístico de ANOVA seguido de comparación de medias por *T-Tukey* con $p < 0.05$ mediante el procedimiento GLM del software SAS versión 9.0, se encontró que existen diferencias significativas entre las concentraciones de Pq-Sap2 entre tratamientos. Los resultados son mostrados en la Tabla 4-6.

Tabla 4-6. Concentración de Pq-Sap2 en los extractos hidroalcohólicos del diseño experimental factorial fraccionado.

tto	Relación Droga-Disolvente	% Etanol	Tiempo (h)	mg Pq-Sap2/g ext
1	1:10	25	24	27,701 ± 0,319 ^h
2	1:10	50	72	57,515 ± 0,887 ^c
3	1:10	75	48	51,943 ± 0,104 ^e
4	1:15	50	48	63,020 ± 0,853 ^b
5	1:15	25	72	12,113 ± 0,196 ⁱ
6	1:15	25	48	33,046 ± 0,007 ^g
7	1:20	75	24	43,050 ± 0,531 ^f
8	1:20	50	24	68,874 ± 0,289 ^a
9	1:20	75	72	54,029 ± 0,401 ^d

Los datos se presentan como la media de las observaciones ± Error Estándar. Numero de réplicas analíticas n=3. Valores promedios de cada fila con letras diferentes presentan diferencias estadísticas entre tratamientos ($p < 0.05$).

Las dos condiciones extractivas bajo las cuales se obtuvo la mayor concentración de Pq-Sap2 fueron: relación droga-disolvente 1:20, Etanol al 50% y tiempo de extracción de 24 horas y relación droga-disolvente 1:15 (tratamiento 9) y Etanol al 50% y tiempo de extracción de 48 horas (tratamiento 4), siendo estas últimas condiciones las que también permiten de acuerdo con el análisis de metodología de superficie de respuesta obtener la mayor concentración de flavonoides totales.

No obstante, de acuerdo con el análisis estadístico se determinó que todas las variables son estadísticamente significativas en el proceso de extracción de Pq-Sap2. Al analizar las interacciones se encontró que la única interacción significativa fue droga-disolvente × disolvente de extracción, la cual también fue significativa para la extracción de flavonoides totales.

Dentro de las técnicas más empleadas para la extracción de saponinas están maceración, percolación, Soxhlet, extracción acelerada con disolventes, extracción asistida por microondas y extracción asistida por ultrasonido. Dentro de los disolventes

más empleados para la extracción de estos compuestos están metanol, etanol, agua y mezclas entre ellos. Los parámetros correspondientes a la relación droga-disolvente y tiempo de extracción dependen más del tipo de técnica empleada (Cheok et al., 2014).

El método de extracción de percolación ha sido empleado para la obtención de glicósidos esteroides de hojas de *Antonia ovata*, rizomas de *Paris polyphylla* var. *Yunnanensis* *Platycodon grandiflorum* y semillas de *Allium tuberosum* (Zou, Yu y Cong, 2001; Hong et al., 2005; Alabdul et al., 2012; Ryu et al., 2012)

Por último, otros autores también reportan otros métodos de extracción de saponinas como la técnica de extracción asistida por microondas para la extracción de saponinas esteroidales (diosgenina) de *Dioscorea zingiberensis* en donde se obtuvieron como condiciones óptimas de extracción etanol al 75%, una relación droga-disolvente 1:20 y temperatura de 75°C y una amplitud de 600W cada 3 ciclos de 6 minutos cada uno. La elucidación y cuantificación del compuesto se realizó por CLAE-DAD a 200 nm y LC-ESI/MS (Ren et al., 2015).

5.Efecto de la localidad y época de colecta sobre la concentración de flavonoides totales y Pq-Sap2.

Las plantas producen un gran número de metabolitos durante su proceso de crecimiento, los cuales pueden ser divididos en dos grandes grupos: los procedentes del metabolismo primario de la planta y los metabolitos secundarios. Los primeros están relacionados con procesos vitales como la fotosíntesis y la respiración y generalmente son carbohidratos, lípidos, nucleótidos aminoácidos y ácidos orgánicos. Por otro lado, los metabolitos secundarios cumplen funciones en las plantas de protección y adaptación contra factores de estrés bióticos o abióticos y su contenido en la planta son relativamente bajas ya que dependen de las condiciones a las que este expuesta durante su crecimiento (Lino von Poser, 2017).

Por ende, para el desarrollo de productos fitoterapéuticos es de gran importancia conocer como las condiciones ambientales afectan e influencia la respuesta y presencia de los metabolitos secundarios en las plantas.

5.1 Metodología

5.1.1 Localidades de colecta del material vegetal

Para la evaluación del efecto de la localidad sobre el contenido de flavonoides totales y Pq-Sap2, se tomaron muestras de hojas de *P. quadrangularis* en dos cultivos ubicados en los municipios de Neiva y Rivera del departamento del Huila.

El material vegetal fue colectado en mayo de 2015 y la toma de las hojas se hizo aleatoriamente en toda el área del cultivo. Como criterio para la recolección de las hojas se estableció que estas presentaran un color uniforme como indicativo de que no presentaran daño por ataque de insectos y el corte se realizó en la base de la lámina con el fin de excluir de la muestra colectada material del peciolo y de los zarcillos.

En la Tabla 5-1 se muestran los aspectos tomados en cuenta para la caracterización de cada una de las localidades donde se llevó a cabo la colecta del material vegetal.

Tabla 5-1. Caracterización de las localidades de Neiva y Rivera.

Característica	Localidad	
	Neiva	Rivera
Vereda	Normandía	Termopila
Finca	Bellavista	La trinidad
Propietario	Reinaldo García	José Eladio López
Altitud (m.s.n.m)	672	993
Longitud	75° 12" 5.839	75° 13" 94.938
Latitud	2° 52" 01,599	2° 45" 41,899
Cantidad de material colectado	9 Kg	6 Kg

Dentro de algunas observaciones generales de los cultivos cabe resaltar que, el cultivo de Neiva en el momento de la colecta del material vegetal tenía aproximadamente 11 meses de establecido y estaba en etapa productiva hacía dos meses y tenía aproximadamente 400 plantas. La cosecha del fruto se hacía entre una y dos veces por semana. Era semitecnificado y contaba con sistema de riego el cual se activaba todos los días. Constantemente se realizaba monitoreo de plagas y se aplicaban productos agrícolas para el control de las mismas. Por último, el terreno donde se encontraba tenía una pendiente de aproximadamente 40°. En las fotografías mostradas a continuación se puede apreciar con mayor claridad las condiciones del cultivo.

Figura 5-1. Cultivo de badea (*P. quadrangularis*) de la localidad de Neiva.



Fotos tomadas por el Autor

Con respecto al cultivo de la localidad de Rivera, en el momento de la colecta de las hojas este tenía 2 años de establecido. Su manejo era de manera tradicional y no contaba con sistema de riego. La cosecha del fruto se realizaba una vez por semana y no se hacía seguimiento de plagas, por ende la aplicación de productos agrícolas para el control de las mismas era limitada. El terreno tenía una inclinación aproximada de 60° y estaba conformado por alrededor de 200 plantas. (Figura 5-2).

Figura 5-2. Cultivo de badea (*P. quadrangularis*) de la localidad de Rivera.



Fotos tomadas por el Autor

Adicionalmente, se tomó alguna información climática de las estaciones meteorológicas más cercanas a los cultivos durante los dos meses anteriores y el mes de muestreo con el fin de tener una mejor caracterización de las localidades (Tabla 5-2). La información correspondiente a la localidad de Neiva se tomó de la estación meteorológica del

Aeropuerto Benito Salas (Latitud N 236, longitud W 7517, elevación 439 m.s.n.m.) mientras que para la localidad de Rivera se utilizó la información de la estación meteorológica de Palacio-Vegalarga (Latitud N 256, longitud W 7503, elevación 1100 m.s.n.m).

Tabla 5-2. Parámetros climatológicos de las localidades de colecta (Neiva y Rivera).

Parámetro	Neiva			Rivera		
	Marzo	Abril	Mayo	Marzo	Abril	Mayo
Brillo Solar (horas)	-----	-----	-----	96.9	103.3	-----
Humedad Relativa (%)	67	63	58	74	71	67
Precipitación Total (mms)	137.6	51.2	11.6	395.6	67.1	37.4
Días de precipitación (días)	16	10	15	19	17	16
Temperatura Media (°C)	28.3	28.9	29.3	22.8	23.2	23.6

---- Indica que no se ha realizado la medida

5.1.2 Épocas de colecta del material vegetal.

Para evaluar el impacto de la época de colecta sobre la concentración de flavonoides totales y Pq-Sap2 se realizó un muestreo en época de lluvias (junio de 2016) y época seca (mayo de 2015), entendiéndose esta última como el periodo del año donde se presentan el menor número de precipitaciones.

Los datos meteorológicos correspondientes a los 2 meses anteriores y al mes de muestreo en los dos años en que se realizó la colecta del material vegetal se dan a conocer en la Tabla 5-3.

Tabla 5-3. Datos climatológicos de la localidad de Neiva en época de seca (2015) y época de lluvias (2016).

Parámetro	2015 (Época Seca)			2016 (Época de lluvia)			Promedio trimestral 2015	Promedio trimestral 2016
	Marzo	Abril	Mayo	Abril	Mayo	Junio		
T, med, (°C)	28.16	28.97	29.58	28.08	28.72	28.85	28.90	28.55
T, max(°C)	32.69	33.10	33.76	32.58	33.36	33.40	33.18	33.11
T, min(°C)	23.18	23.70	24.13	23.64	23.68	22.95	23.67	23.42
Prec,(mm)	137.60	51.20	11.60	761.30	73.80	20.60	66.80	285.23
Insolac,(horas)	142.20	145.80	126.50	128.20	165.30	177.20	138.17	156.90

Datos tomados de <http://www.meteomanz.com>

5.1.3 Cuantificación de Flavonoides totales y Pq-Sap2.

El secado del material vegetal colectado y su posterior tratamiento se realizaron de acuerdo con el procedimiento descrito previamente en las secciones 3.1.2 y 3.1.3 de este trabajo. Una vez reducido el tamaño de partícula del material vegetal se obtuvieron los extractos hidroalcohólicos bajo las condiciones de extracción de: una relación droga-disolvente 1:15, con una proporción EtOH:H₂O de 1:1 (o Etanol al 50%) y un tiempo de percolación de 48 h. Se eliminó el etanol por presión reducida y se congelaron a -20 ± 2 °C para luego ser liofilizados para eliminar el agua remanente.

La cuantificación de flavonoides totales se realizó de acuerdo con la metodología descrita en 3.1.5 mientras que Pq-Sap2 se cuantificó de acuerdo con las condiciones cromatográficas establecidas en el capítulo 4 sección 4.1.1.

5.1.4 Análisis estadístico

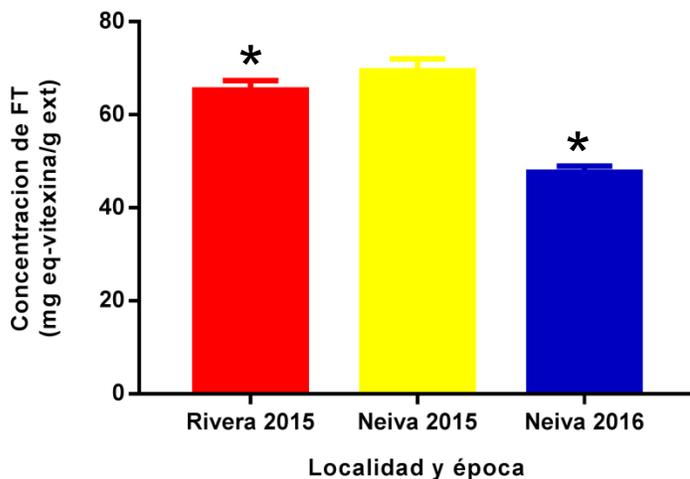
Se empleó el software GraphPad Prism Version 7.0 para en análisis de los resultados. Para evaluar el efecto de la localidad y época sobre la concentración de flavonoides totales y Pq-Sap2 se utilizó una ANOVA de una vía seguido de una prueba Tukey con un porcentaje de confianza del 95 %.

5.2 Resultados y discusión

5.2.1 Efecto sobre la concentración de flavonoides totales

Una vez colectado el material vegetal correspondiente a cada localidad y época se procedió a hacer la cuantificación de flavonoides totales, obteniéndose los resultados mostrados en la Figura 5-3.

Figura 5-3. Efecto de la localidad y época de colecta sobre la concentración de flavonoides en hojas de *P. quadrangularis*.

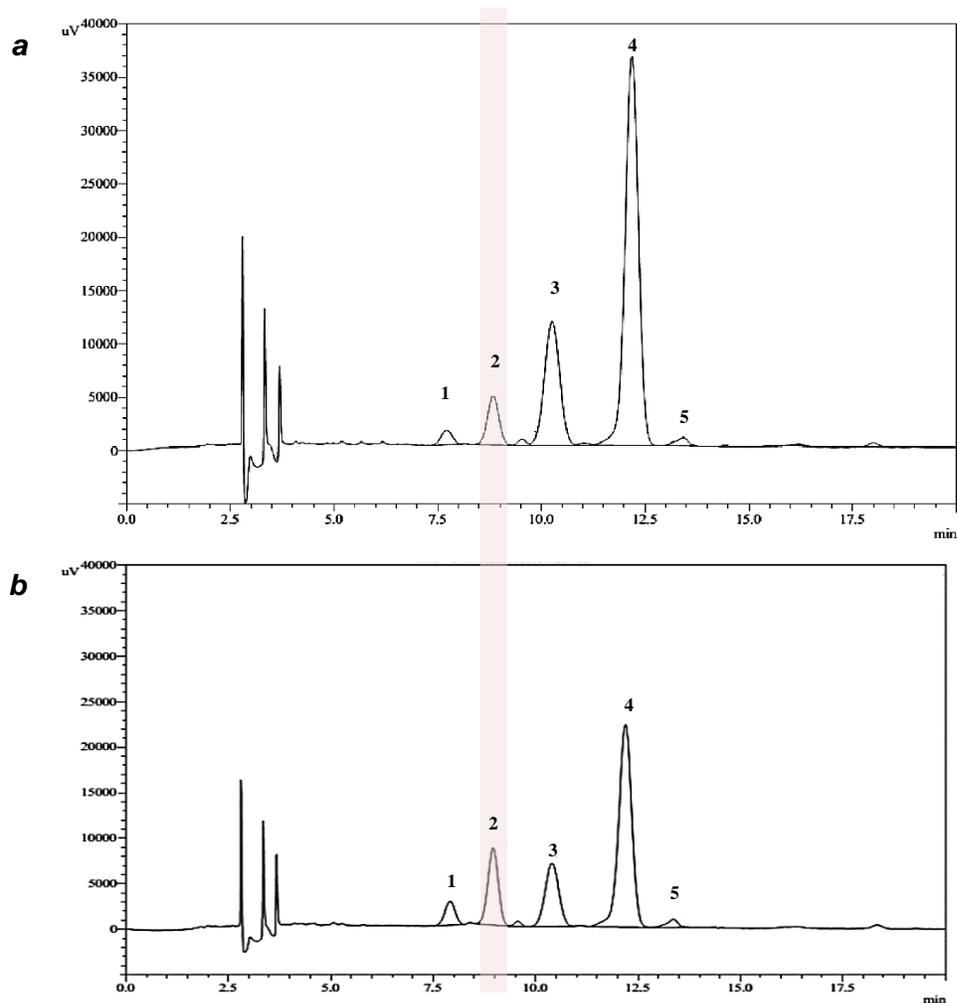


Los datos son expresados como el promedio \pm SEM y fueron analizados mediante un ANOVA de una vía seguido de una prueba Tukey con un valor de $p < 0.05$. Los valores de significancia están dados por * $p < 0.05$ con respecto a Neiva 2015.

De acuerdo con el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas entre la concentración de flavonoides totales del material vegetal colectado en Rivera (65.291 \pm 2.085 mg-equivalentes de Vitexina/g de extracto) versus el de Neiva (69.440 \pm 2.614 mg-equivalentes de Vitexina/g de extracto), es decir que la localidad mostró un efecto sobre la concentración de estos metabolitos. Sin embargo, al comparar los perfiles cromatográficos de los extractos hidroalcohólicos no se evidenciaron cambios entre las señales cromatográficas correspondientes a los flavonoides de orientina 2''-O-glucósido, orientina 2''-O-xilósido, orientina, vitexina 2''-O-glucósido, vitexina 2''-O-xilósido y vitexina.

Con respecto al efecto de la época de colecta, también se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de FT de la época seca (69.440 \pm 2.614 mg-equivalentes de Vitexina/g de extracto) versus la época de lluvias (47.653 \pm 1.303 mg-equivalentes de Vitexina/g de extracto). En este análisis si se encontraron cambios en los perfiles cromatográficos de los extractos, los cuales son mostrados en la Figura 5-4.

Figura 5-4. Perfiles cromatográficos de los extractos hidroalcohólicos de hojas de *P. quadrangularis* colectadas en época de sequía y lluvia en la localidad de Neiva, Huila. Efecto sobre los flavonoides C-glicosilados.



1. orientina 2"-O-glucósido, 2. orientina 2"-O-xilósido, 3. orientina, 4. vitexina 2"-O-glucósido, 5. vitexina 2"-O-xilósido y 6. vitexina. a). Perfil cromatográfico del extracto hidroalcohólico de hojas de *P. quadrangularis* colectadas en época seca (mayo de 2015) b). Perfil cromatográfico del extracto hidroalcohólico de hojas de *P. quadrangularis* colectadas en época de lluvia (junio de 2016).

La cuantificación de flavonoides totales se realizó bajo las siguientes condiciones cromatográficas: Fase Estacionaria: Columna C18 Phenomenex Luna® (250 mm x 4,6 mm i.d. 5 µm). Fase Móvil: Fase A agua:acetonitrilo:ácido acético (90:10:1); Fase B acetonitrilo:agua:ácido acético (90:10:1), el gradiente inicia en 11% de la fase B de 0 a 5 minutos, 11% a 15% de la fase B de 5 a 20 min en gradiente lineal. Flujo de 1 mL/min. Temperatura del horno: 28 °C. Volumen de inyección: 10 µL. Longitud de onda de detección (λ): 340 nm.

Como se puede apreciar en la anterior figura hay un cambio evidente en la señal cromatográfica correspondiente al flavonoide de orientina 2''-O-xilósido. En La Tabla 5-4 se muestra la cantidad relativa de los flavonoides individuales presentes en los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *P. quadrangularis* colectadas en diferentes épocas evidenciándose que en época de lluvia es mayor la cantidad relativa tanto de orientina como de los flavonoides derivados esta.

Tabla 5-4. Cantidad relativa de los flavonoides individuales presentes en los extractos hidroalcohólicos de hojas de *P. quadrangularis* colectadas en dos épocas de diferentes.

Época	Cantidad relativa de cada flavonoide presente en el extracto (%)					
	orientina 2''-O-glucósido	orientina 2''-O-xilósido	orientina	Vitexina 2''-O-glucósido	vitexina 2''-O-xilósido	Vitexina
Lluvia	5.2 ± 0.02	16.7 ± 0.41	0.7 ± 0.01	18.5 ± 0.13	56.7 ± 0.41	2.2 ± 0.11
Seca	2.7 ± 0.04	8.8 ± 0.11	0.5 ± 0.04	20.5 ± 0.09	65.6 ± 0.15	1.9 ± 0.01

Costa et al. (2014) evaluaron la posible correlación entre la concentración de C-glicoflavonoides presentes en hojas de *Cecropia glaziovii* Sneth y la pluviosidad. Las muestras fueron colectadas en Florianópolis, SC, Brazil y se monitoreó la concentración de isovitexina e isorientina durante dos años concluyéndose al final del estudio que no existe correlación entre la expresión de los flavonoides con las precipitaciones. Sin embargo, se logró determinar que en los meses correspondientes a las estaciones de verano y primavera (noviembre –marzo) se presentaron las máximas concentraciones de isovitexina e isorientina en las hojas de la planta.

Otros autores también han evaluado el efecto de algunas condiciones ambientales sobre la concentración de flavonoides. Por ejemplo, Regueira et al. (2017) evaluaron en propóleos rojos, la concentración de flavonoides y otros compuesto fenólicos de acuerdo a la época (seca o lluvia) encontrando que las concentraciones de quercetina, ácido cafeico y ácido elágico fueron casi dos veces mayores en época seca que en época de lluvia. Sin embargo, se observó un aumento de luteolina y apigenina en época de lluvia.

Otros estudios con propóleos también reportan un aumento en la concentración de flavonoides en época secas (Baankova, Baoudourova-Krasteva, Paopov, Sforcin y Cunha Fbunar, 1998; Tarley et al., 2009; Isla et al., 2012)

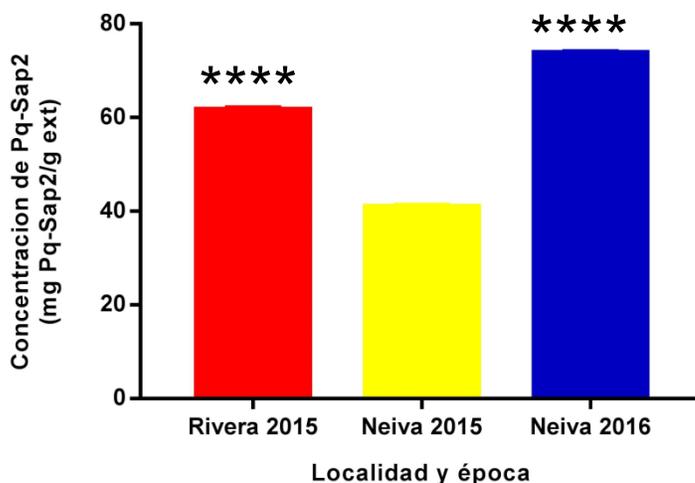
Con respecto al cambio en la abundancia de los flavonoides presentes de acuerdo a la época de colecta del material vegetal, es decir al aumento de la concentración de orientina y sus derivados, Remorini et al. (2009) reportaron resultados similares en flavonoides en hojas de *Olea europaea*. En dicho estudio se evaluó la influencia de la radiación solar sobre la concentración de estos metabolitos encontrándose que los glucósidos quercetina y luteolina aumentaban en las hojas totalmente expuestas a la radiación solar en comparación con las de sombreado parcial, mientras que los glucósidos de apigenina no presentaban este comportamiento. Es importante recordar que, aunque la época climática donde hubo mayor expresión de derivados de orientina fue la época de lluvias, de acuerdo con los datos climatológicos también fue la época donde se presentó mayor insolación media (Tabla 5-3).

Clark y Clark (1990) evaluaron el cambio en la concentración de flavonoides en un exudado de *Isocoma acradenia* con respecto a las variaciones estacionales. Se monitorearon 4 flavonoides en el exudado apigenina, kaempferol-3-metil éter, luteolina 7-metil éter y quercetina 3,3'-dimetil éter, en donde estos dos últimos compuestos alcanzaron su concentración relativa más alta a principios del verano, en 9,4 y 19,1%, respectivamente y sus niveles más bajos se monitorearon en invierno (0,8 y 1,1%).

5.2.2 Efecto sobre la concentración de Pq-Sap2

Una vez colectadas las muestras en diferentes localidades y épocas uno de los objetivos era determinar la influencia de estos factores ambientales sobre la concentración de quadrangulósido. Sin embargo, debido a que esta saponina no se encontró en los extractos hidroalcohólicos obtenidos de los diferentes materiales vegetales se procedió a cuantificar la saponina Pq-Sap2 y hacer la evaluación sobre este compuesto. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5-5.

Figura 5-5. Efecto de la localidad y época de colecta sobre la concentración de Pq-Sap2 en hojas de *P. quadrangularis*.



Los datos son expresados como el promedio \pm SEM y fueron analizados mediante un ANOVA de una vía seguido de una prueba Tukey con un valor de $p < 0.05$. Los valores de significancia están dados por

**** $p < 0.0001$ con respecto a Neiva 2015.

Como se puede apreciar en la Figura 5-5 se presentaron diferencias significativas entre la concentración de Pq-Sap2 encontrada entre localidades y entre épocas de colecta. Al comparar entre localidades, en el material vegetal colectado en Rivera se encontró una mayor concentración (61.693 ± 0.266 mg Pq-Sap2 / g extracto seco), mientras que al comparar entre épocas de colecta, el material vegetal de 2016 (épocas de lluvias) fue en el cual se evidenció una mayor concentración de esta saponina (73.803 ± 0.192 mg Pq-Sap2 / g extracto seco). Sin embargo, el perfil cromatográfico no se vio afectado por ninguno de estos dos factores.

Al analizar en detalle el comportamiento de la concentración de la saponina con respecto a la influencia de la época y localidad, posiblemente esté relacionado con las precipitaciones reportadas por los entes ambientales en los momentos de la recolección de los materiales vegetales. Si se observan los datos de precipitación total mostrados en las Tablas 5-2 y 5-3 se puede apreciar que la concentración de Pq-Sap2 aumenta en los periodos donde la precipitación es mayor.

Aunque el efecto de factores bióticos y abióticos sobre la concentración de saponinas no ha sido tan ampliamente estudiado como en los flavonoides, existen algunos reportes que ayudan a entender los resultados obtenidos en este trabajo para Pq-Sap2.

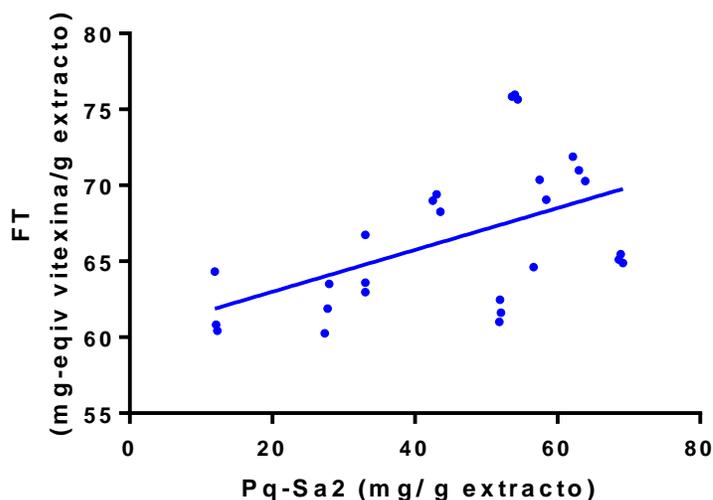
Se han realizado algunos estudios sobre como factores de estrés hídrico afectan el contenido de saponinas en productos de interés agrícola. Por ejemplo, Ayet et al. (1997) observaron que el contenido de saponinas en las lentejas después de la germinación bajo dos modelos de riego diferente. Los tratamientos consistían en regar el cultivo todos los días y los otros días intermedios, encontrándose que el nivel máximo se obtenía bajo el sistema de riego constante.

Hailan et al. (2011) también evaluaron como el estrés hídrico afectaba la concentración de saponinas en las raíces fibrosas de *Liriope muscari*. El ensayo consistió en someter los cultivos a condiciones de estrés hídrico (disminución en la cantidad de agua de riego) leve (W1, 65%), moderado (W2, 50%), severo (W3, 35%) y control (CK, 80%). De acuerdo con los resultados, los autores reportan que fue en el grupo control donde se presentó la mayor concentración de saponinas, es decir, donde no hubo estrés hídrico.

Con base a los resultados obtenidos, se podría proponer que factores ambientales como la pluviosidad tienen un efecto sobre la concentración de Pq-Sap2 presente en hojas de *P. quadrangularis*, sin embargo se requerirían de pruebas más controladas en condiciones de cultivo y mayor tiempo de seguimiento para comprobar esta hipótesis.

Por último, se evaluó la posible correlación entre las concentraciones de flavonoides totales y el contenido de Pq-Sap2 presentes en las hojas de *P. quadrangularis* en los diferentes extractos obtenidos, mediante la prueba estadística de correlación de Pearson. La grafica obtenida se muestra en la Figura 5-6.

Figura 5-6 Correlación de Pearson entre la concentración de flavonoides totales vs el contenido de Pq-Sap2



Los resultados del análisis estadístico realizado en el Software GraphPad Prism Version 7.0, permitieron determinar que existe una correlación positiva ($p < 0.05$) entre las dos variables analizadas. Es decir que al aumentar los flavonoides totales aumenta el contenido de la saponina Pq-Sap2. Este resultado es de esperarse ya que, si bien son metabolitos provenientes de dos rutas biosintéticas diferentes, son compuestos glicosilados con similar afinidad a los disolventes de extracción utilizados (mezclas etanol agua).

6. Estabilidad y determinación de la vida útil aparente del extracto de hojas de *P. quadrangularis*

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos para las pruebas de estabilidad bajo condiciones de estrés y estabilidad acelerada e intermedia del extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* con el objetivo de identificar productos de degradación y establecer un tiempo de vida útil aparente del mismo.

6.1 Metodología

Para evaluar la estabilidad en condiciones de estrés del extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* se adaptó la metodología propuesta para la evaluación de la estabilidad de fármacos propuesta en “Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs” desarrollada por Singh y Bakshi (2000) debido a la ausencia de guías propias para extractos vegetales. En esta guía se propone un sistema de evaluación y posterior clasificación para la estabilidad de fármacos sometidos a condiciones de estrés de hidrólisis, hidrólisis alcalina, hidrólisis ácida, oxidación con peróxido de hidrógeno y degradación fotolítica.

En la guía se establece como criterio de degradación significativa la disminución entre un 20 y 80% del contenido inicial del fármaco o principio activo evaluado. Es decir que si se obtiene una degradación menor al 20% se debe someter el fármaco a condiciones de estrés más severas siguiendo el árbol de decisión, mientras si la degradación fue superior al 80% se deben trabajar condiciones de estrés más leves. Una vez halladas las

condiciones de temperatura, tiempo y concentración en las cuales se haya logrado alcanzar una degradación significativa los fármacos pueden ser clasificados como: prácticamente estable, muy estable, estable, lábil, muy lábil o extremadamente lábil.

Aunque esta guía está diseñada para la evaluación de la estabilidad en fármacos, para fines de este trabajo de investigación se adaptaron los lineamientos propuestos en dicho documento para la evaluación de la estabilidad bajo condiciones de estrés del extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis*, siendo la cantidad de flavonoides totales el principio activo cuantificado para determinar la estabilidad del extracto. De igual manera se determinó la cantidad relativa de cada uno de los flavonoides individuales en cada una de las pruebas de estabilidad.

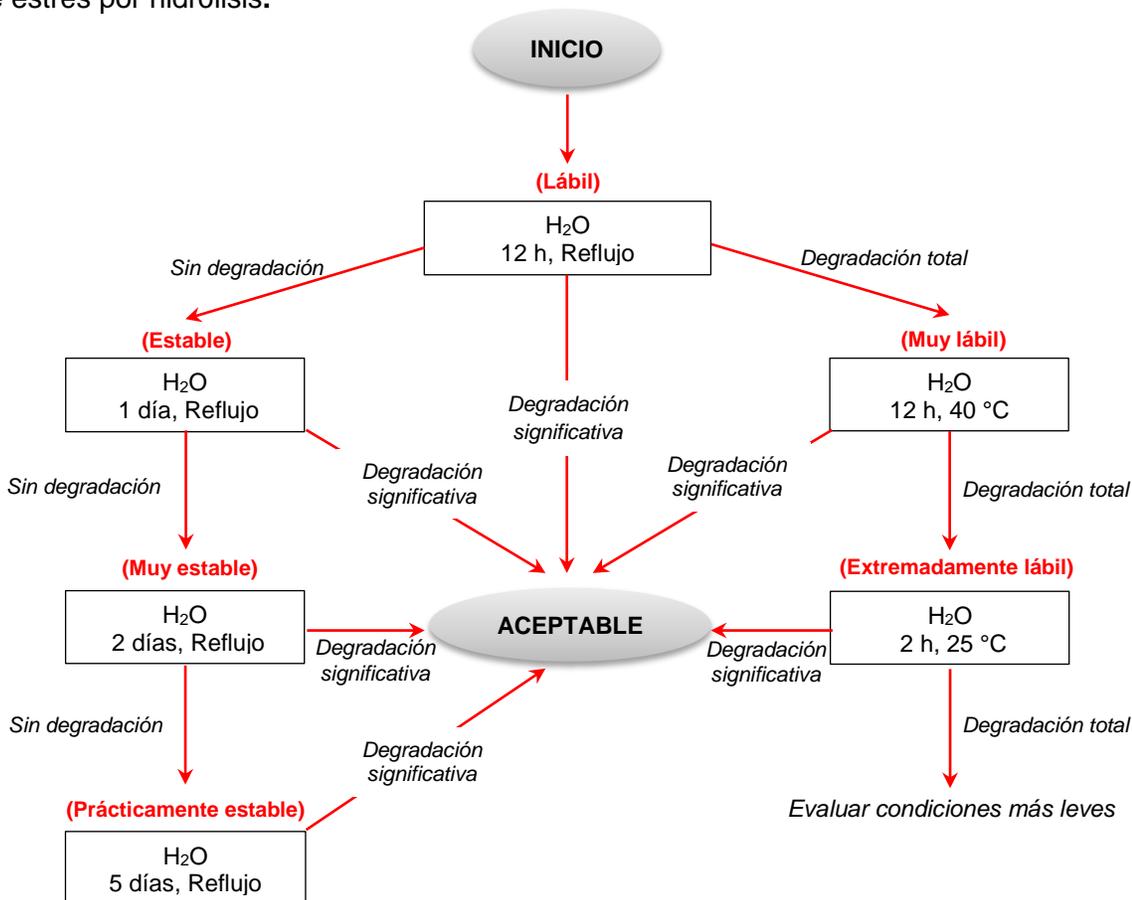
Para la cuantificación de los flavonoides totales e individuales todas las muestras de los estudios de estabilidad fueron llevadas a una concentración de 1 mg/mL con MeOH:H₂O (1:1) y filtradas con membranas de PVDF de 0.22 µm para su inyección en el cromatógrafo.

6.1.1 Estabilidad bajo condiciones de estrés: hidrólisis a condiciones neutras

En la Figura 6.1 se muestra el árbol de decisión propuesto Singh y Bakshi (2002) para la evaluación de la estabilidad bajo condiciones por hidrólisis.

Para encontrar las condiciones bajo las cuales el extracto optimizado alcanzó una degradación significativa, fue necesario hacer un monitoreo la concentración de flavonoides totales cada 24 horas, tomando para cada punto de muestreo una alícuota de 1 mL de la solución y haciendo la reposición del medio. Posteriormente, se realizó la cuantificación de flavonoides totales y flavonoides individuales por CLAE.

Figura 6-1. Diagrama de decisión para la evaluación de la estabilidad bajo condiciones de estrés por hidrólisis.



En paréntesis se muestra la clasificación de estabilidad propuesta para cada condición de estrés en hidrólisis neutra en la que se alcanza una degradación significativa del principio activo

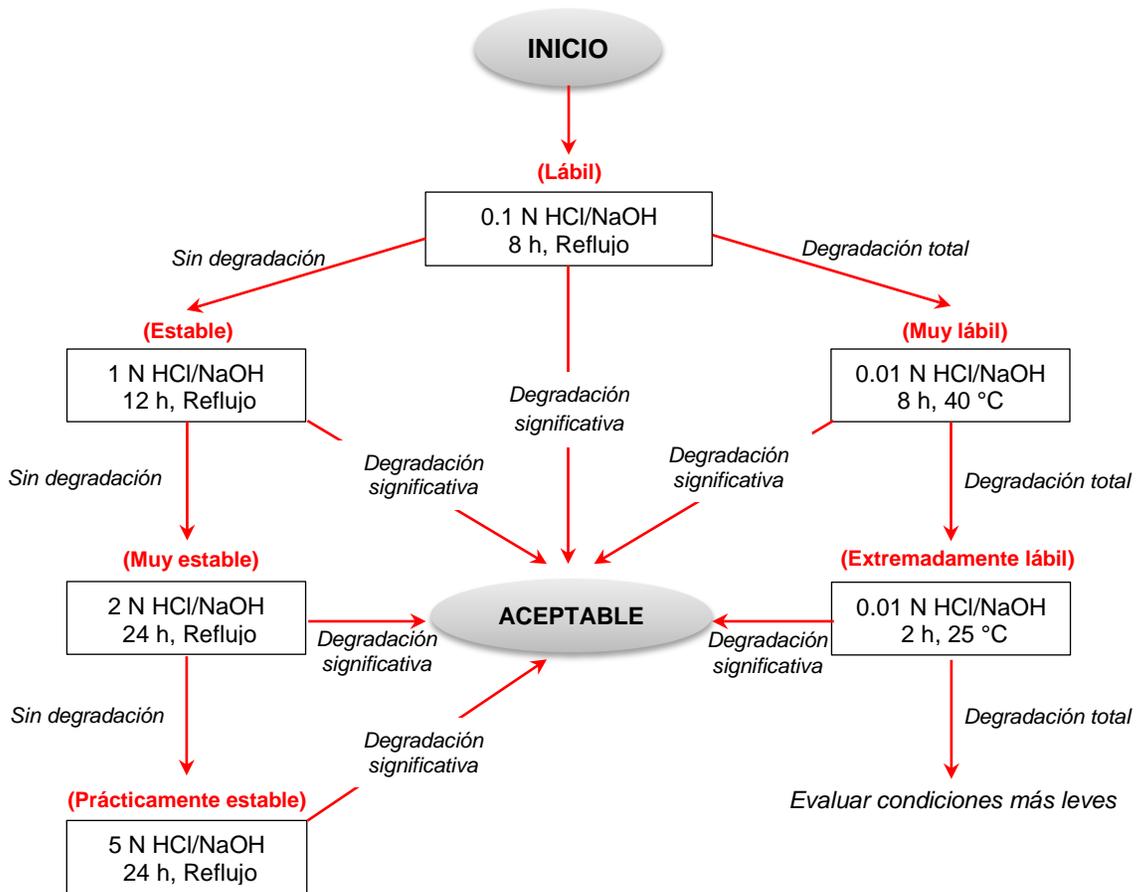
Modificado de Singh y Bakshi (2000)

6.1.2 Estabilidad bajo condiciones de estrés: hidrólisis ácida e hidrólisis básica.

Para la evaluación de la estabilidad bajo condiciones de estrés por hidrólisis básica e hidrólisis ácida se siguió el diagrama de flujo mostrado en la Figura 6-2.

Las pruebas se realizaron sometiendo 250 mg de extracto liofilizado con 50 mL de NaOH ó HCl 0.1N durante 8 h. Cada dos horas, se tomó una alícuota de 1 mL de la solución y se neutralizó (se hizo reposición del medio con NaOH ó HCl 0.1 N según fuera caso). Luego se realizó la cuantificación de flavonoides totales y flavonoides individuales por CLAE.

Figura 6-2. Diagrama de decisión para la realización de estudios de estabilidad bajo condiciones de estrés con hidrólisis ácida y básica.

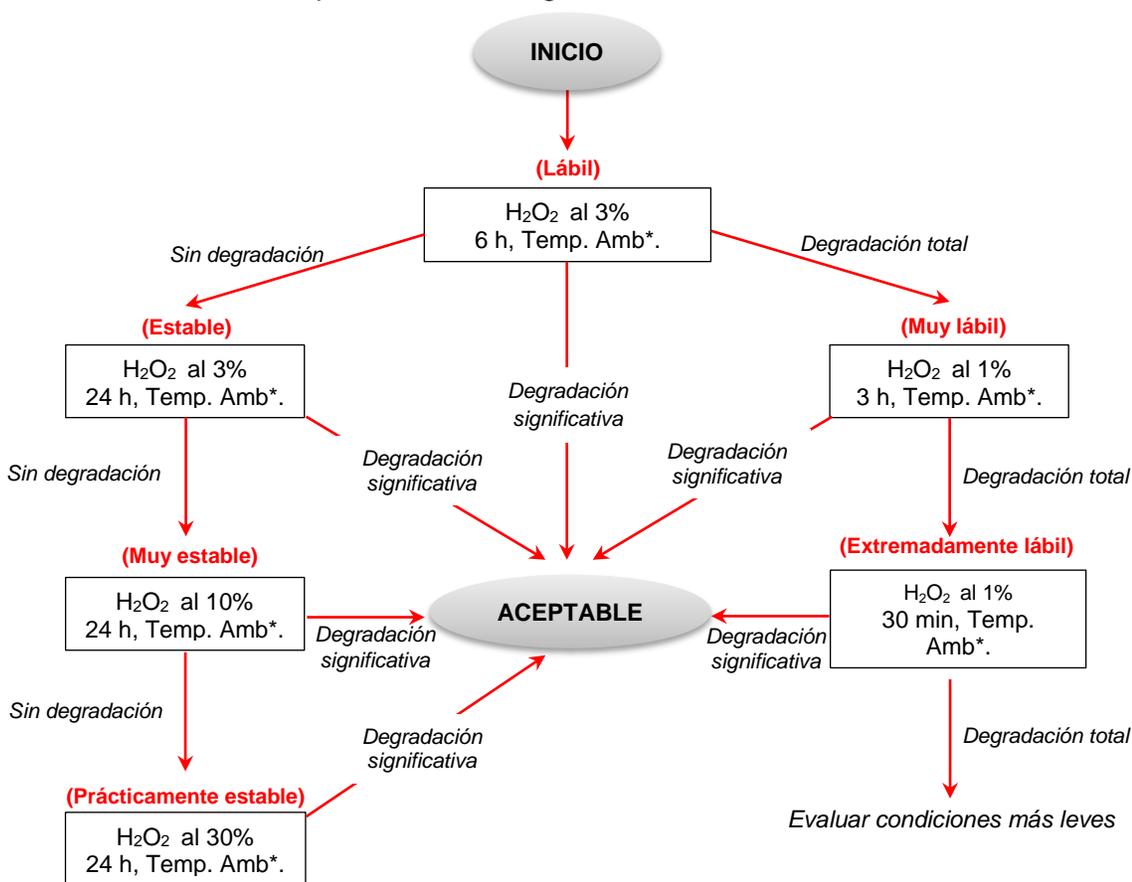


En paréntesis se muestra la clasificación de estabilidad propuesta para cada condición de estrés en hidrólisis ácida y/o básica en la que se alcanza una degradación significativa del principio activo

6.1.3 Estabilidad bajo condiciones de estrés: Oxidación con H₂O₂

De acuerdo con lo reportado por Medina (2014) para esta evaluación el extracto optimizado fue únicamente sometido a condiciones de estrés con H₂O₂ al 30% durante 24 horas siendo monitoreada la concentración de flavonoides totales a las 0, 3, 6, 12 y 24 horas realizándose reposición del medio en cada muestreo.

Figura 6-3. Diagrama de decisión para la realización de estudios de estabilidad bajo condiciones de estrés con peróxido de hidrógeno H₂O₂.



*Temp. Amb = Temperatura ambiente (15 ±2°C). En paréntesis se muestra la clasificación de estabilidad propuesta para cada condición de estrés por oxidación con H₂O₂ en la que se alcanza una degradación significativa del principio activo

6.1.4 Estabilidad bajo condiciones de estrés fotolítica

Para esta prueba se utilizó un prototipo de cámara de fotoestabilidad desarrollado en el grupo de investigación de Sistemas de Liberación Controlado de Moléculas Biológicamente Activas del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia (Figura 6-4). El prototipo contó con una fuente de luz compuesta por una lámpara halógena y una fluorescente con el fin de obtener un espectro de absorción de luz que comprende el rango de absorción desde el UV hasta el IR a fin de simular las condiciones solares y alcanzar un valor de exposición determinado según las guías de estabilidad de Singh & Bakshi (Figura 6-5).

Figura 6-4. Prototipo cámara de fotoestabilidad

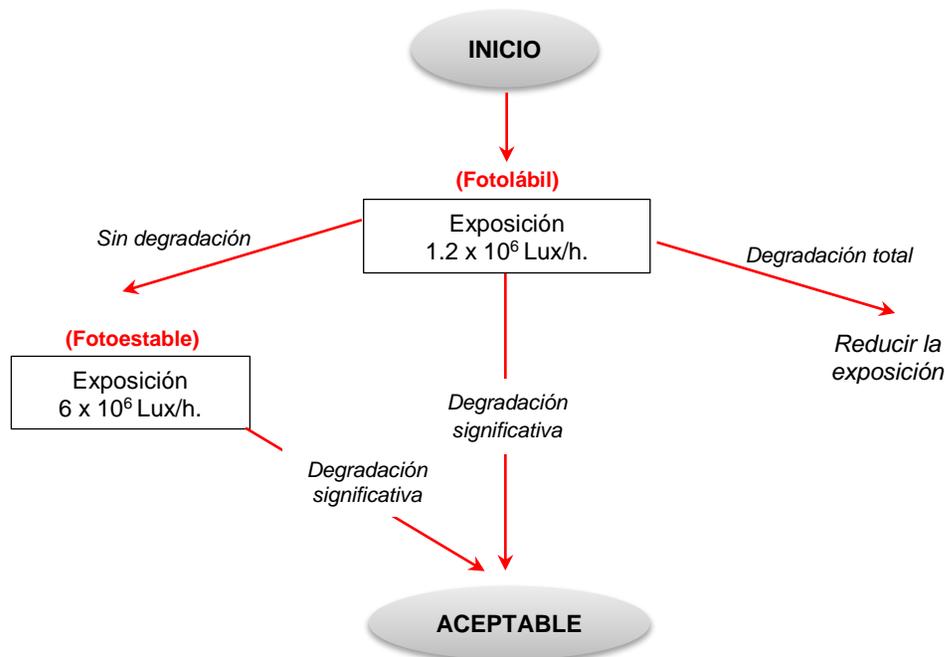


a) Vista lateral del prototipo de cámara de fotoestabilidad. En la parte inferior de la imagen se observan los interruptores del sistema de ventilación para regular la temperatura interna de la cámara (27 ± 2 °C)

b) Vista frontal del prototipo de cámara de fotoestabilidad. En la parte superior se observa el sistema que compone la fuente de luz compuesta (lado derecho lámpara halógena/lado izquierdo lámpara fluorescente).

c) Muestras del extracto optimizado de *P. quadrangularis* sometidas al estudio de estabilidad en condiciones de estrés fotolítica.

Figura 6-5. Diagrama de flujo para la realización de estudios de estabilidad bajo condiciones de estrés fotolítica.



Modificado de Singh y Bakshi (2000)

En la cámara, sobre un vidrio de reloj 500 mg del extracto liofilizado fueron distribuidos homogéneamente. Para cada muestreo se tomaron 10 mg del extracto y se disolvieron en 10 mL de una solución MeOH:H₂O (1:1) para la cuantificación de FT y flavonoides individuales por CLAE.

6.1.5 Estabilidad acelerada e intermedia

Las condiciones establecidas en las pruebas de estabilidad intermedia y acelerada para productos farmacéuticos varían de acuerdo con la clasificación de las zonas climáticas, en donde Colombia está catalogada dentro del grupo IV (30 °C/ 75% HR). Específicamente, en el Anexo 2 de la guía para ensayos de estabilidad de ingredientes farmacéuticos activos y productos farmacéuticos terminados propuesta por la ICH (International Committee of Harmonization) se recomienda realizar los estudios de estabilidad a condiciones controladas de almacenamiento a mediano plazo durante un periodo de 6 a 12 meses a 30 °C ± 2 °C/65% RH ± 5% HR. Para la estabilidad acelerada se plantea en la guía trabajar con condiciones de 40 °C ± 2 °C/75% RH ± 5% HR por 6 meses.

Si bien esta guía está propuesta para la determinación de la vida útil de productos farmacéuticos terminados, se utilizaron los lineamientos descritos en ella para determinación del tiempo de vida útil del extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* por considerarse un sistema multicomponente. De acuerdo con esto, se evaluó la estabilidad del extracto optimizado de *P. quadrangularis* en cámaras de estabilidad certificadas a dos condiciones diferentes durante 6 meses (Ver Tabla 6-1). Dentro de cada cámara se colocaron 2 lotes diferentes de extracto y la concentración de flavonoides totales fue monitoreada a los 30, 60, 90 y 180 días empleando la metodología analítica descrita en capítulos anteriores.

Tabla 6-1. Condiciones evaluadas en el estudio de estabilidad intermedia y acelerada

Cámara	Condición Evaluada	Temperatura (°C)	Humedad Relativa (%)
1	Estabilidad Intermedia	30 ± 2	75 ± 5
2	Estabilidad Acelerada	40 ± 2	75 ± 5

6.2 Análisis estadístico

El análisis estadístico y las gráficas de estabilidad bajo condiciones de estrés y estabilidad a condiciones de almacenamiento controladas fueron realizados en el software GraphPad Prism® versión 7.0. Los datos obtenidos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía con medidas repetidas en el tiempo seguido de un análisis de comparación de medias Dunnet (cada medición vs el tiempo 0) con un valor de significancia de $p < 0.05$.

6.3 Resultados y discusión

Para la evaluación de la estabilidad bajo condiciones de estrés, estabilidad intermedia y estabilidad aceleradas se realizó el seguimiento de la concentración flavonoides totales por CLAE-DAD. Para esta cuantificación se tuvieron en cuenta las áreas de los picos de los flavonoides orientina 2''-O-glucósido, orientina 2''-O-xilósido, orientina, vitexina 2''-O-

glucósido, vitexina 2"-O-xilósido y vitexina, ya que son los compuestos presentes en el extracto optimizado sin degradación (Ecuación 3-1).

Para las pruebas de estabilidad bajo condiciones de estrés, debido a la presencia de productos de degradación en diferentes pruebas realizadas, fue necesario seguir el comportamiento individual de cada uno de los flavonoides C-glicosilados del extracto optimizado y de los productos de degradación. El contenido de cada uno de los compuestos (flavonoides y productos de degradación) se expresa como cantidad relativa y su unidad de concentración está dada en porcentaje, el cual se determinó mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 6-1

$$\text{Cantidad relativa (\%)} = \frac{\text{Área de la señal cromatografica del compuesto}}{\text{Sumatoria de las áreas de todas la señales cromatograficas}} \times 100$$

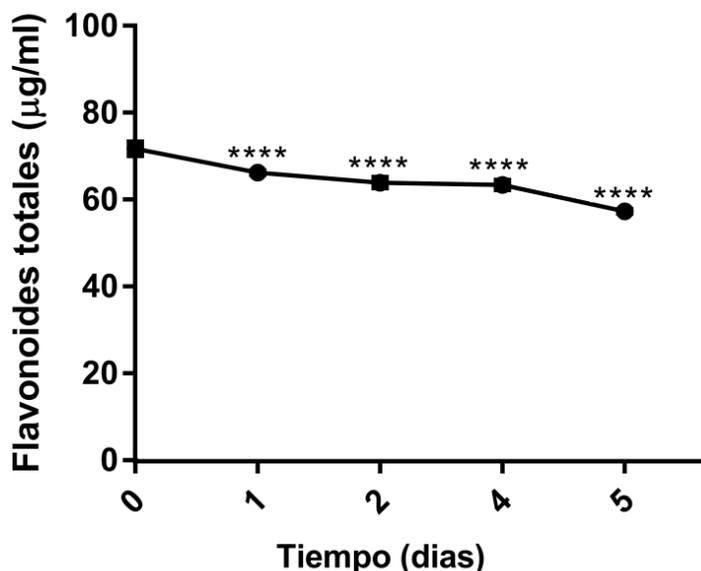
A continuación, se presentan los resultados obtenidos para la evaluación de la estabilidad del extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* bajo condiciones de estrés y estabilidad en condiciones de almacenamiento controladas.

6.3.1 Estabilidad bajo condiciones de estrés: Hidrólisis

Siguiendo al árbol de decisión propuesto por Singh y Bakshi (2002) el extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* debió someterse a hidrólisis en reflujo por 5 días para alcanzar una degradación significativa de los flavonoides totales. La concentración de flavonoides totales del extracto optimizado al inicio del estudio fue de 71.968 µg/mL y luego de los 5 días la concentración disminuyó hasta 57.562 µg/mL, siendo esto una degradación del 20.1%. El comportamiento de la concentración de flavonoides totales bajo esta condición de estrés se esquematiza en la Figura 6-6. Aunque el porcentaje de degradación se encuentra en el límite inferior del rango de degradación significativa propuesta por Singh y Bakshi (20-80%), es válido con base en estos resultados clasificar el extracto como **PRÁCTICAMENTE ESTABLE** frente a hidrólisis en condiciones neutras.

Por otra parte, al comparar el perfil cromatográfico del extracto una vez finalizada la prueba no se observaron cambios con respecto al perfil inicial, es decir que no se generaron productos de degradación por hidrólisis con reflujo después de 5 días.

Figura 6-6. Concentración de flavonoides totales de un extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* bajo condiciones de estrés con hidrólisis neutra.



Los datos son graficados como la media \pm SD. Se analizaron mediante un ANOVA de una vía con medidas repetidas en el tiempo seguido por un test Dunnet comparado con el tiempo 0, los valores de significancia están dados por * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Al contrastar estos resultados por los reportados por Medina (2014) donde se evaluó la estabilidad de un extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis*. Se encontró para el extracto acuoso una degradación significativa al exponerlo a reflujo durante 24 horas, clasificándolo como estable.

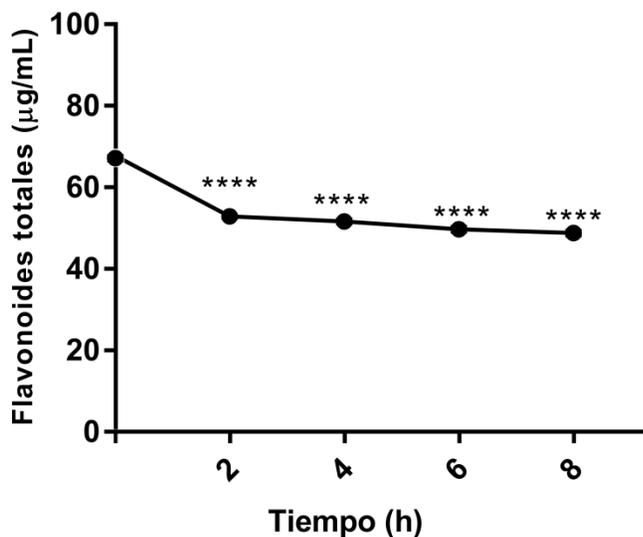
6.3.2 Estabilidad bajo condiciones de estrés: Hidrólisis básica

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta prueba, se alcanzó una degradación significativa de la concentración de flavonoides totales en condiciones de reflujo con

NaOH 0.1 N durante 8 horas. Como se puede observar en la Figura 6-6, después de 2 horas la concentración de flavonoides totales en la muestra comienza a disminuir significativamente hasta alcanzar un porcentaje de degradación del 28.2% al finalizar la prueba.

Según a lo establecido en el árbol de decisión y sistemas de clasificación de estabilidad propuestos por Singh & Bakshi el extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* bajo condiciones de estrés con hidrólisis básica está catalogado como **LÁBIL**. Estos resultados son similares a los reportados por Medina (2014) para un extracto acuoso de hojas de esta misma especie.

Figura 6-7. Concentración de flavonoides totales del extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* bajo condiciones de estrés con hidrólisis básica (NaOH 0.1 N, Reflujo por 8 horas)

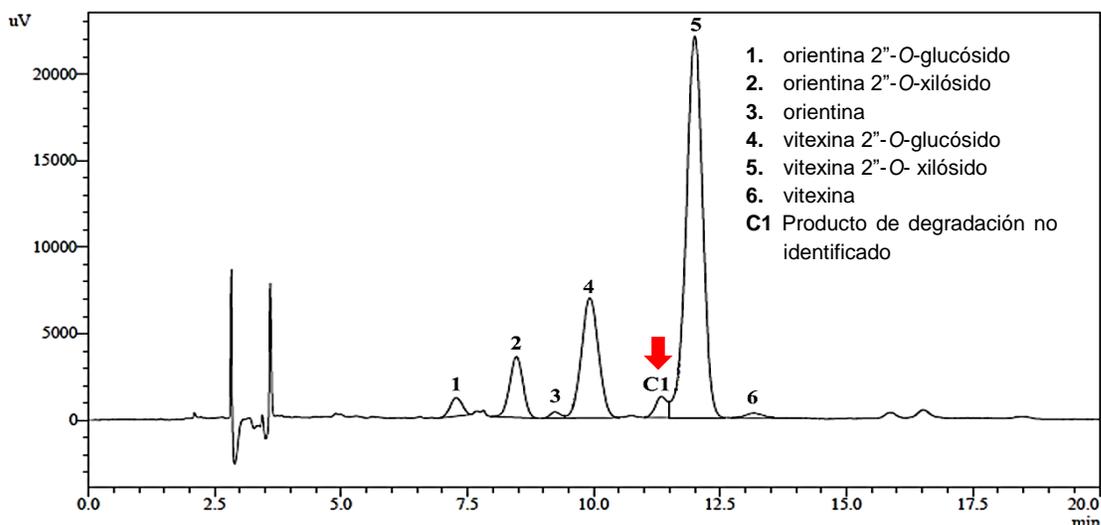


Los datos son graficados como la media \pm SD. Se analizaron mediante un ANOVA de una vía con medidas repetidas en el tiempo seguido por un test Dunnet comparado con el tiempo 0, los valores de significancia están dados por * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Por otra parte, al observar el perfil cromatográfico del extracto optimizado luego de finalizar la prueba de estabilidad bajo estas condiciones se evidenció la presencia de una nueva señal cromatográfica en el tiempo de retención 11.251 min perteneciente a un producto de degradación desconocido. En la Figura 6-6 se muestra el cromatograma de

la hora 8 de hidrólisis con NaOH 0.1 N en reflujo, nombrando como C1 el producto de degradación.

Figura 6-8. Perfil cromatográfico del extracto optimizado de *P. quadrangularis* en el punto final de la evaluación de estabilidad bajo condiciones de estrés por hidrólisis básica (NaOH 0.1 N, Reflujo por 8 horas)

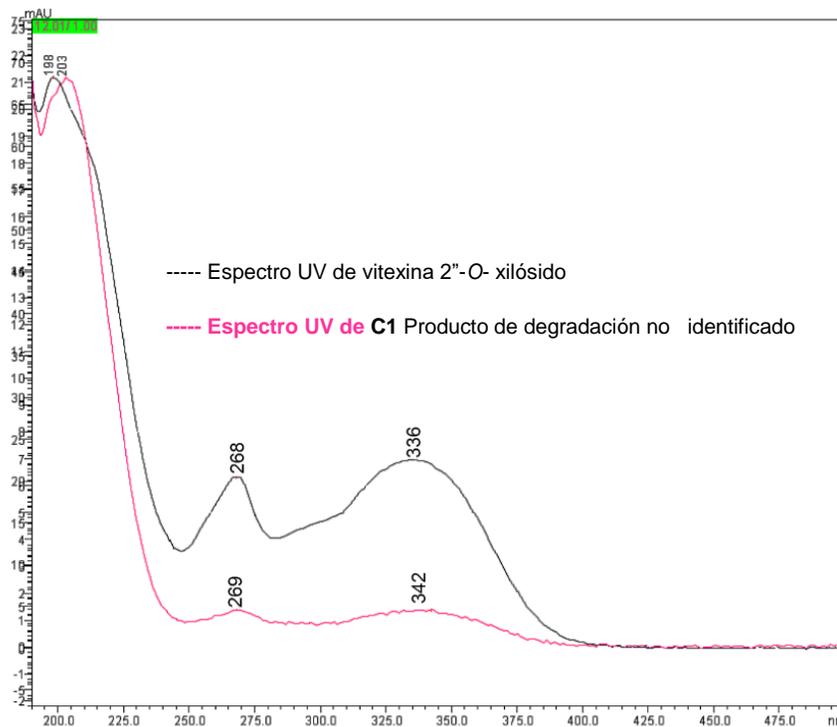


La cuantificación de flavonoides totales se realizó bajo las siguientes condiciones cromatográficas: Fase Estacionaria: Columna C18 Phenomenex Luna® (250 mm x 4,6 mm i.d. 5 µm). Fase Móvil: Fase A agua:acetonitrilo:ácido acético (90:10:1); Fase B acetonitrilo:agua:ácido acético (90:10:1), el gradiente inicia en 11% de la fase B de 0 a 5 minutos, 11% a 15% de la fase B de 5 a 20 min en gradiente lineal. Flujo de 1 mL/min. Temperatura del horno: 28 °C. Volumen de inyección: 10 µL. Longitud de onda de detección (λ): 340 nm.

Aunque no fue posible realizar la identificación completa de C1 como producto de degradación por acción de hidrólisis básica, se utilizó la espectroscopia ultravioleta como herramienta para lograr evidenciar algo de la naturaleza química de este compuesto ya que algunos metabolitos secundarios tienen espectros característicos de absorción en la región ultravioleta. Por ejemplo, los flavonoides debido al núcleo de benzopirona de su estructura base presentan dos máximos de absorción: el primero de ellos conocido como banda II se genera aproximadamente entre 240-285 nm y el segundo identificado como banda I ocurre entre 300-400 nm. Esta última banda puede ayudar a diferenciar entre diferentes tipos de flavonoides, ya que en el caso específico de las flavonas la banda I se

da entre 304-350 nm, mientras que para los flavonoles se observa entre 352 y 385 nm (Zuanazzi, Montanha y Zucolotto, 2017)

Figura 6-9. Espectro UV del producto de degradación (C1) generado en la degradación del extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* en reflujo con NaOH 0.1 N durante 8 horas.



Con base a lo anterior y observando el espectro UV obtenido para C1, aunque no es concluyente debido a que la intensidad de las bandas no es muy fuerte, se podría suponer que este compuesto es de tipo flavonoide, más específicamente flavona, ya que las dos bandas de absorción se muestran en 269 y 342 nm (Figura 6-8). Este resultado sería coherente, ya que las agliconas de las cuales se derivan los flavonoides C-glicosilados del extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* son de tipo flavona (luteolina y apigenina).

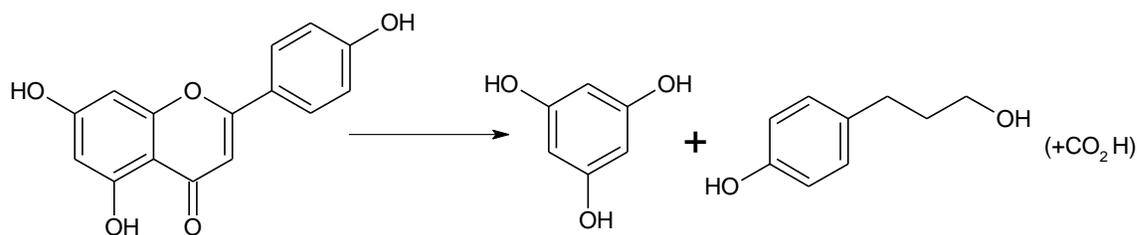
Analizando las cantidades relativas de cada uno de los flavonoides presentes en el extracto (Figura 6-8) se observa que, en todos los compuestos, incluyendo el producto de degradación a las 2 horas comienzan a presentarse cambios estadísticamente significativos en las concentraciones. Específicamente, en los derivados de orientina se

observa que al disminuir la cantidad relativa de los compuestos C-diglicosilados a las dos horas hay un aumento en la presencia de orientina lo cual se debe a la pérdida de la segunda unidad de azúcar.

Con respecto a vitexina y sus derivados, la cantidad de relativa de vitexina 2'' -O-xilósido y vitexina comienzan a disminuir luego de las 2 horas de iniciar el proceso de hidrólisis con NaOH mientras se evidencia la aparición de C1. Este comportamiento sugiere que estos dos flavonoides podrían ser los precursores de dicho producto de degradación.

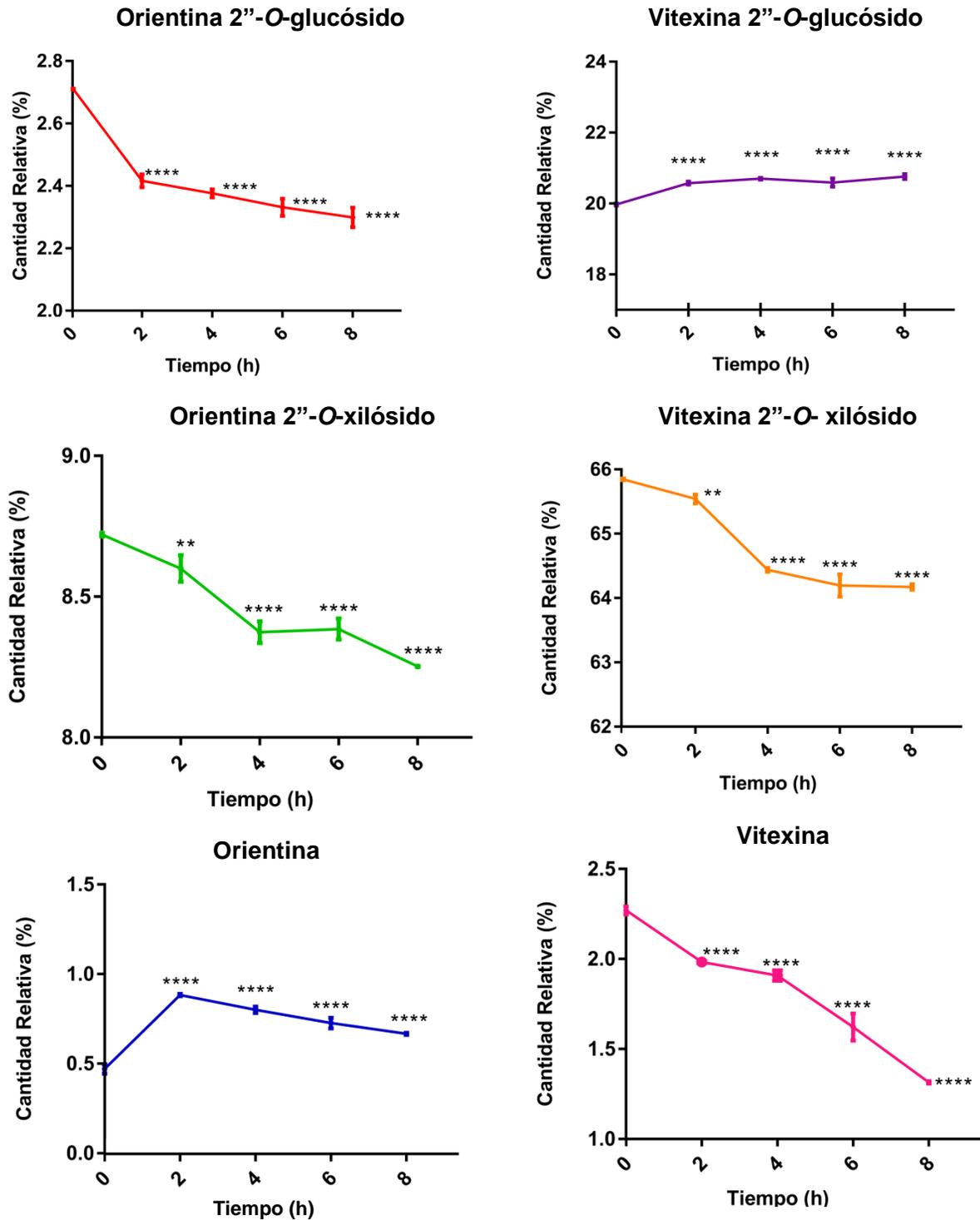
Por último, aunque reportes en la literatura muestran que los flavonoides en condiciones de hidrólisis alcalina pueden sufrir una abertura en el anillo C, produciendo dos fragmentos compuestos del anillo A y el anillo B como se muestra en la Figura 6-10 (Markham, 1982), se descarta que el producto de degradación C1 corresponda a alguno de estos fragmentos, ya que por su estructura química, sus respectivas señales cromatográficas aparecerían a menores tiempo retención respecto a los flavonoides.

Figura 6-10. Mecanismo de reacción en la degradación de flavonoides por exposición a medio básico.

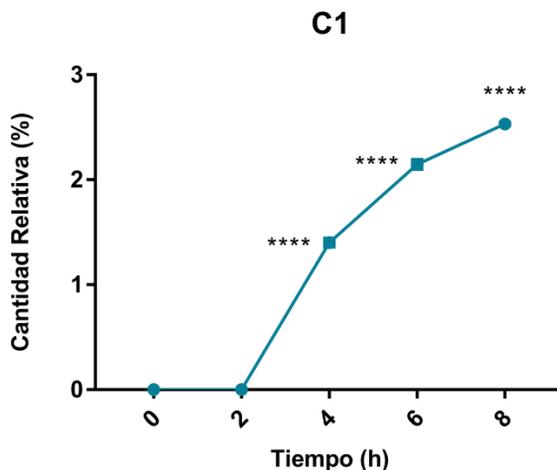


Tomado de Markham (1982)

Figura 6-11. Cantidad relativa de flavonoides presentes en el extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* y productos de degradación en el estudio de estabilidad bajo condiciones de estrés con hidrólisis básica (NaOH 0.1 N, Reflujo por 8 horas).



Continuación



Los datos son graficados como la media \pm SD. Se analizaron mediante un ANOVA de una vía con medidas repetidas en el tiempo seguido por un test Dunnet comparado con el tiempo 0, los valores de significancia están dados.

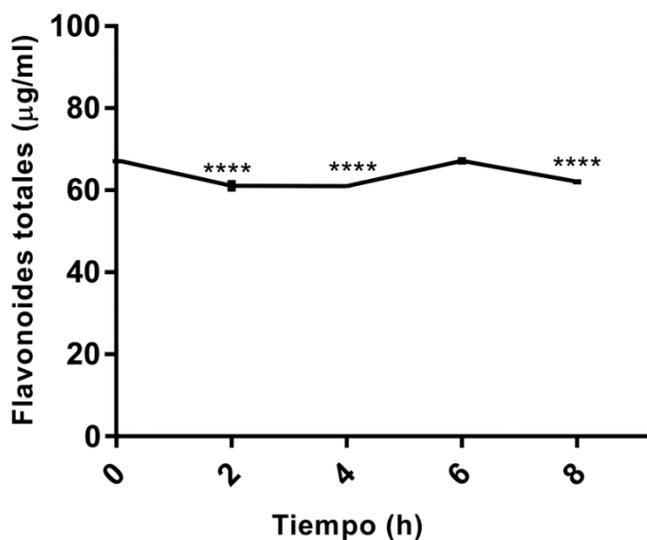
6.3.3 Estabilidad bajo condiciones de estrés: Hidrólisis ácida

Se sometió en primera instancia el extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* a degradación con HCl 0.1 N en condiciones de reflujo por 8 horas. Como resultado de este procedimiento se encontró un porcentaje de degradación de flavonoides totales de 7.8%. Si bien la degradación no superó el 20%, bajo esta condición se evidenció un cambio en el perfil cromatográfico al finalizar la prueba, lo que indicó la aparición de productos de degradación, los cuales por co-inyección con estándares certificados se lograron identificar como flavonoides de tipo isoflavonas, más específicamente isorientina e isovitexina (Figura 6-13).

Siguiendo el árbol de decisión para hidrólisis ácida, el extracto optimizado se sometió nuevamente a reflujo con HCl a una concentración más alta y por un periodo de tiempo más prolongado (HCl a 1 N por 12 horas). Bajo estas condiciones se degradaron 100% de los flavonoides totales y a las 3 horas de dar inicio la degradación se evidenció la presencia de las señales cromatográficas correspondientes a los isómeros. Al finalizar el proceso los flavonoides de orientina y vitexina junto con sus respectivos isómeros eran los únicos compuestos presentes.

Con base en estos resultados, se decidió clasificar el extracto optimizado de acuerdo a la primera condición evaluada, ya que aunque no se alcanzó una degradación significativa del principio activo (flavonoides totales) recomendada por Singh y Bakshi, si se logró evidenciar la generación de productos de degradación. Por ende, el extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* se consideró **LÁBIL** a condiciones de estrés por hidrólisis en medio ácido.

Figura 6-12. Concentración de flavonoides totales del extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* bajo condiciones de estrés con hidrólisis ácida (HCl 0.1 N, Reflujo por 8 horas).

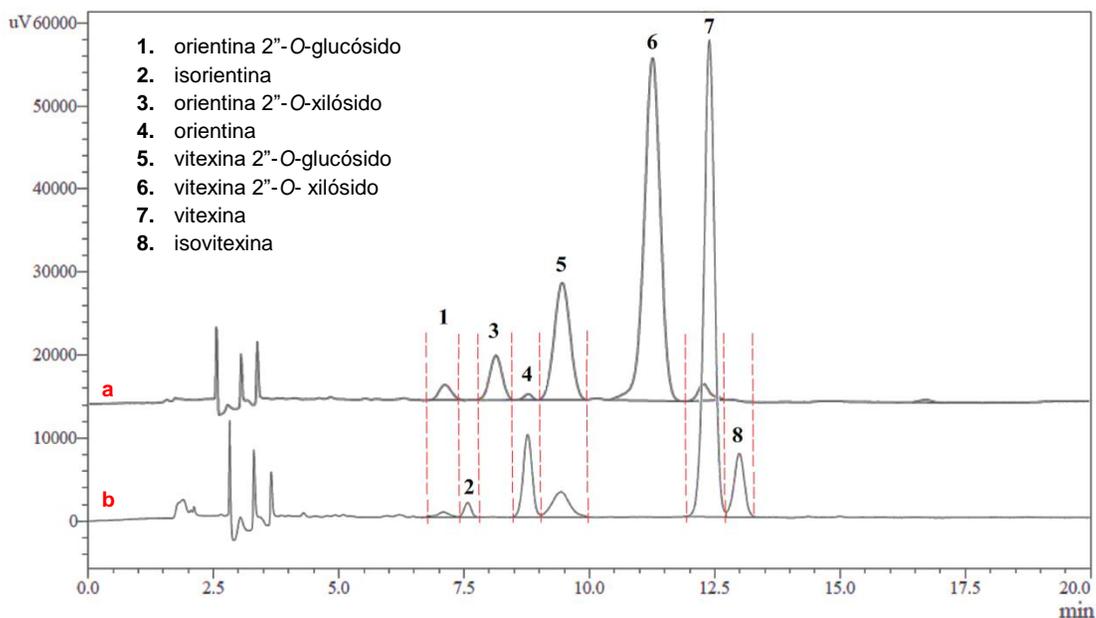


Los datos son graficados como la media \pm SD. Se analizaron mediante un ANOVA de una vía con medidas repetidas en el tiempo seguido por un test Dunnet comparado con el tiempo 0, los valores de significancia están dados por * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Según lo reportado por Medina (2014) el extracto acuoso de hojas de esta Passiflora al ser expuesto a degradación con HCl 0.1 N en reflujo por 8 horas alcanzó una degradación significativa de los flavonoides totales, aunque no se detectó la presencia de isorientina e isovitexina en el punto final de la evaluación de estabilidad bajo esta condición de estrés. Posiblemente, al haber mayor concentración de flavonoides totales en el extracto optimizado fue posible que estos productos de degradación superarán el

límite de detección de la metodología analítica empleada, siendo así viable el monitoreo de estos productos de degradación.

Figura 6-13. Perfiles cromatográficos del extracto optimizado de *P. quadrangularis* en la evaluación de estabilidad bajo condiciones de estrés por hidrólisis ácida.

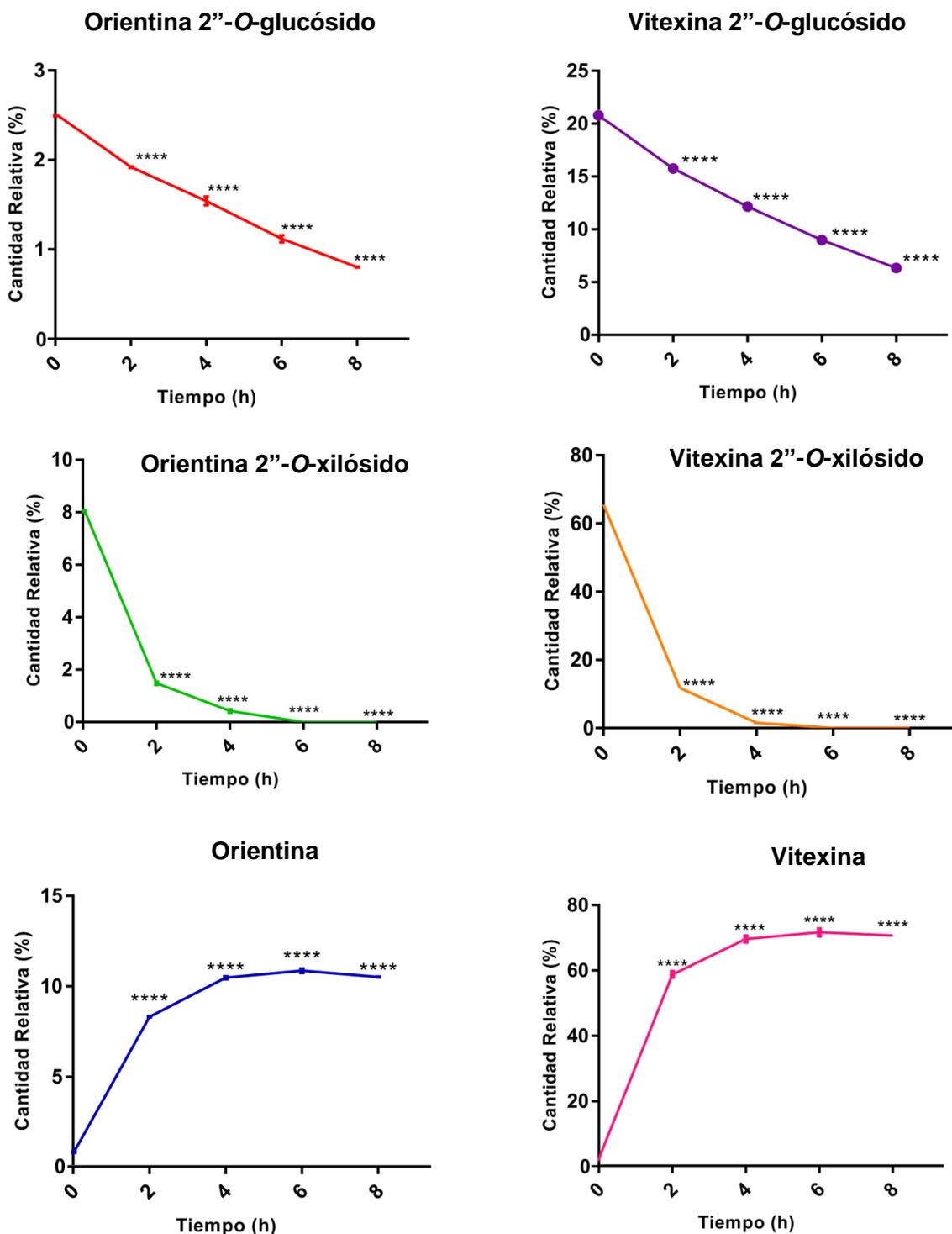


a). Perfil cromatográfico del extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* en $t=0$ horas de la evaluación de la estabilidad bajo condiciones de estrés por hidrólisis ácida.

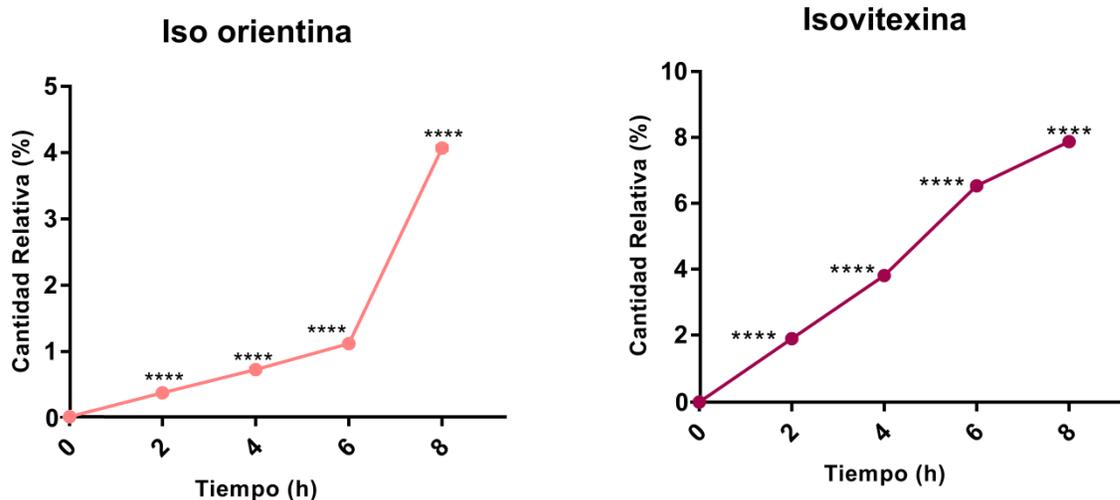
b). Perfil cromatográfico del extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* en $t=8$ horas de la evaluación de la estabilidad bajo condiciones de estrés por hidrólisis ácida. Las señales cromatográficas 2 y 8 corresponden a productos de degradación por HCl a 0.1 N.

La cuantificación de flavonoides totales se realizó bajo las siguientes condiciones cromatográficas: Fase Estacionaria: Columna C18 Phenomenex Luna® (250 mm x 4,6 mm i.d. 5 μ m). Fase Móvil: Fase A agua:acetonitrilo:ácido acético (90:10:1); Fase B acetonitrilo:agua:ácido acético (90:10:1), el gradiente inicia en 11% de la fase B de 0 a 5 minutos, 11% a 15% de la fase B de 5 a 20 min en gradiente lineal. Flujo de 1 mL/min. Temperatura del horno: 28 °C. Volumen de inyección: 10 μ L. Longitud de onda de detección (λ): 340 nm.

Figura 6-14. Cantidad relativa de flavonoides presentes en el extracto hidroalcohólico de hojas de *P. quadrangularis* y productos de degradación en el estudio de estabilidad bajo condiciones de estrés con hidrólisis básica (HCl 0,1 N, Reflujo por 8 horas)



Continuación



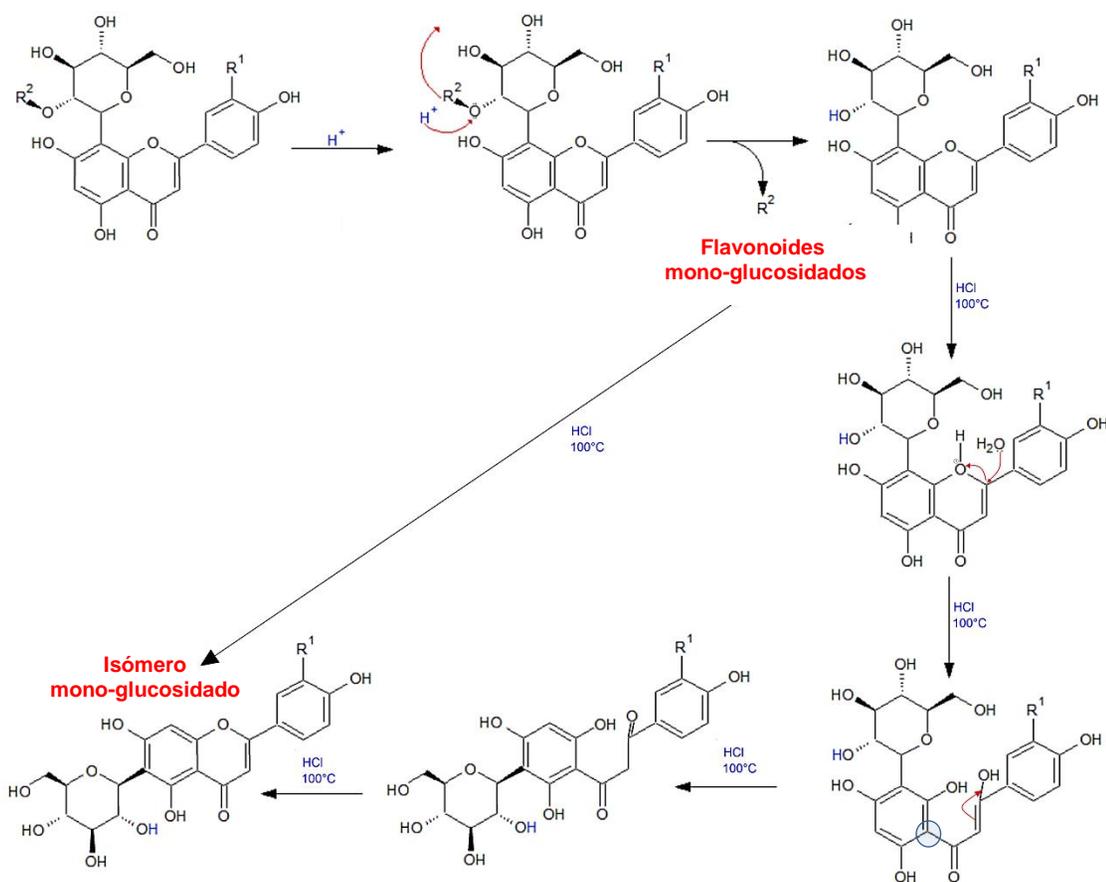
Los datos son graficados como la media \pm SD. Se analizaron mediante un ANOVA de una vía con medidas repetidas en el tiempo seguido por un test Dunnet comparado con el tiempo 0, los valores de significancia están dados por * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Como se puede apreciar, la degradación de los flavonoides orientina 2''-O-xilósido y vitexina 2''-O-xilósido se da a mayor velocidad que los flavonoides cuya segunda unidad de azúcar es glucosa. Este comportamiento se debe a que generalmente bajo condiciones de hidrólisis ácida las pentosas son hidrolizadas más rápido que las hexosas (Jeffrey, Marby y Marby, 1975). Al darse la ruptura del enlace C-O entre los azúcares y la aglicona se evidencia un aumento en la cantidad relativa de los flavonoides mono-C-glicosilados de orientina y vitexina.

Con respecto al comportamiento de los productos de degradación, los cuales corresponden a isorientina e isovitexina se evidencia en las gráficas que desde que inicia el proceso de hidrólisis la cantidad relativa de estos compuestos comienza a aumentar significativamente. Cuando los flavonoides C-glicosilados son expuestos a altas temperaturas en presencia de un ácido fuerte no se puede hidrolizar el enlace del azúcar unido directamente al núcleo, aunque se genera un arreglo sobre el núcleo benzopirona conocido como transposición de Wessely-Moser. Este arreglo involucra la apertura del anillo heterocíclico, la posterior rotación del anillo A alrededor del enlace carbonilo simple del anillo A y por último el restablecimiento del heterociclo; originando la forma isomérica. Específicamente, la interconversión tiene efecto sobre 6 y 8-C-glicósidos, por ejemplo en

el caso de 8-C-glucosilapigenina (vitexina) al ser expuesta a calentamiento prolongado con un ácido fuerte genera la aparición del isómero 6-C-glucosilapigenina (isovitexina) (Bohm, 1998; Day & Harborne, 1989; Krishnaswamy, 1999). En la siguiente figura se propone un mecanismo de reacción para la isomerización de los flavonoides de vitexina y/o orientina.

Figura 6-15. Mecanismo de reacción en la degradación de flavonoides C-diglicosilados por exposición a medio ácido y calentamiento.



Flavonoide	R ¹	R ²
Orientina 2"-O-glucósido	OH	Glc
Orientina 2"-O-xilósido	OH	Xyl
Orientina	OH	----
Isorientina	OH	----
Vitexina 2"-O-glucósido	H	Glc
Vitexina 2"-O-xilósido	H	Xyl
Vitexina	H	----
Isovitexina	H	----

Adaptado y modificado de Bohm, 1998; Krishnaswamy, 1999; Day y Harborne, 1989

Anteriormente, se mencionó que Gomes et al., 2017 identificaron en hojas de *P. quadrangularis* isovitexina en una concentración de 2.60 ± 0.079 mg/g extracto. De acuerdo con los resultados obtenidos para el extracto optimizado este isómero es considerado un producto de degradación, por ende se presume que posiblemente la identificación de este compuesto realizada por Gomes y colaboradores se debe a que los flavonoides presentes en la muestra sufrieron se degradaron por las condiciones de extracción empleadas (Método de extracción ASE, temperatura de 80°C, etanol 64% y 5 ciclos de extracción).

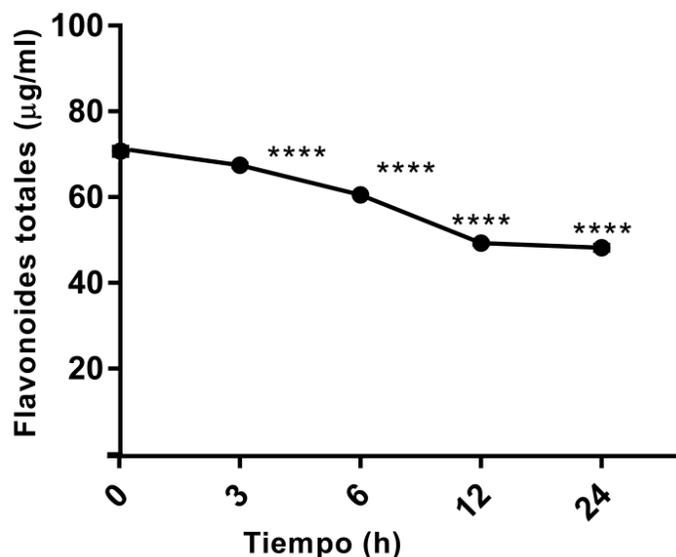
6.3.4 Estabilidad bajo condiciones de estrés por oxidación con H₂O₂

Siguiendo el respectivo árbol de decisión y teniendo en cuenta las condiciones previas reportadas por Medina (2014) para la evaluación de estabilidad de un extracto acuoso obtenido de hojas de badea, fue necesario exponer el extracto hidroalcohólico durante 24 horas con H₂O₂ al 30% para alcanzar una degradación significativa de los flavonoides totales (32.2%). Con base en este resultado se clasificó el extracto hidroalcohólico como **PRACTICAMENTE ESTABLE** bajo condiciones de estrés por oxidación con peróxido de hidrógeno.

En la Figura 6-16 se muestra como el contenido de flavonoides totales va disminuyendo significativamente a través del tiempo. Sin embargo, en el perfil cromatográfico no se evidenció la aparición de alguna nueva señal que indicara la formación de productos de degradación.

-

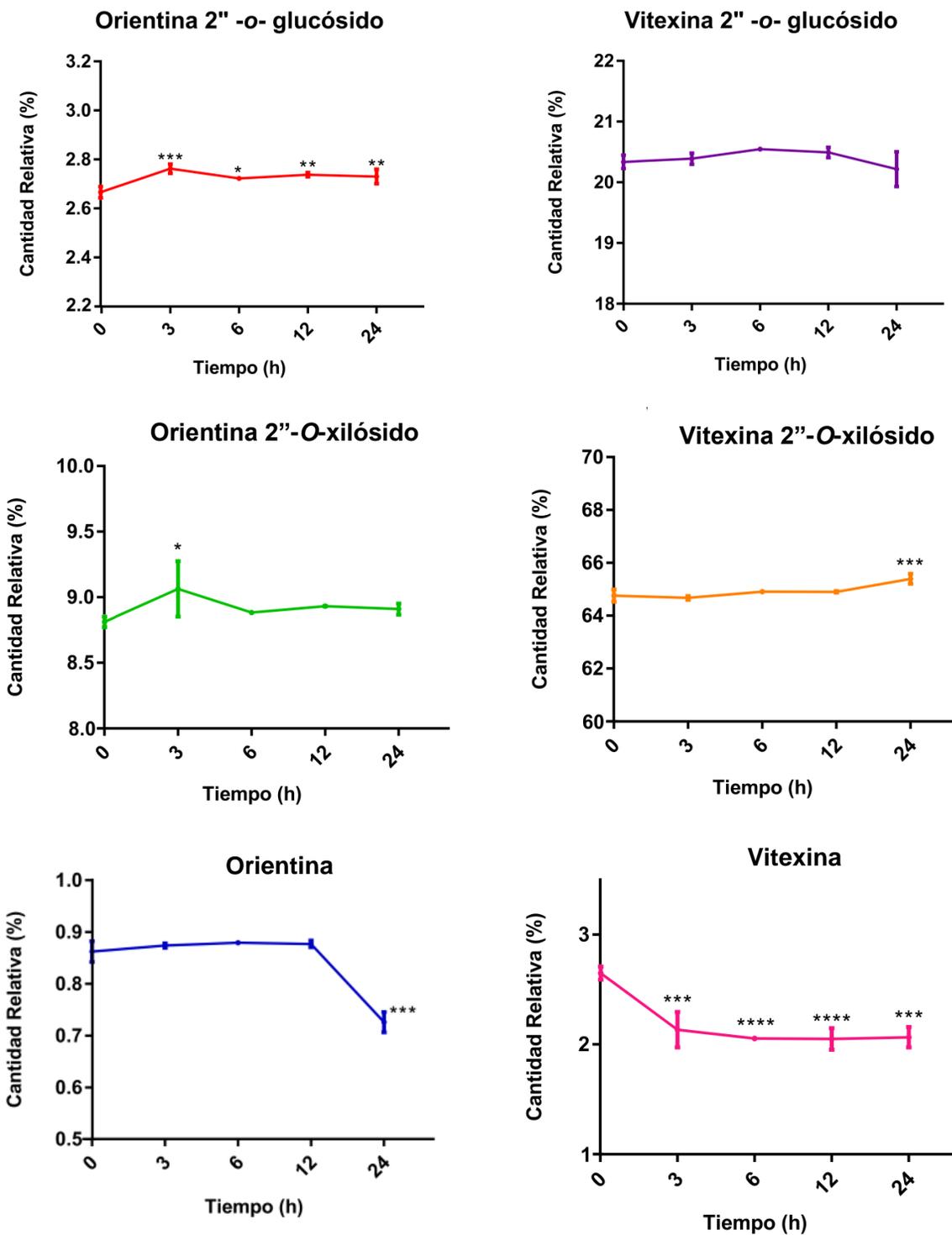
Figura 6-16. Cantidad relativa de flavonoides presentes en el extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* y productos de degradación en el estudio de estabilidad bajo condiciones de estrés con peróxido de hidrogeno (H_2O_2 al 30% durante 24 horas)



Los datos son graficados como la media \pm SD. Se analizaron mediante un ANOVA de una vía con medidas repetidas en el tiempo seguido por un test Dunnet comparado con el tiempo 0, los valores de significancia están dados por * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Al observar el comportamiento de los flavonoides individuales a las 24 horas después de ser expuestos al contacto con H_2O_2 se encontró una variación significativa en las cantidades relativas de todos los flavonoides exceptuando vitexina 2"-O-glucósido y orientina 2"-O-xilósido. También se halló que los flavonoides que presentaron una disminución significativa en su cantidad relativa fueron los de tipo C-glicosilados, es decir orientina y vitexina.

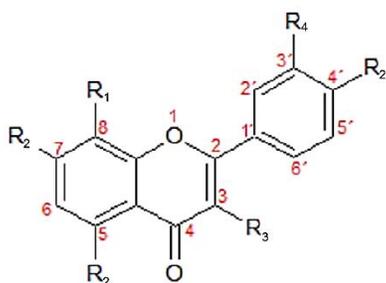
Figura 6-17. Cantidad relativa de flavonoides presentes en el extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* en el estudio de estabilidad bajo condiciones de estrés con peróxido de hidrógeno (H₂O₂ al 30% por 24 horas).



Los datos son graficados como la media \pm SD. Se analizaron mediante un ANOVA de una vía con medidas repetidas en el tiempo seguido por un test Dunnet comparado con el tiempo 0, los valores de significancia están dados por * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

La estabilidad del extracto optimizado bajo condiciones de estrés con peróxido de hidrógeno puede ser explicada desde la estructura química de los compuestos presentes en este. Como se observa en la Figura 1-4, los flavonoides caracterizados para hojas de *P. quadrangularis* son flavonas del tipo C-glicosilado cuyo enlace se encuentra posicionado en el carbono 8; debido a esta característica hace que los flavonoides de este tipo sean más estables a degradación por oxidación. Por ejemplo, en pruebas *in vitro* realizadas para evaluar el efecto protector de algunos flavonoides identificados en tiras epidérmicas de *Tradescantia virginiana*, se encontró que los glicósidos de luteolina son menos sensibles a oxidación con H_2O_2 que los glicósidos de quercetina y kaempferol (Umeo, 1988). Generalmente, los flavonoles O-glicosilados son más susceptibles a degradación por H_2O_2 debido a que pierden con facilidad el azúcar unido al carbono C3 (Jeffrey et al., 1975).

Figura 6-18. Estructura química de los núcleos de flavonas y flavonoles.



Flavonoide	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Núcleo Flavona	H	H	H	H
Núcleo Flavonol	H	H	OH	H
Luteolina	H*	OH	H	OH
Quercetina	H	OH	OH*	OH
Kaempferol	H	OH	OH*	H

* Posición para enlace con glicósidos

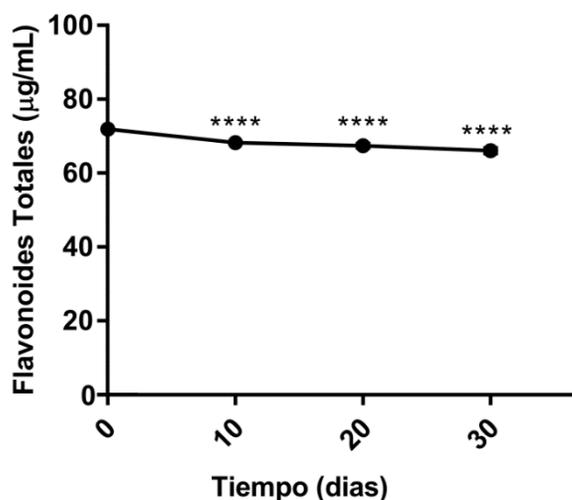
6.3.5 Estabilidad bajo condiciones de estrés fotolítica

Siguiendo el árbol de decisión el extracto fue inicialmente expuesto a 1.2×10^6 Lux*h, pero no se presentó degradación de los flavonoides bajo estas condiciones. Por consiguiente, se realizó una exposición más prolongada de la muestra dentro de la cámara de fotoestabilidad (30 días), con el objetivo de alcanzar una exposición correspondiente a 6.6×10^6 Lux*h. Una vez alcanzado este nivel de lux se cuantificó el contenido de flavonoides totales por CLAE, encontrándose tan solo una disminución en la concentración de estos compuestos del 5.2%. Este resultado permite clasificar el extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* como **FOTOESTABLE**.

En la Figura 6-19 se representa gráficamente el cambio en la concentración de flavonoides totales durante el tiempo de muestreo. Aunque existieron diferencias significativas entre la concentración final vs la inicial, el porcentaje de degradación de estos metabolitos no fue suficiente de acuerdo con la guía de Singh y Bakshi (2002) para determinar que el extracto es fotolábil.

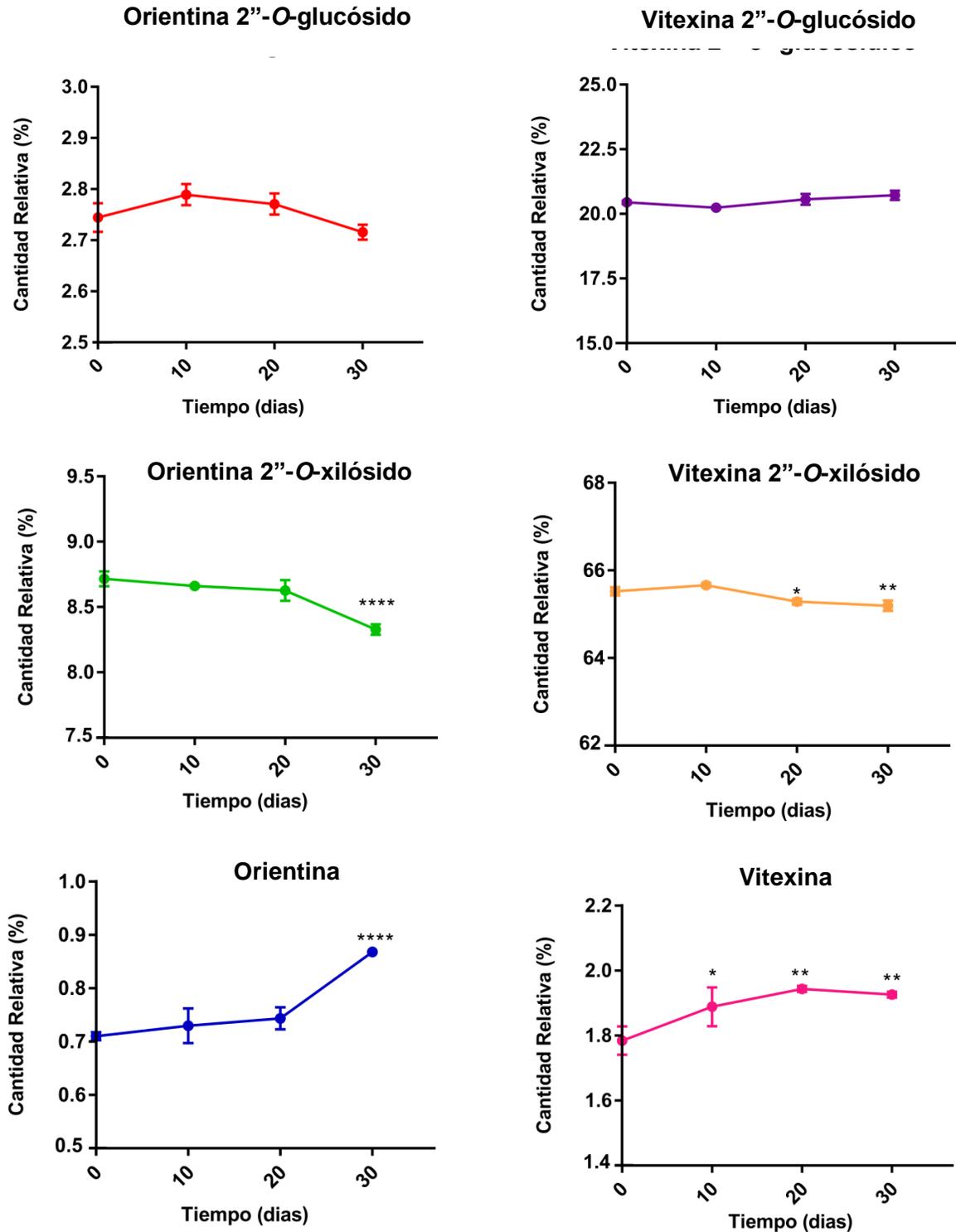
Por otra parte, en el perfil cromatográfico del extracto expuesto a 6.6×10^6 Lux*h no se encontraron nuevas señales cromatográficas que indicaran la generación de productos de degradación. Sin embargo, al analizar las cantidades relativas de los flavonoides al día 30 de la evaluación se encontró un aumento de los flavonoides orientina y vitexina y una disminución en orientina 2''-O-xilósido y vitexina 2''-O-xilósido. Estos resultados sugieren que estos dos últimos flavonoides son más susceptibles a degradación por radiación, lo cual produce un aumento en la cantidad relativa de orientina y vitexina.

Figura 6-19. Concentración de flavonoides totales del extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* bajo condiciones de estrés fotolíticas.



Los datos son graficados como la media \pm SD. Se analizaron mediante un ANOVA de una vía con medidas repetidas en el tiempo seguido por un test Dunnet comparado con el tiempo 0, los valores de significancia están dados por * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Figura 6-20. Cantidad relativa de flavonoides presentes en el extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* en condiciones de estrés fotolítica



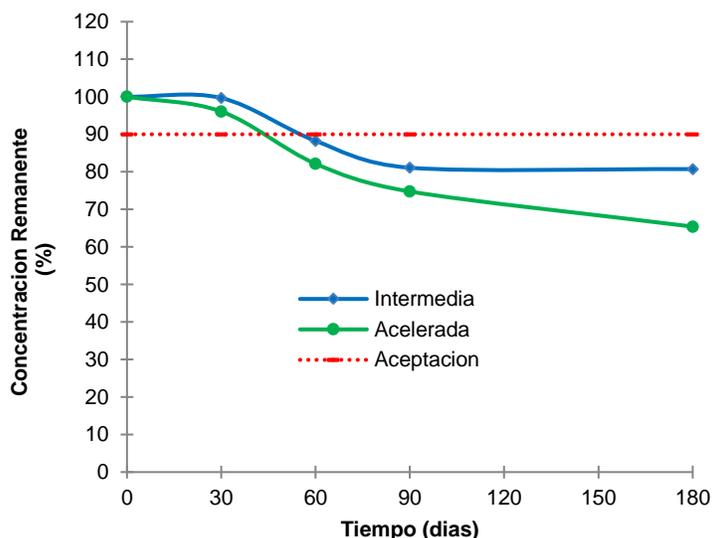
Los datos son graficados como la media \pm SD. Se analizaron mediante un ANOVA de una vía con medidas repetidas en el tiempo seguido por un test Dunnet comparado con el tiempo 0, los valores de significancia están dados por * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

La fotoestabilidad del extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* puede ser explicada desde la naturaleza química de los flavonoides C-glicosilados presentes en el mismo. De acuerdo con reportes, la vía de degradación podría ocurrir por la foto-oxidación del doble enlace C2-C3 del heterociclo por acción de un radical. La alta densidad electrónica de este doble enlace en los flavonoles puede promover el inicio de la reacción la cual es seguida por la ruptura de los enlaces entre C2-C3 y C3-C4. Ahora, si el oxígeno está involucrado como intermediario en la foto-oxidación de los flavonoides, esta alta reactividad con el oxígeno singlete la que podría contribuir a la baja fotoestabilidad de los flavonoles con respecto a las flavonas (Degani et al., 2017).

6.3.6 Estabilidad intermedia y acelerada

Siguiendo los lineamientos de la guía de la WHO (Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products), el extracto optimizado fue almacenado por 6 meses bajo condiciones controladas de temperatura a $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2$ y humedad relativa del $75\%\pm 5$ para la evaluación de la estabilidad intermedia y a $40\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2$ y $75\%\pm 5$ de humedad relativa para la evaluación de la estabilidad acelerada. La concentración de flavonoides totales fue monitoreada al día 30, 60, 90 y 180 de almacenamiento en cámara (Figura 6-21).

Figura 6-21. Concentración de flavonoides totales del extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* en la evaluación de la estabilidad intermedia y acelerada.



Se establece como un cambio significativo una variación mayor al 10% de la concentración del principio activo con respecto a la concentración en el tiempo 0 o un aumento en el contenido de algún producto de degradación que exceda su criterio de aceptación. De acuerdo con esta definición y con los resultados mostrados en la Figura 6-21 en el extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* la concentración de flavonoides totales alcanzó un cambio significativo cerca de los 45 días en la evaluación de la estabilidad acelerada y 60 días en estabilidad intermedia.

Al observar los perfiles cromatográficos de las muestras después de 30 días de almacenamiento bajo condiciones controladas, se observa la aparición de una leve señal en 13.8 min para la muestra sometida a $40^{\circ}\text{C}\pm 2$ y $75\%\pm 5$ de HR la cual a través del tiempo se va intensificando. En la muestra sometida a condiciones de almacenamiento $30^{\circ}\text{C}\pm 2$ y $75\%\pm 5$ de HR esta señal comienza a hacer evidente en el muestreo correspondiente al día 60 (Figura 6-22a y 6-22b).

En la prueba de degradación bajo condiciones de estrés por hidrólisis ácida se identificó que esta señal corresponde al producto de degradación de isovitexina. La concentración de este isómero fue aumentando en ambas pruebas de estabilidad alcanzando una cantidad relativa a los 180 días de 1.0% en el estudio de estabilidad intermedia y 3.7% en estabilidad acelerada. Con respecto al cambio en las cantidades relativas de los otros flavonoides presentes en el extracto en la Tabla 6-2 se muestran los cambios entre el tiempo inicial y final de muestreo para cada una de las condiciones de almacenamiento evaluadas.

Tabla 6-2. Cantidad relativa de flavonoides C-glicosilados presentes en el extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* durante la evaluación de la estabilidad intermedia y acelerada.

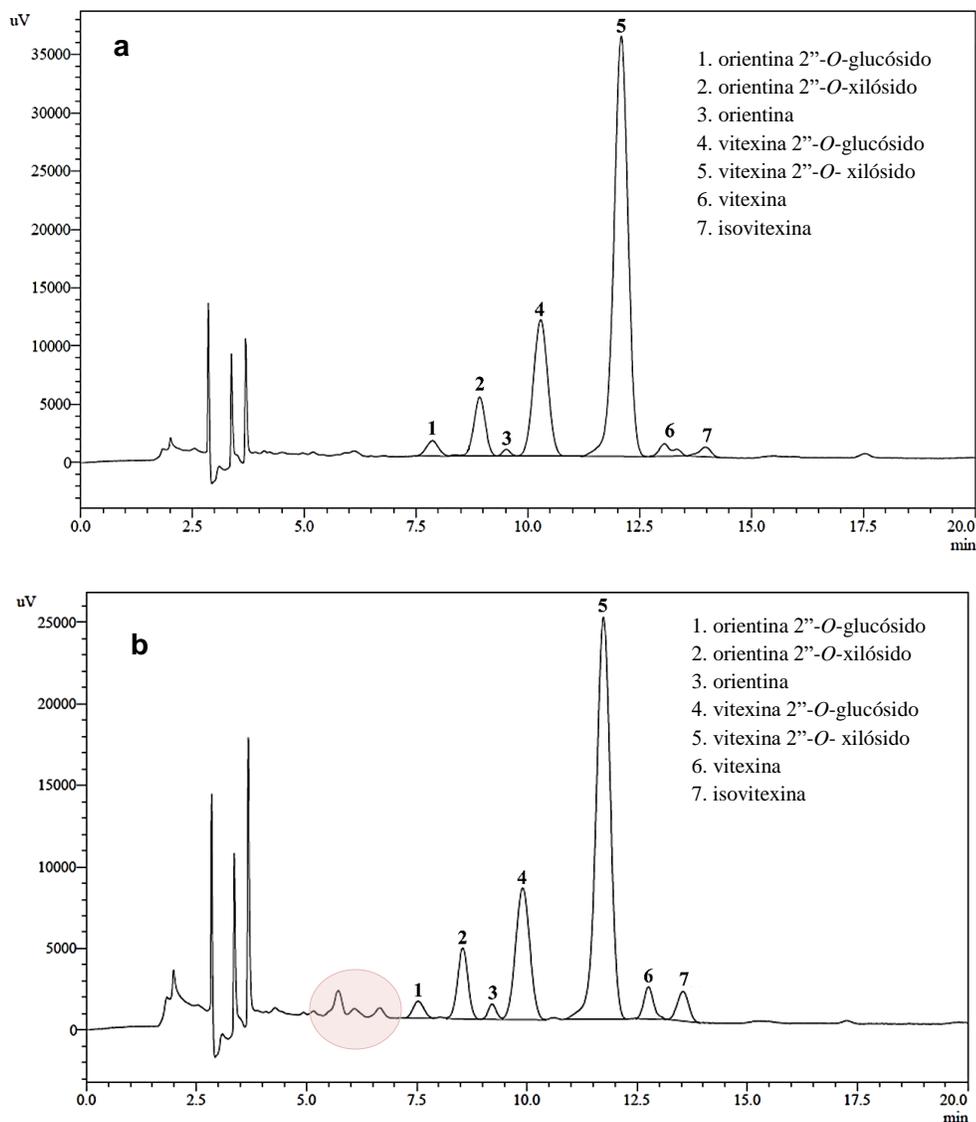
Flavonoide	Cantidad Relativa de Flavonoides (%)			
	Estabilidad Intermedia		Estabilidad Acelerada	
	día 0	día 180	día 0	día180
orientina 2"-O- glucósido	2.0 ± 0.01	2.0 ± 0.05	2.0 ± 0.01	2.0 ± 0.01
orientina 2"-O- xilósido	6.8 ± 0.03	7.2 ± 0.16	6.8 ± 0.03	7.9 ± 0.07
Orientina	0.5 ± 0.04	0.6 ± 0.08	0.5 ± 0.04	1.4 ± 0.04
vitexina 2"-O- glucósido	22.5 ± 0.04	21.6 ± 0.08	22.5 ± 0.04	20.2 ± 0.14
vitexina 2"-O- xilósido	66.8 ± 0.07	65.8 ± 0.15	66.8 ± 0.07	61.5 ± 0.26
Vitexina	1.5 ± 0.07	1.7 ± 0.06	1.5 ± 0.07	3.4 ± 0.04
Isovitexina	0.0 ± 0.00	1.0 ± 0.16	0.0 ± 0.00	3.7 ± 0.08

De acuerdo con los datos mostrados en la Tabla 6-2 no se encontraron diferencias entre las cantidades relativas de orientina 2"-O- glucósido del día 0 y 180 de muestreo en ninguna de las dos condiciones de almacenamientos controladas evaluadas, mientras que orientina 2"-O- xilósido solo aumentó en el estudio de estabilidad acelerada. No obstante, se presentó un aumento en la cantidad relativa de orientina.

Con respecto a vitexina 2"-O- glucósido y vitexina 2"-O-xilósido se encontró que tanto en la evaluación de estabilidad intermedia y acelerada hubo una disminución en la cantidad de estos compuestos debido a la pérdida de la segunda unidad de azúcar, lo cual a su vez genera un aumento en la cantidad de vitexina. Estos resultados son análogos a los reportados por Medina (2014). No obstante, también se detectó y cuantificó isovitexina durante las evaluaciones de estabilidad bajo condiciones controladas de almacenamiento. Este compuesto fue catalogado como producto de degradación de acuerdo con los resultados de la evaluación de estabilidad bajo condiciones de estrés del extracto optimizado.

Por último, en la Figura 6-22b se observa entre 5.0 y 7.5 min la aparición de nuevas señales cromatográficas las cuales corresponden posiblemente a otros productos de degradación los cuales no pudieron ser identificados.

Figura 6-22. Perfil cromatográfico del extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* en la evaluación de estabilidad intermedia y acelerada (Día 180 de muestreo).



- a) *Estabilidad intermedia:* Muestra almacenada bajo condiciones controladas de 35°C±2 y 75%±5 de HR.
b) *Estabilidad acelerada:* Muestra almacenada bajo condiciones controladas de 40°C±2 y 75%±5 de HR

La cuantificación de FT se realizó bajo las siguientes condiciones cromatográficas: Fase Estacionaria: Columna C18 Phenomenex Luna® (250 mm x 4,6 mm i.d. 5 µm). Fase Móvil: Fase A agua:acetonitrilo:ácido acético (90:10:1); Fase B acetonitrilo:agua:ácido acético (90:10:1), el gradiente inicia en 11% de la fase B de 0 a 5 minutos, 11% a 15% de la fase B de 5 a 20 min en gradiente lineal. Flujo de 1 mL/min. Temperatura del horno: 28 °C. Volumen de inyección: 10 µL. Longitud de onda de detección (λ): 340 nm.

Ortmann (2013) evaluó la estabilidad del extracto y fracción metanólica de hojas *Cecropia glaziovii* a través de condiciones controladas de almacenamiento de $40^{\circ}\text{C} \pm 2$ y $75\% \pm 5$ HR por 6 meses. Los compuestos que utilizaron como marcadores para dicha evaluación fueron ácido clorogénico, isorientina e isovitexina y al finalizar el estudio encontraron en la fracción metanólica un aumento significativo en el contenido de isovitexina e isorientina. Los resultados reportados por Ortmann son coherentes con los encontrados para el extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis*.

Con base a los resultados mostrados anteriormente se determinó que el tiempo de vida útil aparente del extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* es de 2 meses, ya que después de este momento hay una disminución significativa en la concentración del principio activo responsable de la actividad farmacológica (flavonoides totales) en el extracto optimizado y a su vez comienza la aparición de productos de degradación como isovitexina.

7. Conclusiones y Recomendaciones

CONCLUSIONES

Se determinaron las siguientes condiciones óptimas de extracción de flavonoides totales en hojas de *P. quadrangularis*: percolación como método de extracción, relación droga-disolvente 1:15, disolvente de extracción EtOH:H₂O en proporción 1:1 y un tiempo de percolación de 48 h.

La relación droga-disolvente fue el único factor significativo en el proceso de extracción de flavonoides totales. Sin embargo, las interacciones de relación droga-disolvente x tiempo de extracción y la relación droga-disolvente x disolvente de extracción también tienen una influencia sobre el contenido de estos metabolitos durante la extracción.

No se detectó la presencia de la saponina quadrangulósido en ninguno de los extractos obtenidos de hojas de *P. quadrangularis*, independientemente del localidad y época de colecta del material vegetal.

Se validó una metodología analítica por CLAE-DAD para la cuantificación del contenido de la saponina Pq-Sap2 presente en extractos hidroalcohólicos de hojas de *P. quadrangularis*.

Se identificó que existe una correlación estadísticamente significativa entre el contenido de flavonoides totales y el contenido de la saponina Pq-Sap2 en extractos hidroalcohólicos de hojas de *P. quadrangularis*.

La localidad y época de colecta influyen sobre el contenido de flavonoides totales y la saponina Pq-Sap2 obteniendo la mayor concentración de flavonoides totales en la localidad de Neiva durante época seca mientras que el mayor contenido de Pq-Sap2 se encontró en la localidad de Neiva en época de lluvias.

El extracto optimizado de *P. quadrangularis* se clasificó como prácticamente estable para condiciones de estrés bajo hidrolisis y oxidación, lábil bajo condiciones de estrés con hidrolisis ácida y básica y fotoestable.

Se identificaron los flavonoides de isovitexina e isorientina como productos de degradación del extracto optimizado de hojas *P. quadrangularis* en condiciones de hidrólisis ácida.

Se determinó que el tiempo de vida útil del extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* es de 2 meses. Después de este tiempo la concentración de flavonoides totales presenta una disminución superior al 10% y comienzan a aparecer productos de degradación como isovitexina.

RECOMENDACIONES

Evaluar la estabilidad del extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* bajo condiciones de refrigeración a temperatura de $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ como alternativa para aumentar el tiempo de vida útil del mismo.

Profundizar sobre la influencia de factores bióticos y abióticos sobre el contenido de flavonoides totales y saponinas presentes en materia vegetal de hojas de *P. quadrangularis* mediante el estudio bajo condiciones de cultivo controladas, monitoreo frecuente del contenido de los metabolitos y mayor tiempo de seguimiento.

Realizar estudios de toxicidad subcrónica y/o crónica del extracto optimizado de hojas de *P. quadrangularis* empleando modelos de experimentación animal.

8. Bibliografía

- Agencia Nacional de vigilancia sanitaria. (2010). *Farmacopea Brasileira* (5th ed.). Brasilia, Brasil: ANVISA.
- Alabdul Magid, A., Lalun, N., Long, C., Borie, N., Bobichon, H., Moretti, C., & Lavaud, C. (2012). Triterpene saponins from *Antonia ovata* leaves. *Phytochemistry*, *77*, 268–274.
- Álvarez Cruz, N. S., & Bagué Serrano, A. J. (2012). *Tecnología Farmacéutica*. Alicante: Editorial Club Universitario.
- Amendola, D., De Faveri, D. M., & Spigno, G. (2010). Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts. *Journal of Food Engineering*, *97*(3), 384–392.
- Ayet, G., Burbano, C., Cuadrado, C., Pedrosa, M. M., Robredo, L. M., & Muzquiz, M. (1997). Effect of germination, under different environmental conditions, on saponins, phytic acid and tannins in lentils (*Lens culinaris*). *Journal Science Food. Agriculture*, *74*, 273–279.
- Baankova, V., Baoudourova-Krasteva, G., Paopov, S., Sforcin, J. M., & Cunha Fbunar, S. R. (1998). Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidologie*, *29*, 361–367.
- Bimakr, M., Rahman, R. A., Taip, F. S., Ganjloo, A., Salleh, L. M., Selamat, J., ... Zaidul, I. S. M. (2011). Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and Bioproducts Processing*, *89*(1), 67–72.
- Bohm, B. (1998). *Introduction to Flavonoids*. Amsterdam: Overseas Publishers association.
- Bonfigli, M., Godoy, E., Reinheimer, M. A., & Scenna, N. J. (2017). Comparison between conventional and ultrasound-assisted techniques for extraction of anthocyanins from grape pomace. Experimental results and mathematical modeling. *Journal of Food Engineering*. *207*,56-72.
- Cañigueral, S., Dellacassa, E., & Bandoni, A. L. (2003). Plantas medicinales y fitoterapia: ¿Indicadores de dependencia o factores de desarrollo? *Acta Farmaceutica Bonaerense*, *22*(3), 265–277.

- Carvajal, L. M., Turbay, S., Álvarez, L., Rodríguez, A., Alvarez, M., Restrepo, S., ... Parra, M. (2010). *Identificación, valoración y uso potencial de las pasifloras en el Huila con fines de mercados especializados del orden nacional e internacional*.
- Castro, P. C. F., Hoshino, A., da Silva, J. C., & Mendes, F. R. (2007). Possible anxiolytic effect of two extracts of *Passiflora quadrangularis* L. in experimental models. *Phytotherapy Research : PTR*, 21(5), 481–4.
- Chanda, S. V., & Kaneria, M. J. (2012). Optimization of conditions for the extraction of antioxidants from leaves of *Syzygium cumini* L. using different solvents. *Food Analytical Methods*, 5(3), 332–338.
- Chen, F., Zhang, Q., Liu, J., Gu, H., & Yang, L. (2017). An efficient approach for the extraction of orientin and vitexin from *Trollius chinensis* flowers using ultrasonic circulating technique. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 267–278.
- Cheok, C. Y., Salman, H. A. K., & Sulaiman, R. (2014). Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*, 59, 16-40.
- Costa, G. M. (2013). *Estudio químico de espécies brasileiras e colombianas do gênero Passiflora*. Universidade Federal de Santa Catarina.
- Costa, G. M., Gazola, A. C., Madóglío, F. A., Zucolotto, S. M., Reginatto, F. H., Castellanos, L., ... Schenkel, E. P. (2013). Vitexin derivatives as chemical marker in the differentiation of the closely related species *Passiflora alata* Curtis and *Passiflora quadrangularis* Linn. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 36(August 2016), 1697–1707.
- Costa, G. M., Gazola, A. C., Zucolotto, S. M., Castellanos, L., Ramos, F. A., Reginatto, F. H., & Schenkel, E. P. (2016). Chemical profiles of traditional preparations of four South American *Passiflora* species by chromatographic and capillary electrophoretic techniques. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 26(4), 451–458.
- Costa, G. M., Ortmann, C. F., Schenkel, E. P., & Reginatto, F. H. (2014). Seasonal variations in the amount of isoorientin and isovitexin in *Cecropia glaziovii* Sneth. leaves over a two-year period. *Rev Colomb Cienc Quím Farm*, 43(1), 162–172.
- Day, P. M., & Harborne, J. (1989). *Methods in Plant Biochemistry*. London: Academic Press.
- Degani, L., Gulmini, M., Piccablotto, G., Iacomussi, P., Gastaldi, D., Dal Bello, F., & Chiantore, O. (2017). Stability of natural dyes under light emitting diode lamps. *Journal of Cultural Heritage*. In press
- Dhawan, K., Dhawan, S., & Sharma, A. (2004). *Passiflora*: A review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 1–23.
- Duque, C., & Pérez, A. M. (2005). El aroma de la Badea (*Passiflora quadrangularis*): Composición y generación de compuestos volátiles a partir de glicósidos, fosfatos y monoterpenos oxigenados. In *El aroma frutal de Colombia*. Bogotá, Colombia: Nacional de Colombia.

- Espada-Bellido, E., Ferreiro-González, M., Carrera, C., Palma, M., Barroso, C. G., & Barbero, G. F. (2017). Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp. *Food Chemistry*, 219, 23–32.
- European Medicines Agency. (2009). *Guideline on declaration of herbal substances and herbal preparations in herbal medicinal products traditional herbal medicinal products*. London.
- Folashade, O., Omoregie, H., & Ochogu, P. (2012). Standardization of herbal medicines - A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 4(3), 101–112.
- Galvan D'Alessandro, L., Kriaa, K., Nikov, I., & Dimitrov, K. (2012). Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification Technology*, 93,42-47.
- Gazola, A. C. (2014). *Avaliação química e neurofarmacológica de espécies de passiflora da américa do sul*. Universidade Federal de Santa Catarina.
- Gazola, A. C., Costa, G. M., Castellanos, L., Ramos, F. a., Reginatto, F. H., Lima, T. C. M. De, & Schenkel, E. P. (2015). Involvement of GABAergic pathway in the sedative activity of apigenin, the main flavonoid from *Passiflora quadrangularis* pericarp. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(2), 158–163.
- Gomes, S. V. F., Portugal, L. A., dos Anjos, J. P., de Jesus, O. N., de Oliveira, E. J., David, J. P., & David, J. M. (2017). Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species. *Microchemical Journal*, 132, 28–35.
- Grosso, C., Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A., Valentao, P., Sampaio, M., Lima, J., & Andrade, P. B. (2014). Box-Behnken factorial design to obtain a phenolic-rich extract from the aerial parts of *Chelidonium majus* L. *Talanta*, 130, 128–136.
- Hailan, F., Wei, H., Chengzhen, W., Jian, L., Can, C., Jinhu, H., & Hai, R. (2011). Effects of Water Stress on Growth and Total Saponin Content of *Liriope muscari* (Decne.) Bailey. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 17(3), 345–349.
- Hernández, A., & Bernal, R. (2000). Lista de Especies de Passifloraceae de Colombia. *Biota Colombiana*, 1(3), 320–335.
- Hong, Z., Xiuling, L., & Wei, W. (2005). Optimizing extracting process of Semen hoveniae. *West China Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(2), 121–122.
- Huang, P., Zhang, Q., Pan, H., Luan, L., Liu, X., & Wu, Y. (2017). Optimization of integrated extraction-adsorption process for the extraction and purification of total flavonoids from *Scutellariae barbatae* herba. *Separation and Purification Technology*, 175, 203–212.
- Huang, W., Xue, A., Niu, H., Jia, Z., & Wang, J. (2009). Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems *in vitro*. *Food Chemistry*, 114(3), 1147–1154.

- Ingale, A. G., & Hivrale, A. U. (2010). Pharmacological studies of *Passiflora sp.* and their bioactive compounds. *African Journal of Plant Science*, 4(10), 417–426.
- Isla, M. I., Dantur, Y., Salas, A., Danert, C., Zampini, C., Arias, M., ... Moreno, M. I. N. (2012). Effect of seasonality on chemical composition and antibacterial and anticandida activities of Argentine propolis. Design of a topical formulation. *Natural Product Communications*, 7(10), 1315–1318.
- Jeffrey B., H., Marby, H., & Marby, T. J. (1975). *The flavonoids*. Springer US.
- Krishnaswamy, N. R. (1999). *Chemistry of Natural Products: A Unified Approach*. India: Universities Press.
- Lewis, G., Mathieu, D., & Phan-Tan-Luu. (1999). *Pharmaceutical experimental design*. New York: Marcel Dekker.
- Lino von Poser, G. (2017). A quimiotaxonomía na sistemática dos seres vivos. en *Farmacognosia. do producto natural ao medicamento* (pp. 23–28).
- Luceño, A. & González, F. (2004). Métodos estadísticos para medir, describir y controlar la variabilidad. Santander, España: Servicio de publicaciones de la universidad de Cantabria
- MADR. (2005). *La cadena de los frutales de exportación en Colombia: Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005*. Min. Agricultura y Desarrollo Rural, Obs. Agrocadenas Colombia. Bogotá.
- Markham, K. R. (1982). *Techniques of Flavonoids Identification*. Londres: Academic Press.
- Medina, H. I. (2014). *Aporte al diseño de un sistema microparticulado cargado con un extracto de Passiflora quadrangularis Linn*. Universidad Nacional de Colombia.
- Noriega, P., Mafud, D. de F., de Souza, B., Soares-Scott, M., Rivelli, D. P., Barros, S. B. de M., & Bacchi, E. M. (2012). Applying design of experiments (DOE) to flavonoid extraction from *Passiflora alata* and *P. edulis*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22(5), 1119–1129.
- Ocampo, J., Jarvis, A., D'Eeckenbrugge, G. C., Restrepo, M., Mike, S., & Creuci, C. (2007). Diversity of Colombian Passifloraceae: biogeography and an updated list for conservation. *Biota Colombiana*, 8(1), 1–45.
- Ocampo, J., & Merlín, Y. (2014). Passiflora de Colombia. *Journal of Chemical Information and Modeling*.
- Orsini, F., Pellizzoni, F., Ricca, G., & Verotta, L. (1987). Triterpene glycosides related to quadranguloside from *Passiflora quadrangularis*. *Phytochemistry*, 26(4), 1101–1105.
- Orsini, F., & Verotta, L. (1985). Separation of natural polar substances by reversed-phase high-performance liquid chromatography, centrifugal thin-layer chromatography and droplet counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 349(1), 69–75.

- Ortmann, C. F. (2013). *Avaliação da estabilidade de extratos, frações e flavonoides C-glicosídeos presentes em Cecropia glaziovii*. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Osorio, C., Duque, C., & Fujimoto, Y. (2000). Oxygenated monoterpenoids from badea (*Passiflora quadrangularis*) fruit pulp. *Phytochemistry*, 53(1), 97–101.
- Osorio, C., Duque, C., Koami, T., & Fujimoto, Y. (1999). Stereochemistry of (3E)-3,7-dimethyl-3-octene-1,2,6,7-tetraol isolated from *Passiflora quadrangularis*. *Tetrahedron Asymmetry*, 10(22), 4313–4319.
- Otero, R., Núñez, V., Jiménez, S. L., Fonnegra, R., Osorio, R. G., García, M. E., & Díaz, A. (2000). Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part II: Neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(3), 505–511.
- Pan, G., Yu, G., Zhu, C., & Qiao, J. (2012). Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of flavonoids compounds (FC) from hawthorn seed (HS). *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(3), 486–490.
- Ponz, E. (2005). *La medicina tradicional de los tacana y machineri: Conocimientos prácticos de las plantas medicinales*. La Paz, Bolivia: Investigaciones Regionales Pando.
- Regueira, M. S., Tintino, S. R., da Silva, A. R. P., Costa, M. do S., Boligon, A. A., Matias, E. F. F., ... Melo Coutinho, H. D. (2017). Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. *Food and Chemical Toxicology*. In press.
- Remorini, D., Melgar, J. C., Guidi, L., Degl'Innocenti, E., Castelli, S., Traversi, M. L., ... Tattini, M. (2009). Interaction effects of root-zone salinity and solar irradiance on the physiology and biochemistry of *Olea europaea*. *Environmental and Experimental Botany*, 65(2–3), 210–219.
- Ren, Y., Chen, Y., Hu, B., Wu, H., Lai, F., & Li, X. (2015). Microwave-assisted extraction and a new determination method for total steroid saponins from C.H. Wright. *Steroids*, 104, 145–152.
- Robledo, J. (2004). *Descubre los frutos exóticos*. Madrid, España: Norma.
- Ryu, C. S., Kim, C. H., Lee, S. Y., Lee, K. S., Choung, K. J., Song, G. Y., ... Kim, S. K. (2012). Evaluation of the total oxidant scavenging capacity of saponins isolated from *Platycodon grandiflorum*. *Food Chemistry*, 132(1), 333–337.
- Sakalem, M. E., Negri, G., & Tabach, R. (2011). Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus, 1219–1232.
- Santana, R. M., Rodríguez, D. A., & Aguilar, G. G. (1999). Farmacognosia de la droga “flores de majagua” (*Hibiscus elatus* Sw., familia Malvaceae). IV. Estandarización del extracto fluido. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 4(2).
- Sarmiento, E. (1986). *Frutas en Colombia*. Bogotá, Colombia: Ediciones Cultural Colombiana Ltda.

- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos* (Primera Ed). Santa fe de Bogotá: Roberto Pinzón.
- Singh, S., & Bakshi, M. (2000). Guidance on Conduct of Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs. *Pharmaceutical Technology*, 4, 1–14.
- Soares, L., & Farias, M. (2017). Qualidade de insumos farmacêuticos ativos de origem natural. In *Farmacognosia. do producto natural ao medicamento* (pp. 83–128). Porto Alegre: ARTMED EDITORA LTDA.
- Tarley, C. R. T., Silveira, G., dos Santos, W. N. L., Matos, G. D., da Silva, E. G. P., Bezerra, M. A., ... Ferreira, S. L. C. (2009). Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. *Microchemical Journal*, 92(1), 58–67.
- Umeo, T. (1988). Hydrogen Peroxide-Dependent Oxidation of Flavonoids and Hydroxycinnamic Acid Derivatives in Epidermal and Guard Cells of *Tradescantia virginiana* L. *Plant Cell Physiol*, 29(3), 475–481.
- Urrego, N. (2017). *Contribución al estudio fitoquímico y a la evaluación de la actividad antiinflamatoria de las hojas de badea (Passiflora quadrangularis) y gulupa (Passiflora edulis var edulis)*. Universidad Nacional de Colombia.
- World Health Organization. (1996a). *Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines*. Geneva, Switzerland.
- World Health Organization. (1996b). *Quality Assurance of Pharmaceuticals: A Compendium of Guidelines and Related Materials, Good Manufacturing Practices and Inspection*. Geneva, Switzerland.
- World Health Organization. (2000). *Quality control methods for herbal materials*. World Health Organization,. Geneva, Switzerland. <https://doi.org/ISBN 978 92 4 150073 9>
- World Health Organization. (2003). WHO guidelines on good manufacturing practices (GMP) for herbal medicines. *World Health Organization*, 92.
- World Health Organization. (2011). *Quality control methods for herbal materials*. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- World Health Organization. (2017). *Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products*.
- Zou, Z.-M., Yu, D.-Q., & Cong, P.-Z. (2001). A steroidal saponin from the seeds of *Allium tuberosum*. *Phytochemistry*, 57(8), 1219–1222.
- Zuanazzi, J. A., Montanha, J., & Zucolotto, S. M. (2017). Flavonoides. In *Farmacognosia. do producto natural ao medicamento* (pp. 209–233).
- Zucolotto, S. M., Fagundes, C., Reginatto, F. H., Ramos, F. A., Castellanos, L., Duque, C., & Schenkel, E. P. (2012). Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochemical Analysis*, 23(3), 232–239.

Anexo A: Identificación taxonómica del material vegetal



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE CIENCIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES
HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)

COL - 212
Bogotá D.C., 05 de mayo de 2016

Señores
Sandra Milena Echeverry González
Ciudad

Asunto: Identificación Taxonómica muestras

Cordial Saludo,

Me permito dar respuesta a su solicitud referente a la identificación taxonómica de la(s) muestra(s) botánica(s):

Nombre	FAMILIA	No. COL	Colector	No de Colecta	Determinó
<i>Passiflora quadrangularis</i> L.	PASSIFLORACEAE	589241	José Andrés Puentes Capera	2	C. Parra-O./2016
<i>Passiflora quadrangularis</i> L.	PASSIFLORACEAE	589240	José Andrés Puentes Capera	1	C. Parra-O./2016

Esta certificación no es válida para trámites ante el INVIMA o el ICA. El (Los) pliego(s) testigo(s) quedará(n) como muestra permanente en nuestro herbario.

Cordialmente,

Prof. CARLOS ALBERTO PARRA
Administrador General
Herbario Nacional Colombiano -COL
E-mail: herbacol_fcbog@unal.edu.co

Copia Archivo COL
Héctor Tobías

Anexo B: Aval del comité de ética



COMITÉ DE ÉTICA FACULTAD DE
CIENCIAS

Bogotá, marzo 07 de 2016

Profesora
Diana Marcela Aragón Novoa
Departamento de Farmacia

Respetada Profesora:

Atentamente le comunico que el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias, en reunión realizada el día 07 de marzo de 2016 (Acta 02), evaluó aspectos éticos del proyecto presentado por usted. Como resultado de esta revisión, el Comité considera que el proyecto **cumple** con los aspectos éticos básicos. Para los fines pertinentes, se transcriben las observaciones y el concepto final.

Proyecto: Contribución a la estandarización de un extracto de hojas de *Passiflora quadrangularis* con actividad sedante.

Responsables: **Diana Marcela Aragón Novoa** (Tutora de la actividad. Grupo: Principios Bioactivos en Plantas Medicinales, COL0014832) y **Sandra Milena Echeverry González** (Joven Investigadora – Colciencias).

Observaciones:

En esta investigación se utilizarán pequeños animales de laboratorio, empleando el menor número de sujetos sin afectar la validez de los resultados. El personal participante está debidamente entrenado y tiene experiencia en el cuidado y uso de animales de experimentación, así como en el reconocimiento y manejo del riesgo biológico. Se acatarán directrices contenidas en la Resolución 008430 de 1993 – MSP. La disposición de residuos biológicos se hará acorde con protocolos institucionales de gestión ambiental implementados en la Universidad Nacional de Colombia.

Para evaluar la actividad sedante se empleará el modelo de "potenciación del sueño inducido por éter etílico", técnica ampliamente usada y descrita en la literatura científica.

Los extractos en estudio se elaboran a partir de la planta *Passiflora quadrangularis* (n.v.: badea) proveniente de cultivos comerciales (Departamento del Huila), con lo cual no se afecta en forma negativa la biodiversidad de plantas silvestres por aspectos de colecta.

Concepto: Aprobado.

LUIS FERNANDO OSPINA G.
Coordinador Comité de Ética

