

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**POTENCIAL ANTIHIPERTENSIVO Y
ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS
ETANÓLICOS OBTENIDOS DE
SEMILLAS DE *Passiflora vitifolia* Kunth
y *Passiflora edulis* Sims var. *edulis*.**

Angel Arturo Jimenez Rodriguez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2017

**POTENCIAL ANTIHIPERTENSIVO Y
ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ETANÓLICOS
OBTENIDOS DE SEMILLAS DE *Passiflora
vitifolia* Kunth y *Passiflora edulis* Sims var. *edulis*.**

Angel Arturo Jimenez Rodriguez

Biólogo

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

Director:

MD. Doctor en Farmacia Mario Francisco Guerrero Pabón

Codirector (a):

Lic. en Biología y Química, Ph.D en Ciencias Químicas, Jonh Jairo Méndez
Arteaga

Línea de Investigación:

Farmacología experimental cardiovascular de productos naturales

Grupo de Investigación:

Farmacología Molecular Universidad Nacional (FARMOL)

Grupo de investigación en Productos Naturales de la Universidad del Tolima
(GIPRONUT)

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Departamento de Farmacia
Bogotá D.C., Colombia
2017

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi madre Alcira Rodríguez Ñustes, que se ha convertido en el apoyo de todas mis decisiones buenas o malas, que me crio, conoce y confía en mis capacidades, y que a pesar de todas las adversidades, siempre ha estado ahí en todo momento y lugar cuando más he necesitado el apoyo de un pilar en mi vida tal y como ella lo es; por esto y todas las páginas que me faltan por escribir de tus virtudes y bondades.

GRACIAS MADRE

Agradecimientos

Quisiera poder plasmar en esta página todos los nombres de las personas que de una u otra forma colocaron un granito de arena para que yo pudiera llevar a cabo este trabajo, pero al no tener más que palabras de agradecimiento a todos ellos solo debo decirles gracias.

Sin embargo debo dar un agradecimiento de forma especial a:

Mi director Mario Francisco Guerrero Pabón y mi codirector Jonh Jairo Méndez Arteaga quienes desinteresadamente me apoyaron, ayudaron y formaron desde el principio de esta gran travesía, a ellos debo agradecer todas las sugerencias y correcciones realizadas; pero sobretodo debo agradecerles por depositar su confianza y compromiso para el desarrollo de este trabajo.

Al grupo de investigación en farmacología molecular (FARMOL), en especial a Lesly Lizeth Bareño quien fue la persona encargada de brindarme las herramientas suficientes para empezar a conocer este gran mundo de la experimentación animal.

A todos los integrantes del Grupo de Investigación en Productos Naturales de la Universidad del Tolima (GIPRONUT), en especial a Carlos Martín Guerra, Wilmer Fernando Sánchez, Elizabeth Murillo, Walter Murillo, Edgar Villanueva, Gianni Carlos Peñaloza y Diego Montoya por su constante apoyo y ayuda desinteresada en pro de la realización de este trabajo.

A mi gran familia Rodríguez Ñustes todos sus integrantes desde el más viejo hasta el más chico, hacen parte importante de un gran pilar en mi vida; pero debo dar un agradecimiento especial a mis tíos: Luz Argenis (Lupe), Juan de Dios (Juancho), Nidia y mi primo Albeiro Rodríguez, ya que ellos especialmente me apoyaron, guiaron, acogieron y aconsejaron de la mejor manera.

Compañeros muchos, amigos pocos, Nelson Iván Cupitra V. gracias por todo el apoyo brindado y por esta gran amistad, con migo puedes contar para lo que sea.

A la Universidad Nacional de Colombia, un sueño cumplido y una nueva experiencia en mi formación tanto educativa como profesional, en ella dejo grandes compañeros pero aún más dejo grandes amigos que me acompañaron, escucharon, aconsejaron y me apoyaron en todo momento; Carlos Vásquez, Ivonne H. Valderrama, Jorge E. Hernández, Paola Rivera y Sandra Echeverry, siempre los recordaré y apoyaré en lo que sea necesario.

A Bibiana González, quien siempre estuvo pendiente y se convirtió en un gran apoyo para la realización de este proyecto.

A la Universidad del Tolima, el Proyecto de Formación en Talento Humano, la Gobernación del Tolima y todas las demás entidades que hicieron parte de la gestión y generación de esta oportunidad de formación para los jóvenes Tolimenses.

Hubo una persona que se unió a mi vida cuando ya ésta travesía había comenzado pero a pesar de eso se convirtió en una gran compañía, un gran apoyo, una gran consejera y una gran pareja; Luisa Fernanda Velásquez H. te convertiste en la musa e inspiración de mi vida.

A mi hermano Roque F. Jimenez, su esposa Milena Valderrama por su apoyo en todo momento y a la próxima generación Juan Manuel y Anna María los cuales me llenaron de alegría y sonrisas, en momentos de aburrimiento, desesperación y frustración.

Por último debo agradecer a mis padres Roque Jimenez y Alcira Rodriguez, a quienes con su sacrificio y esfuerzo me brindaron la oportunidad de formarme como profesional y persona, a ellos les debo mi vida y todo lo que soy.

A todos ellos y a todas las personas que me faltaron por nombrar.

MUCHAS GRACIAS.

Resumen

En el presente estudio se evaluó la capacidad antihipertensiva y antioxidante de extractos etanólicos obtenidos de semillas de *P. vitifolia* Kunth y *P. edulis* Sims var. *edulis*; se evidenció la presencia de metabolitos secundarios mediante pruebas cualitativas y cromatografía de capa delgada (CCD), La capacidad antioxidante de los extractos se midió mediante la estabilización de los radicales ABTS y DPPH; el potencial antihipertensivo se determinó mediante el modelo de presión indirecta *in vivo* (Tail cuff) utilizando ratas Wistar e induciendo la hipertensión mediante la administración de L-NAME (inhibidor de la enzima óxido nítrico sintasa; para establecer el efecto vasodilatador y posible mecanismo de acción, se empleó el modelo de vasodilatación en anillos aislados de aorta. Se encontró alta presencia de terpenos, antraquinonas, flavonoides, taninos, fenoles y antocianinas. La evaluación antirradicalaria evidenció que los extractos estabilizaron los dos radicales a bajas concentraciones; en cuanto al potencial antihipertensivo *in vivo*, los extractos presentaron un efecto preventivo de la hipertensión durante las seis semanas de tratamiento ($p < 0.05$) con un comportamiento similar al patrón (enalapril) y al control (rata normotensa). La evaluación de los posibles mecanismos de acción mediante órgano aislado en anillos de aorta *ex vivo* (ratas tratadas con los extractos), pre-contraídos con fenilefrina y relajados con acetilcolina y nitroprusiato de sodio, no evidenció un efecto relajante mayor al de anillos sin tratamiento; por otra parte, en anillos aislados de aorta de ratas no tratadas y precontraídos con fenilefrina, KCl y fenilefrina, se observó que los extractos presentaron un efecto relajante, tales efectos no se revierten en presencia de, propanolol, atropina, azul de metileno e indometacina pero son parcialmente revertidos en presencia de L-

NAME e inhiben la contracción inducida por angiotensina II. Los resultados obtenidos sugieren que los extractos de semilla de *P. vitifolia* y *P. edulis* var. *edulis*, contienen metabolitos secundarios con potencial antihipertensivo y antioxidante que podrían llegar a ser utilizados como una alternativa en la industria fitofarmacéutica para la elaboración de posibles tratamientos antihipertensivos.

Palabras clave: *Passiflora vitifolia*, *Passiflora edulis* var. *edulis*, antioxidante, antihipertensivo, L-NAME, angiotensina-II.

Abstract

The present study evaluated the antihypertensive and antioxidant capacity of the ethanolic extracts obtained from the seeds of *P. vitifolia* Kunth and *P. edulis* Sims var. *edulis*. The presence of secondary metabolites was evidenced by using qualitative tests and thin layer chromatography (CCD). The antioxidant capacity of the extracts was measured by the stabilization of the ABTS and DPPH radicals. The antihypertensive potential was determined by using Wistar rats that were induced to hypertension through the administration of a L-NAME inhibitor (nitric oxide synthase inhibitor). In order to establish the vasodilator effect and its possible mechanism of action, a vasodilation model based on aortic rings was used. High presence of terpenes, anthraquinones, flavonoids, tannins, phenols and anthocyanins was found. The antiradical evaluation showed that the radicals were stabilized by the extracts at low concentrations. In terms of the *in vivo* antihypertensive potential, the extracts exhibited a preventive effect on hypertension during the six weeks of treatment ($p \leq 0.05$); similar to that of the standard (enalapril) and control (normotensive rat). The evaluation of the possible mechanisms of action through an isolated organ in *ex vivo* (treated rats), pre-contracted (with phenylephrine) and relaxed (with acetylcholine and sodium nitroprusside) aortic rings did not show a relaxing effect greater than the one from the untreated rings. Otherwise, those isolated aortic rings from untreated rats that were precontracted with phenylephrine, KCl and phenylephrine, showed a relaxing effect when in contact with the extracts. Such effects are not reversed in the presence of propranolol, atropine, methylene blue and indomethacin, but are partially reversed in the presence of L-NAME, besides, they inhibit the angiotensin II-induced contraction. The results suggest that the extracts from the seeds of *P. vitifolia* and *P. edulis*

var. *edulis*, contain secondary metabolites with antihypertensive and antioxidant potential that could be used as an alternative in the phytopharmaceutical industry for the production of possible antihypertensive treatments.

Keywords: *Passiflora vitifolia*, *Passiflora edulis* var. *edulis*, antioxidant, antihypertensive, L-NAME, angiotensin-II.

Contenido

INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	4
2. JUSTIFICACIÓN	5
3. PLANTEAMIENTO Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA.....	7
4. OBJETIVOS.....	8
4.1. Objetivo general	8
4.2. Objetivos específicos	8
5. MARCO TEÓRICO	9
5.1. Familia Passifloraceae	9
5.2. Género <i>Passiflora</i>	9
5.3. <i>Gulupa (Passiflora edulis Sims var. edulis)</i>	11
5.4. <i>Granadilla silvestre (Passiflora vitifolia Kunth)</i>	12
5.5. Hipertensión arterial	13
5.5.1. Definición y relevancia clínica	13
5.5.2. Estrategias de tratamiento	13
5.5.3. Mecanismos de control de la presión arterial (PA).....	16
5.5.4. Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA).....	16
5.5.5. Sistema óxido nítrico (NO).....	17
5.6. Modelos animales para el estudio de la hipertensión.....	18
5.6.1 Modelos <i>in vivo</i> para el estudio de la hipertensión	19
5.6.1.1. Hipertensión inducida quirúrgicamente	19
5.6.1.2. Hipertensión endocrina	20
5.6.1.3. Hipertensión por dieta	20
5.6.1.4. Hipertensión genética	21
5.6.1.5. Hipertensión inducida químicamente	21
5.6.2. Modelos de baño de órganos	22
6. METODOLOGÍA.....	23
6.1. Recolección y preparación del extracto	23
6.1.1. Obtención de extractos	24
6.1.2. Caracterización fitoquímica de los extractos.....	24
6.2. Actividad citotóxica de los extractos <i>in vitro</i>	27
6.2.1. Ensayo de MTT	27
6.3. Actividad Antioxidante.....	29
6.3.1. Actividad estabilizante del catión radical ABTS (catión del ácido 2,2', azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).....	29
6.3.2. Actividad estabilizante del radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)	29
6.4. Evaluación de la actividad antihipertensiva	30
6.4.1. Actividad antihipertensiva <i>in vivo</i>	30
6.4.2. Modelo de inducción de hipertensión arterial con L-NAME	31
6.4.3. Medición de la presión arterial.....	31
6.5. Modelo de vasodilatación en anillos aislados de aorta.....	32

6.5.1. Evaluación de la relajación inducida por el extracto etanólico de <i>P. vitifolia</i> y <i>P. edulis</i> var. <i>edulis</i>	33
6.5.2. Determinación de la relajación de acetilcolina y nitroprusiato en aorta de rata tratada pre-contráida con Fenilefrina	33
6.5.3. Evaluación de los mecanismos de acción del extracto etanólico de <i>P. vitifolia</i> y <i>P. edulis</i> var. <i>edulis</i>	34
6.5.4. Inhibición de la angiotensina II (AT-II) por el extracto etanólico de <i>P. vitifolia</i> y <i>P. edulis</i> var. <i>edulis</i>	34
6.6. Análisis de los datos	35
7. CONSIDERACIONES ÉTICAS	36
8. RESULTADOS	37
8.1. Caracterización fitoquímica preliminar.....	37
8.1.1. Determinación del material biológico	37
8.1.2. Identificación de los principales núcleos secundarios	37
8.2. Actividad citotóxica de los extractos <i>in vitro</i>	38
8.2.1. Ensayo de MTT.....	38
8.2.2. Actividad estabilizante del radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)	39
8.2.3. Actividad estabilizante del radical ABTS (catión del ácido 2,2', azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).	40
8.3. Evaluación de la actividad Antihipertensiva <i>in vivo</i>	41
8.4. Evaluación de la actividad vasodilatadora <i>In vitro</i>	43
8.4.1. Efecto relajante de los extractos etanólicos de semillas de <i>P. edulis</i> var. <i>edulis</i> y <i>P. vitifolia</i> sobre la contracción ejercida por fenilefrina (FE 10 ⁻⁶ M) y KCl (80mM).	43
8.4.2. Efecto relajante de acetilcolina (ACh) sobre anillos de aorta de ratas hipertensas tratadas con los extractos.	44
8.4.3. Efecto relajante de nitroprusiato (NP) sobre anillos de aorta de ratas hipertensas tratadas con los extractos.	45
8.5. Mecanismo de acción de los extractos etanólicos.....	46
8.5.1. Relajación en presencia de L-NAME.....	46
8.5.2. Relajación de anillos de aorta en presencia de Atropina, Indometacina, Propanolol y Azul de metileno.....	47
8.5.3. Efecto inhibitorio de los extractos etanólicos de <i>P. edulis</i> y <i>P. vitifolia</i> sobre la contracción ejercida por angiotensina-II (AT-II) en anillos íntegros precontráidos con KCl 80mM.	48
9. DISCUSIÓN.....	50
9.1. Identificación de los principales núcleos secundarios	50
9.2. Actividad citotóxica de los extractos <i>in vitro</i>	51
9.2.1. Ensayo de MTT.....	51
9.3. Actividad Antioxidante.....	51
9.3.1. Actividad estabilizante del catión radical ABTS (catión del ácido 2,2', azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).....	51
9.3.2. Actividad estabilizante del radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)	52
9.4. Evaluación de la actividad Antihipertensiva <i>in vivo</i>	52
9.5. Evaluación de la actividad vasodilatadora <i>In vitro</i>	53

9.5.1. Efecto relajante de los extractos etanólicos de semillas de <i>P. edulis</i> var. <i>edulis</i> y <i>P. vitifolia</i> sobre la contracción ejercida por FE (10^{-6} M) y KCl (80 mM).....	53
9.5.2. Efecto relajante de acetilcolina (ACh) sobre anillos de aorta de ratas hipertensas tratadas con los extractos.	54
9.5.3. Efecto relajante de nitroprusiato (NP) sobre anillos de aorta de ratas hipertensas tratadas con los extractos.	55
9.6. Mecanismo de acción de los extractos etanólicos.....	55
9.6.1. Relajación en presencia de L-NAME y azul de metileno.	55
9.6.2. Relajación en presencia de atropina, indometacina, propanolol.	56
9.6.3. Efecto inhibitorio de los extractos etanólicos de <i>P. edulis</i> y <i>P. vitifolia</i> sobre la contracción ejercida por angiotensina-II (Ang-II) en anillos íntegros precontractados con KCl 80mM.	56
10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	58
11. BIBLIOGRAFÍA	59
12. ANEXOS	69

Listado de imágenes

Imagen 1: Distribución de las pasifloras en el mundo.	9
Imagen 2: Distribución de las passifloras en Colombia.	10
Imagen 3: <i>Passiflora edulis</i> variedad <i>edulis</i> determinada por Sims en 1818.	11
Imagen 4: <i>Passiflora vitifolia</i> determinada por Kunth en 1818.	12

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1: Sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA).....	17
Figura 2: Sistema óxido nítrico (NO).	18
Figura 3: Diagrama de la metodología	23
Figura 4: Efecto citotóxico de los extractos frente a PMNs.	39
Figura 5: Capacidad antioxidante de los extractos frente al radical DPPH.	40
Figura 6: Capacidad antioxidante de los extractos frente al radical ABTS.....	41
Figura 7: Potencial antihipertensivo de los extractos sobre la PAS de ratas hipertensas inducidas por L-NAME.....	42
Figura 8: Relajación ejercida por los extractos en anillos de aorta contraídos con FE (10^{-6} M) y KC1 (80 mM).....	43
Figura 9: Comparación del efecto relajante de acetilcolina (ACh) en anillos de aorta de ratas hipertensas tratadas con los extractos.....	44
Figura 10: Comparación de la relajación por Nitroprusiato (NP) en anillos de aorta aislados de ratas hipertensas tratadas con los extractos.....	46
Figura 11: Relajación de los extractos en anillos de aorta contraídos con FE (10^{-6} M) en presencia y ausencia de L-NAME (100 μ M).	47
Figura 12: Comparación entre la contracción ejercida por AT-II sobre anillos de aorta en presencia y ausencia de los extractos, losartan y vehículo.	48
Figura 13: Comparación del efecto máximo (E_{max}) de contracción por AT-II, en presencia y ausencia de los extractos, losartan y vehículo.	49

Lista de tablas

Tabla 1: Tamizaje fitoquímico preliminar extractos crudos de semillas <i>P. edulis</i> var. <i>edulis</i> y <i>P. vitifolia</i>	37
Tabla 2: viabilidad de las PMNs en presencia de los extractos por el método de MTT.	39
Tabla 3: Concentración efectiva media del extracto, frente al radical DPPH.	40
Tabla 4: Concentración efectiva media del extracto, frente al radical ABTS.	41
Tabla 5 Comparación de la PAS entre los diferentes tratamientos por día	42
Tabla 6: Concentración efectiva media (CE ₅₀) y efecto máximo de relajación (E _{max}) de los extractos precontraídos con KCl y FE.	43
Tabla 7 Comparación de la relajación por ACh en anillos de ratas hipertensas tratadas con los extractos.	45
Tabla 8: Concentración efectiva media (CE ₅₀) y efecto máximo de relajación (E _{max}) por NP en anillos de aorta aislados de ratas hipertensas tratadas con los extractos.	46
Tabla 9: Concentración efectiva media (CE ₅₀) y efecto máximo de relajación (E _{max}) de los extractos en anillos de aorta precontraídos con FE (10 ⁻⁶ M) en presencia y ausencia de L-NAME (100μM).	47
Tabla 10: Concentración efectiva media (CE ₅₀) y efecto máximo de relajación (E _{max}) de los extractos, en anillos de aorta precontraídos con FE (10 ⁻⁶ M) en presencia y ausencia de atropina (30μM), indometacina (1μM), propanolol (1μM) y azul de metileno (1μM).	¡Error! Marcador no definido.

Lista de anexos

Anexo 1: Consentimiento informado para la toma de muestras sanguíneas.....	69
Anexo 2: Aval comité de bioética Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia.....	70
Anexo 3: Determinación taxonómica de las plantas utilizadas en este estudio.	70
Anexo 4: Anexo 4: Relajación de los extractos en anillos de aorta contraídos con FE (10^{-6} M) en presencia y ausencia de atropina ($30\mu\text{M}$), indometacina ($1\mu\text{M}$), propanolol ($1\mu\text{M}$) y azul de metileno ($1\mu\text{M}$).	70

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son a nivel mundial la principal causa de morbimortalidad, no solo en países en vía al desarrollo sino también en países desarrollados. Según la Organización Mundial de la salud (OMS, 2015), se calcula que en el 2012 murieron por esta causa 17,5 millones de personas, lo cual representa el 31% de todas las muertes registradas en el mundo; de estas muertes, 7,4 millones se debieron a la cardiopatía coronaria, y 6,7 millones a los accidentes cardiovasculares (ACV).

Diversos factores se asocian a la ECV tales como edad, sexo, tabaquismo, obesidad, sedentarismo, estrés, herencia, raza, dislipidemia y enfermedades como diabetes e hipertensión arterial (Carrero et al., 2005 y Segura, Agusti y Parody, 2006).

La hipertensión arterial (HTA) se describe según la OMS (2013) como una elevación crónica de la presión arterial (PA) tanto sistólica como diastólica y se considera que un paciente padece de hipertensión cuando la presión arterial sistólica (PAS) es igual o superior a 140mmHg y/o la presión arterial diastólica (PAD) es igual o superior a 90mmHg.

La HTA es considerada como un trastorno que incide directamente en la salud y se considera como la principal señal de alerta en el padecimiento de enfermedades cardiovasculares; su prevalencia gira en torno a un 30-45% de la población adulta con un marcado aumento en edades avanzadas (Mancia et al., 2013) y es la responsable de aproximadamente el 45% de las muertes relacionadas con enfermedades del corazón y el 51% de las muertes causadas por accidente cerebrovascular (OMS, 2013). La HTA puede clasificarse como primaria o secundaria según su causa, la primaria representa el 95% de HTA y corresponde a

PA elevada con evaluaciones diagnosticas que no logran identificar su causa y la secundaria tiene un diagnostico conocido y se relaciona generalmente con enfermedades que afectan las funciones renales y neurohormonales (Brown, 2006 citado en Ettinger y Feldman, 2007).

La HTA es considerada como una enfermedad crónica, por ende su control se realiza mediante el uso prolongado de fármacos con diversos blancos farmacológicos tales como: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), β -bloqueadores, diuréticos y bloqueadores de los receptores de angiotensina-II, los cuales han sido eficaces en el tratamiento de la hipertensión; sin embargo, estos medicamentos de origen sintético pueden presentar ciertas alteraciones secundarias a corto y largo plazo en su uso como: tos seca, sedación, trastornos de la concentración mental, hipotensión, insuficiencia renal aguda, hipercalcemia, perturbación en el sabor y salpullidos en la piel (Torruco et al., 2008; Rojas, 2009). Por lo anterior se hace indispensable la búsqueda de nuevas fuentes de compuestos con potencial antihipertensivo que presenten potencialmente menores efectos adversos, siendo los compuestos aislados de fuentes naturales una alternativa fitofarmacéutica para la exploración de nuevos tratamientos para la hipertensión y otras enfermedades de interés mundial.

La mayoría de tratamientos de las enfermedades hasta finales del siglo XX se realizaba mediante el uso de remedios de origen botánico, de los cuales no se conocían sus componentes principales, razón por la que podían llegar a ser perjudiciales o incluso mortales; sin embargo, los avances en los métodos químicos y farmacológicos permitieron la identificación, aislamiento, purificación y evaluación de los principios bioactivos que se convirtieran en nuevas fuentes para la fabricación de fármacos, ya que alrededor del 25% de los medicamentos actuales son derivados de fuentes vegetales (Remillard y Wynn, 2006 citado en Ettinger y Feldman, 2007 y Pamplona, 2007).

Las pasifloráceas cuentan con más de 500 especies reconocidas en el mundo, 80% de ellas distribuidas en regiones tropicales de Sudamérica, teniendo a los Andes de Colombia y Ecuador como el centro de diversidad del género, con un registro 172 especies, 58 de ellas endémicas y el 50% de ellas de fruto comestible (Ocampo et al., 2007, Pérez y d'Eeckenbrugge, 2017). Se calcula en Colombia un estimado de 12.000ha de passifloraceas cultivadas teniendo a la maracuyá, la granadilla y la gulupa como las especies de mayor producción y de las cuales aproximadamente el 20% se convierte en pulpa apetecida por su alto contenido de minerales, vitaminas, fibras y a su atractiva textura, aroma y sabor; el 80% restante del fruto se transforma en residuos agroindustriales de los cuales no se conoce a totalidad su composición química y funcionalidad biológica de sus componentes fundamentales. (Ocampo, Coppens y Jarvis, 2010 y Contreras, Calderón, Guerra y García, 2011).

Por tal razón, la realización de este trabajo pretende caracterizar química y biológicamente extractos obtenidos de semillas de *Passiflora vitifolia* y *Passiflora edulis* var. *edulis*, evidenciar su potencial antirradicalario y antihipertensivo, planteando el uso de estos residuos como un posible tratamiento de la hipertensión arterial, ya que las passifloras contienen metabolitos secundarios con posible aplicabilidad fitofarmacéutica.

1. ANTECEDENTES

Las pasifloráceas cuentan con un gran potencial en componentes bioactivos con propiedades sedativas, antiespasmódicas, antibacteriales (Perry, Alberston, Blunt, Cole y Munro, 1991), antioxidantes, antiproliferativas (Aguillón, Maldonado, Loango, Arango y Landázuri, 2013) e insecticidas (Rudnicki et al., 2007). Un número significativo ha sido utilizado en la medicina tradicional de muchos países, como tratamiento de la ansiedad, hipertensión, insomnio, histeria, epilepsia, espasmos y dolor (Dhawan, Dhawan y Sharma, 2004). Además, la familia se distingue debido a su aporte en minerales, vitaminas, fibras y su atractivo referido a la textura, aroma y sabor (Ocampo et al., 2007).

Los flavonoides glicosidados son el principal componente en gran parte de las passifloras (Wohlmuth, Penman, Pearson y Lehmann, 2010), sin embargo, otros flavonoides (Abourashed, Vanderplanck y Khan, 2002), compuestos fenólicos, quinonas, terpenos, glicósidos cardiotónicos, alcaloides y taninos; también han sido reportados (Aguillón et al., 2013).

Algunos estudios realizados en especies pertenecientes a esta familia, contribuyen al conocimiento, caracterización química y farmacológica de los compuestos presentes en ellas, donde se ha demostrado que las passifloras cuentan con metabolitos con capacidad para disminuir la hipertensión arterial.

2. JUSTIFICACIÓN

Las passifloras son un grupo de plantas que cuentan con gran potencial de compuestos bioactivos, por tal motivo han sido utilizadas en la medicina tradicional de muchos países como tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas: la ansiedad, el insomnio, la histeria, la epilepsia, los espasmos y el dolor (Dhawan et al., 2004). Además, la familia se distingue por su gran uso en el sector frutícola debido a su aporte en minerales, vitaminas, fibras y a su atractivo sabor, textura y aroma (Ocampo et al., 2007).

La hipertensión arterial es un padecimiento multifactorial que puede dañar órganos vitales, tales como corazón, cerebro, retina y riñón (Velázquez et al., 2003), por lo que es considerada un problema importante de salud pública. Esta enfermedad se ha tratado, entre otros, con medicamentos que inhiben la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), uno de los mecanismos responsable de la alteración de la presión normal de la sangre. Otros grupos de medicamentos comunes en el mercado son los β -bloqueadores, los diuréticos y los bloqueadores de los receptores de angiotensina-II, los cuales han sido eficaces y bien tolerados en el tratamiento de la hipertensión. Sin embargo, una de las desventajas de estos medicamentos de origen sintético es que pueden producir ciertas alteraciones secundarias a corto y largo plazo como tos, perturbación en el sabor y salpullidos en la piel (Torruco et al., 2008).

En la actualidad, los antioxidantes sintéticos como el butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT) se utilizan comúnmente para actuar contra los radicales libres en los sistemas alimentarios y biológicos. Sin embargo, los posibles efectos adversos de estos aditivos sintéticos han estimulado su sustitución por antioxidantes y compuestos naturales derivados de plantas que además podrían llegar a actuar como antihipertensivos, hipocolesterolémicos, anticancerígenos y coadyuvantes de actividades inmunomoduladoras en el organismo, gracias a metabolitos secundarios como flavonoides glicosidados, el tipo de compuesto más encontrado en passifloras estudiadas, (Wohlmuth et al., 2010), flavonoides como

schaftosido, isoschaftosido, isoorientina, orientina, isovitexina y vitexina (Abourashed et al., 2002), compuestos fenólicos y otros metabolitos como quinonas, terpenos, glicósidos cardiotónicos, alcaloides y taninos; los cuales también han sido reportados en pasifloráceas como el maracuyá (*P. edulis*) (Aguillón et al., 2013).

Es por esto que se plantea evaluar la capacidad antioxidante y antihipertensiva de extractos totales obtenidos a partir de residuos agroindustriales (semillas) de *P. vitifolia* (especie silvestre) y *P. edulis* Sims var. *edulis* (especie cultivada), con el fin de establecer su potencial aplicación en la industria farmacéutica o nutracéutica en la que se incluyan compuestos de origen natural como parte de una dieta potencialmente útil para la disminución de los riesgos provocados por enfermedades cardiovasculares.

3. PLANTEAMIENTO Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

La hipertensión y las enfermedades a las que esta conlleva (cardiopatías, accidentes cerebro vasculares e insuficiencia renal), se han convertido en una problemática a nivel mundial ya que afecta desproporcionadamente a todas las poblaciones, sin tener en cuenta el nivel social causando el mayor porcentaje de mortalidad y discapacidad prematura en el mundo (OMS, 2013a).

La prevención y/o tratamiento de la hipertensión, teniendo como base de nuestra alimentación diaria el aporte de compuestos bioactivos con capacidad antihipertensiva obtenidos de plantas promisorias de nuestro país, es una alternativa al uso de fármacos sintéticos que pueden ocasionar efectos secundarios indeseables al organismo.

Colombia es un país megadiverso con una amplia diversidad de plantas que, a pesar de ser usadas por diferentes comunidades étnicas y en medicina alternativa, aún no han sido estudiadas química y farmacológicamente con el fin de establecer los diferentes componentes y posibles mecanismos farmacológicos.

El uso de la química de productos naturales en conjunto con la farmacología se convierte en una herramienta indispensable en la búsqueda de nuevas alternativas para el control de enfermedades con base en plantas promisorias presentes en nuestro país.

De acuerdo con esto, la búsqueda de nuevas alternativas para el control de enfermedades de impacto mundial como la hipertensión y la evaluación de los extractos obtenidos de passifloras como *P. edulis* var. *edulis* y *P. vitifolia* podrían conformar una nueva fuente de compuestos de interés en la prevención y/o tratamiento la hipertensión.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad antihipertensiva y antioxidante de extractos obtenidos de semillas de *Passiflora vitifolia* Kunth (especie silvestre) y *Passiflora edulis* Sims var. *edulis* (especie cultivada).

4.2. Objetivos específicos

- 4.2.1. Caracterizar fitoquímicamente los extractos totales obtenidos de semillas de *P. vitifolia* Kunth y *P. edulis* Sims var. *edulis*.
- 4.2.2. Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos totales obtenidos y establecer una posible correlación con la capacidad antihipertensiva.
- 4.2.3. Evaluar la actividad citotóxica de los extractos sobre células polimorfonucleares (PMNs) aisladas de sangre periférica humana.
- 4.2.4. Evaluar la actividad anti-hipertensiva *in vivo* de los extractos, en un modelo de laboratorio utilizando ratas Wistar.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. Familia Passifloraceae

Derivado del latín “Flor is Passion” (Flor de la pasión), el nombre *Passiflora* fue dado en 1696 por Plukenet y en un principio el interés de su estudio se centraba en la belleza de sus flores y posteriormente en la riqueza de sus frutos. La familia se encuentra situada dentro del orden Malpighiales y está dividida en tres subfamilias *Passifloroideae*, *Malesherbioideae* y *Turneroideae* (Souza y Lorenzi, 2005).

5.2. Género *Passiflora*

Este género se considera como el más evolucionado y diverso dentro de la familia, con más del 80% de las especies distribuidas en regiones tropicales de África y América, principalmente en Sudamérica (imagen 1). El género incluye árboles o arbustos carentes de zarcillos, algunos con espinas y androceo con mayor número de estambres. Los análisis filogenéticos basados en marcadores moleculares apoyan la división de *Passiflora* en ocho subgéneros: *Astrophea*, *Deidamioides*, *Dysosmia*, *Granadilla*, *Plectostemma*, *Poliantea*, *Tetrapathea* y *Tryphostematoides* (Yockteng y Nadot, 2004).



Imagen 1: en amarillo, la distribución de las pasifloras en el mundo.

Fuente: <http://www.gbif.org/species/2874172#images>

Los Andes constituyen el centro de diversidad del género en las cuencas hidrográficas situadas entre los 1000 y 2500 m s.n.m. Colombia, con 172 especies reportadas, de las cuales aproximadamente el 50% producen frutos comestibles y nueve se cultivan comercialmente, es el país con mayor biodiversidad de passifloras en el mundo (Estrada y Rodríguez, 2009; Ocampo et al., 2007 y Pérez y d'Eeckenbrugge, 2017) (imagen 2). Se estiman, aproximadamente 16.706ha sembradas en passifloras, correspondientes a 7600ha de maracuyá, 5640ha de granadilla, 2110ha de curuba, 942ha de gulupa y 409ha sembradas en badea y cholupa lo que representa aproximadamente una producción de 188.962 toneladas de fruta fresca y unos 15 millones de dólares anuales en exportaciones para el país (Ocampo et al., 2007 y Agronet, 2010).

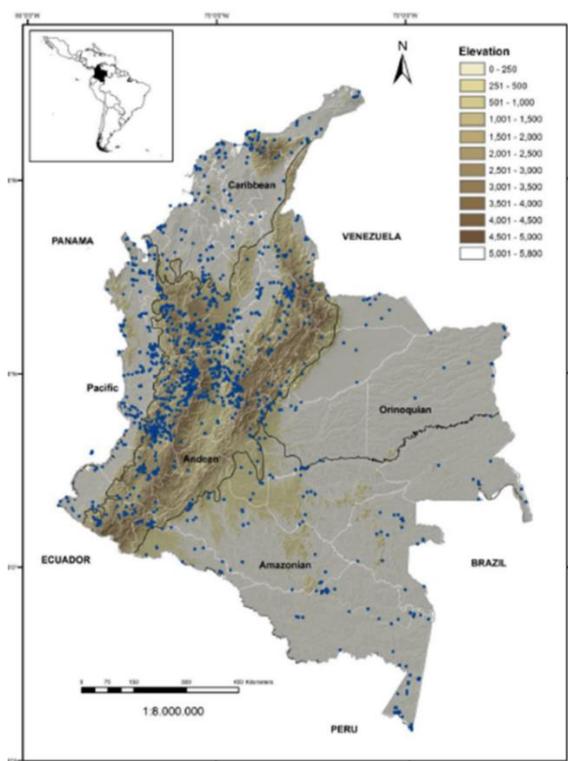


Imagen 2: Distribución de las passifloras en Colombia.

Fuente: Ocampo et al., 2010.

Las pasifloráceas cuentan con un gran potencial en componentes con propiedades sedativas, antiespasmódicas, antibacteriales (Perry et al., 1991), antioxidantes,

antiproliferativas (Aguillón et al., 2013) e insecticidas (Rudnicki et al., 2007). Un número significativo ha sido utilizado en la medicina tradicional de muchos países, como tratamiento de la ansiedad, hipertensión, insomnio, histeria, epilepsia, espasmos y dolor (Dhawan et al., 2004). Además, la familia se distingue debido a su aporte en minerales, vitaminas, fibras y su atractivo referido a la textura, aroma y sabor (Ocampo et al., 2007).

Los flavonoides glicosidados son el principal componente en gran parte de las passifloras (Wohlmuth *et al.*, 2010), sin embargo, otros flavonoides (Abourashed et al., 2002), compuestos fenólicos, quinonas, terpenos, glicósidos cardiotónicos, alcaloides y taninos; también han sido reportados (Aguillón et al., 2013).

5.3. Gulupa (*Passiflora edulis* Sims var. *edulis*)

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Equisetopsida

Orden: Malpighiales

Familia: Passifloraceae

Género: *Passiflora*

Especie: *Passiflora edulis* Sims var. *edulis*.



Imagen 3: *Passiflora edulis* variedad *edulis* determinada por Sims en 1818.

Fuente: imagen A: el autor; imagen B: Ortiz (2010).

Especie originaria de América también conocida como curuba redonda o maracuyá morado, es una fruta promisoriosa, apetitosa con un sabor único, dulce y ligeramente ácido (Isaacs, 2009); sus características nutricionales, organolépticas de sabor y aroma han tenido gran uso en la industria alimenticia para la elaboración de jugo, pulpas, dulces, jaleas, mermeladas y cocteles entre otros (Angulo, 2009); posee alcaloides, y otros principios farmacéuticos los cuales presentan efectos sedante, bajando la presión arterial y actuando como un tranquilizante. Es fuente de vitaminas esenciales como la A, B12 y C, las cuales son de suma importancia para el cuerpo humano; además contiene calcio, fibra, fósforo, hierro, proteínas, magnesio, potasio y carbohidratos (Pinzón, Fischer y Corredor, 2007 y Ocampo et al., 2010).

5.4. Granadilla silvestre (*Passiflora vitifolia* Kunth)

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Equisetopsida

Orden: Malpighiales

Familia: Passifloraceae

Género: *Passiflora*

Especie: *Passiflora vitifolia* Kunth.



Imagen 4: *Passiflora vitifolia* determinada por Kunth en 1818.

Fuente: imagen a: el autor; imagen b:

[http://bibdigital.rjb.csic.es/Imagenes/Ff\(8\)MUT_Fl_Exp_Bot_N_Gra_27/MUT_Fl_Exp_Bot_N_Gra_27_101.pdf](http://bibdigital.rjb.csic.es/Imagenes/Ff(8)MUT_Fl_Exp_Bot_N_Gra_27/MUT_Fl_Exp_Bot_N_Gra_27_101.pdf).

También conocida como gulupa de monte o granadilla de monte, especie de *passiflora* de la cual existe escasa información científica disponible. En un trabajo realizado por Sakalem, Negri y Tabach (2012), se afirma que la especie es nativa del Amazonas, pero que también aparece en América Central, compartiendo similitudes en algunos aspectos, como la intensidad del color rojo de la flor, con *Passiflora coccinea*, también llamada flor escarlata de la pasión (Ocampo et al., 2010).

5.5. Hipertensión arterial

5.5.1. Definición y relevancia clínica

La hipertensión arterial (HTA), se describe como la elevación de la presión ejercida por la sangre sobre las paredes de las arterias, venas y cámaras cardíacas, la cual es mantenida mediante la interacción de mecanismos homeostáticos orgánicos moderados por el volumen de la sangre, la luz de las arterias, las arteriolas y la fuerza de contracción cardíaca. Según la OMS (2015) se considera que un individuo padece de hipertensión cuando su presión arterial sistólica (PAS) es igual o mayor a 140mmHg y/o su presión arterial diastólica (PAD) es igual o superior a 90mmHg.

La HTA es considerada un trastorno serio que incide directamente sobre la salud y se considera una señal temprana de alerta de enfermedades que pueden llegar a presentar un mayor riesgo sobre la salud tales como: problemas cardíacos (insuficiencia cardíaca, angina, infarto), renales (insuficiencia renal) y cerebrales (hemorragia o infarto cerebral y a largo tiempo demencia). Según la OMS (2015) las enfermedades cardiovasculares causan alrededor de 17,5 millones de muertes al año, de las cuales la HTA es responsable de alrededor del 45% de las muertes relacionadas con enfermedades del corazón y del 51% de las muertes por accidente cerebrovascular; asimismo, se debe tener en cuenta que su prevalencia de la HTA está alrededor de un 30 a 45% la cual aumenta en personas de edad avanzada (Mancia et al., 2013).

5.5.2. Estrategias de tratamiento

Antes de dar inicio al tratamiento farmacológico, se debe tener en cuenta que las buenas prácticas alimentarias, la reducción del peso corporal, el consumo de

alcohol, abandonar el hábito de fumar y reducir el consumo diario de sal son necesarias para controlar de forma primaria la hipertensión ya que estos son factores que influyen directamente sobre su aparición y se ha demostrado que dietas ricas en frutas, vegetales, lácteos y el incremento de la actividad física conllevan a la reducción de la presión arterial de pacientes con hipertensión Jauhiainen y Korpela (2007).

Como primera elección para el tratamiento de la hipertensión arterial se recomienda el uso de fármacos cuyas reducciones de la mortalidad y de la hipertensión han sido demostradas claramente en fases clínicas (diuréticos, inhibidores de la ECA, antagonista de angiotensina I, betabloqueantes y antagonista de calcio). Para disminuir el riesgo cardiovascular es importante en primer lugar, reducir la tensión arterial, sin embargo, la elección de los fármacos se realiza teniendo en cuenta las enfermedades concomitantes y las posibles contraindicaciones Guyton y Hall (2011).

Los diuréticos, son fármacos que actúan directamente sobre los riñones aumentando la excreción urinaria mediante la inhibición y reabsorción de NaCl y agua Guyton y Hall (2011).

Los inhibidores de la ECA impiden la formación de la angiotensina II por la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina, y reducen de esa forma la resistencia periférica y la tensión arterial Brunton, Lazo y Parker, (2006) y Lorenzo et al., (2008).

Los antagonistas de calcio son fármacos que inhiben el flujo de iones Ca^{2+} , al unirse con los canales de calcio de tipo L en el corazón y en el músculo liso de los vasos coronarios y periféricos, su bloqueo induce la relajación del músculo liso vascular, con dilatación de las arteriolas principales (Brunton et al., 2006 y Lorenzo et al., 2008).

Los antagonistas de los receptores β -adrenérgicos, según su afinidad con el receptor pueden clasificarse en antagonistas no selectivos (bloqueantes β_1 y β_2) y antagonistas selectivos (bloqueantes β_1), estos reducen la presión arterial, principalmente a través de la disminución del gasto cardiaco, reducen el flujo simpático del sistema nervioso central (SNC) e inhiben la liberación de renina, disminuyendo así la formación de angiotensina II y la secreción de aldosterona, los fármacos prescritos con más frecuencia se encuentran los bloqueantes β_1 selectivos, por ejemplo el metoprolol, este, no tiene afinidad por los receptores α , y en segunda instancia los antagonistas no selectivos como el propranolol (Brunton et al., 2006 y Lorenzo et al., 2008).

Los inhibidores de la ECA basado en el sistema renina-angiotensina-aldosterona regulan la tensión arterial y la homeostasis de Na^+ y agua del organismo. La renina proviene de las células musculares lisas especializadas de las arteriolas eferentes de los glomérulos renales (aparato yuxtaglomerular). Los estímulos para la liberación de renina son: la caída de la presión de perfusión renal y la activación de los receptores adrenérgicos β_1 de las células yuxtaglomerulares, mediadas por el simpático. Cuando la renina se secreta hacia la sangre escinde el decapeptido angiotensina I del angiotensinógeno proveniente del hígado. A partir de la angiotensina I, la enzima convertidora de angiotensina (ECA) produce angiotensina II, que presenta el efecto biológico (Hernández, Lourdes e Isidra, 2002).

La ECA circula por el plasma y se localiza sobre la superficie de las células endoteliales, inhibe el efecto de la angiotensina II sobre la síntesis proteica de las células musculares del corazón y los vasos, y disminuyen de esa forma la hipertrofia cardiaca. Como efectos indeseados, los inhibidores de la ECA pueden producir tos irritativa, empeoramiento de la función renal e hiperpotasemia y contribuye a la inactivación de las cininas, por ejemplo de la bradicinina (Hernández *et al.*, 2002).

Los inhibidores de la ECA, como el captopril y el enalapril, ocupan el sitio activo de la enzima, de tal manera que se inhibe competitivamente la ruptura de la

angiotensina I. Están indicados en caso de hipertensión y de insuficiencia crónica del miocardio. La caída de la presión arterial elevada se fundamenta principalmente en el bloqueo de la formación de angiotensina II. La inhibición de la degradación de la cininas, por ejemplo de las que actúan como vasodilatadoras, puede contribuir al efecto de los inhibidores de los ECA. (Lüllmann, Mohr y Hein, 2010).

5.5.3. Mecanismos de control de la presión arterial (PA).

La PA se regula mediante un complejo sistema en el que interaccionan diferentes mecanismos que actúan a corto, mediano y largo plazo. A corto plazo podemos encontrar el sistema nervioso autónomo (SNA) que mediante el control del gasto cardiaco y la resistencia periférica corrige desviaciones agudas de la PA, mientras que, a mediano y largo plazo, la interacción de diferentes mecanismos nerviosos y hormonales, así como de diferentes sistemas como el de renina angiotensina aldosterona (SRAA) y el sistema óxido nítrico (NO) endotelina (ET) (FitzGerald, Munrray y Walsh, 2004 y Guyton y Hall, 2001).

5.5.4. Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)

El SRAA es considerado como uno de los sistemas más importantes que actúa en la regulación de la presión arterial, el tono vascular y el balance hidro-electrolítico del organismo, razones por las que se considera una diana terapéutica para el control de la HTA.

La Activación del SRAA (figura 1) se da cuando la PA disminuye, lo que provoca la liberación de angiotensinógeno, sustrato que es transformado a angiotensina I (Ang-I) mediante la renina producida en las células yuxtaglomerulares del riñón; posterior a la conformación de la AT-I, ésta, en presencia de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), es transformada en Angiotensina II (Ang-II) un octapéptido que presenta un potente efecto vasoconstrictor que además regula el equilibrio de fluidos y sodio en el organismo (Oparil y Haber, 1974 y Majumder y Wu, 2014).

La ECA en este sistema se convierte en la clave para la hidrólisis de los péptidos de formas inactivas a formas activas, lo cual también la convierte en una diana farmacéutica, ya que al lograr su inhibición se interrumpe el sistema y no se logra la formación de la Ang-II (Cushman, Cheung, Sabo y Ondetti, 1981).

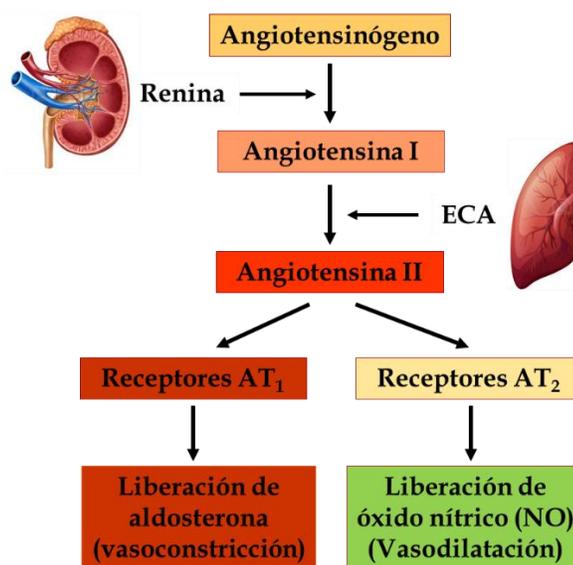


Figura 1: Sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA).

Fuente: el autor

La AT-II se puede unir a dos receptores, el receptor de angiotensina tipo 1 (AT_1) y el receptor de angiotensina tipo 2 (AT_2), presentando diferentes efectos dependiendo del receptor al que se unen; la unión al receptor tipo 1 causa vasoconstricción e induce la liberación de aldosterona que aumenta la retención de agua y sal en el riñón; mientras que la unión de la Ang-II al receptor tipo 2 induce efectos contrarios ya que se estimula la liberación de NO lo que aumenta la vasodilatación (Majumder y Wu, 2014).

5.5.5. Sistema óxido nítrico (NO)

Muchas de las funciones fisiológicas de la regulación y homeostasis vascular se da por la secreción de sustancias vasoactivas por parte de las células endoteliales, entre estas sustancias se encuentra el óxido nítrico (vasodilatador) y la endotelina

(vasoconstrictor). Cuando se produce disfunción endotelial esta se caracteriza por el desequilibrio entre estos dos factores (Majumder y Wu, 2014).

El NO producido por las células endoteliales reduce y mantiene la vasodilatación mediante diferentes eventos biológicos; el NO se produce por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) que transforma la L-arginina en L-citrulina y NO, este último es uno de los principales reguladores del tono vascular y actúa activando la guanilato ciclasa soluble (GCs) la cual aumenta la concentración intracelular de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) en el músculo liso vascular, promoviendo la relajación del mismo (figura 2) (Rodríguez *et al.*, 2001).

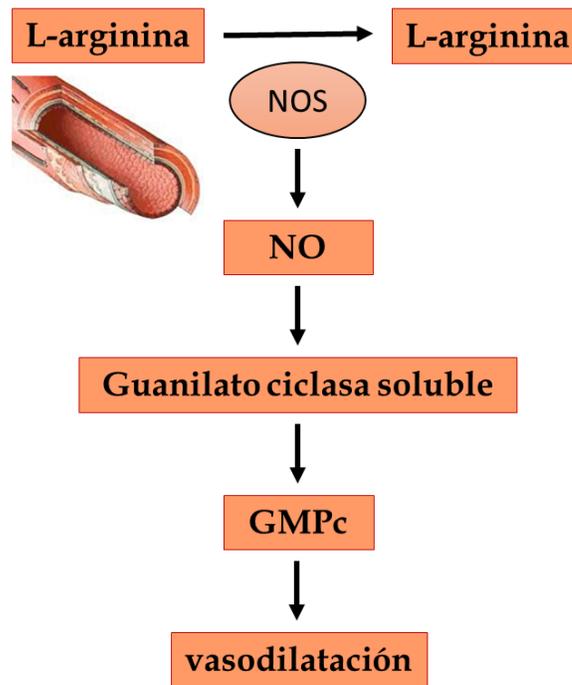


Figura 2: Sistema óxido nítrico (NO).

Fuente: el autor

5.6. Modelos animales para el estudio de la hipertensión

Como la hipertensión es una enfermedad que se encuentra influenciada por diferentes parámetros ligados al estilo de vida entre ellos: la alimentación, edad, sedentarismo, tabaquismo, además de muchos mecanismos fisiológicos; la generación y estudio de nuevos compuestos se realiza mediante la implementación

de métodos que permitan observar cual es el efecto del compuesto a probar sobre la presión arterial como un todo, limitando la intervención de variables externas que puedan interferir y de esta forma modificar la respuesta por parte del modelo. Por lo tanto los modelos animales se usan como una alternativa eficaz para lograr observar cual es la reacción de un individuo y cómo se comportan las sustancias probadas en el mismo. La elección del modelo se debe realizar teniendo en cuenta que las características de la hipertensión presentadas por el animal deben coincidir con la hipertensión de humanos y de esta forma lograr los mejores resultados con la evaluación antihipertensiva (Leong, Ng y Jaarin, 2015).

5.6.1 Modelos *in vivo* para el estudio de la hipertensión

Existe un gran número de modelos animales a los que mediante diferentes metodologías se les logra inducir algún tipo de hipertensión, entre ellos podemos encontrar:

5.6.1.1. Hipertensión inducida quirúrgicamente

Fue implementada en 1934 por Goldblatt, Lynch, Hanzal y Summerville, quienes utilizaron al perro como primer modelo animal de hipertensión, la cual indujo mediante la constricción unilateral de la arteria renal; más adelante esta misma técnica se implementó en ratas y conejos ya que en los perros se dificultaba el mantenimiento de la presión debido a que tienen la capacidad de autorregulación renal. Se conocen tres formas quirúrgicas para la inducción de esta hipertensión pero que a su vez logran diferentes respuestas en el animal, entre ellas podemos encontrar:

- **Dos riñones un clip (2R1C):** se realiza con la presencia de los dos riñones en el animal de los cuales uno se interviene bloqueando la arteria renal, el resultado obtenido de esta intervención es el aumento sostenido de la presión arterial, activación del sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) y el sistema nervioso simpático (SNS), sin retención de sal y agua ya que uno de los riñones se encuentra intacto (Badyal, Lata y Dadhich, 2003).

- **Un riñón un clip (1R1C):** Para este modelo se realiza la extracción uno de los riñones y bloqueando la aorta renal del que queda, como resultado se produce incremento de la presión arterial y aumenta en la retención de sal y agua (Badyal et al., 2003).
- **Dos riñones dos clips (2R2C):** En este caso se realiza el bloqueo de ambas arterias renales, como resultado se produce incremento de la presión arterial y aumenta en la retención de sal y agua, bloqueando del sistema renina angiotensina (Badyal et al., 2003).

5.6.1.2. Hipertensión endocrina

En este modelo, la hipertensión es inducida mediante la administración de mineralocorticoides como el acetato de desoxicorticosterona (DOCA), lo que aumenta la retención de sodio y líquidos aumentando la presión arterial (Badyal et al., 2003).

- **Inducción de hipertensión con sal DOCA:** se debe realizar la extracción de uno de los riñones en el animal y posterior a su recuperación se le administra vía subcutánea sal DOCA, sustituyendo el agua por una solución de NaCl, lo que induce la hipertensión mediante la retención de sodio y agua (Badyal et al., 2003).

5.6.1.3. Hipertensión por dieta

- **Exceso en la ingesta de sal:** El consumo de altas concentraciones de sal por parte de un organismo produce la aparición de la hipertensión, de forma crónica su consumo en ratas produce hipertensión similar a la sufrida por humanos, y por lo general se induce mediante la sustitución de agua potable por soluciones de NaCl y aumentando las concentraciones de sal en la dieta del animal (Badyal et al., 2003).

5.6.1.4. Hipertensión genética

- **Ratas SRH:** el modelo de ratas espontáneamente hipertensas, es un modelo al que se le han atribuido similitudes con la fisiología de la hipertensión en humanos, por lo que se ha convertido en el animal de elección para la evaluación de compuestos con potencial antihipertensivo; los animales desarrollan la hipertensión entre las 4 y las 6 semanas de edad, sin necesidad de realizar intervenciones químicas, quirúrgicas y/o farmacológicas; este modelo en las primeras etapas de la enfermedad, presenta aumento en el gasto cardiaco y resistencia periférica normal y durante el desarrollo de la hipertensión las SRH pueden generar alteraciones estructurales en el corazón formando hipertrofia cardiaca progresiva (Leong et al., 2015); sin embargo los costos y las dificultades para el acceso y manutención de estos animales en nuestro país, dificulta su adquisición para la realización de pruebas en este modelo.

5.6.1.5. Hipertensión inducida químicamente

- **Hipertensión por dexametasona:** La dexametasona es un medicamento generalmente usado como antiinflamatorio, el cual al ser usado de forma crónica produce incremento de la presión arterial tanto en ratas como en humanos; la hipertensión puede estar ligada al aumento del estrés oxidativo, especies reactivas de oxígeno (ROS), disminución de óxido nítrico sintasa (NOS) y concentración de Nitrógeno (NOx) en suero (Sharma, Vyawahare, y Ladhha, 2010).
- **Hipertensión inducida por L-NAME:** el N-Nitro-L-Arginina metil éster (L-NAME) es un inhibidor de la oxido sintasa, y al administrarlo crónicamente inhibe la NOS lo que disminuye la producción de óxido nítrico en el organismo, produciendo un aumento de la presión arterial, disminución de la frecuencia cardiaca, reducción del gasto cardiaco y alteraciones en la contractilidad cardiaca; lo cual genera daños a nivel arterial y cardiaco que

se pueden detectar mediante la implementación de histopatología (Sharma et al., 2010).

5.6.2. Modelos de baño de órganos

Los ensayos realizados en órgano aislado establecen una herramienta complementaria para la evaluación de la actividad farmacológica de una muestra *in vivo*, ya que nos permite realizar la evaluación de sus efectos en tejidos, receptores, canales y enzimas de un modelo animal; de esta forma se convierte en un modelo para la elucidación de posibles mecanismos de acción de una molécula o extracto así como las concentraciones a las que presentan una respuesta específica (Ramírez, Palacios y Gutiérrez, 2006).

Este modelo ha sido ampliamente utilizado por la comunidad científica ya que es económico, permite la evaluación rápida de moléculas y extractos vegetales, con un requerimiento menor de animales que en modelos *in vivo* teniendo en cuenta que los efectos homeostáticos del órgano aislado pueden ser menores que en organismo íntegro; este modelo es aplicado comúnmente en la evaluación de moléculas con potencial antihipertensivo empleando anillos aislados de aorta, arterias y corazón, mediante los cuales se valora la capacidad que poseen para relajar (Ramírez et al., 2006).

6. METODOLOGÍA



Figura 3: Diagrama de la metodología

6.1. Recolección y preparación del extracto

El material vegetal *P. vitifolia* se recolectó en el municipio de Ibagué en los predios del jardín botánico Alejandro Von Humboldt de la Universidad del Tolima (N 4° 15' a N 4° 40', y W 75° 00' a 75° 30'), y *P. edulis* var. *edulis* fue recolectado en la finca Buenos Aires vereda la tigrera en el municipio de Cajamarca departamento del Tolima (4° 26' 27"N 75° 25' 40"O). Se recolectaron ejemplares completos y se enviaron para la determinación taxonómica al Herbario Nacional, así como frutos enteros maduros de cada especie para la extracción de las semillas y realización de los extractos y posteriores pruebas químicas y biológicas.

El material recolectado fue llevado a los laboratorios del Grupo de Investigación en Productos Naturales de la Universidad del Tolima (GIPRONUT) donde se clasificó por su grado de madurez, se separó de material en mal estado y se extrajeron las semillas.

Las semillas limpias fueron sometidas secado a $42 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 72 horas para posteriormente ser molidas en un molino de aspas hasta obtener un polvo

homogéneo que fue empacado y rotulado en bolsas ziplock para su almacenamiento a -80°C protegidas de la luz y de la humedad.

6.1.1. Obtención de extractos

Se empacaron 170 gramos de cada una de las semillas molidas en un dedal de interlón para realizar un desengrasado con hexano en un equipo soxhlet hasta el agotamiento, el material desengrasado se secó a temperatura ambiente para eliminar los excesos de hexano y se sometió a maceración con etanol al 97% con agitación constante durante 24 horas. Los extractos fueron filtrados al vacío y el material se sometió nuevamente a maceración hasta lograr el agotamiento del mismo; los extractos etanólicos (EETOH) fueron concentrados a presión reducida en un rotaevaporador BÜCHI R114 hasta reducirlos en un 70% aproximadamente y posteriormente almacenarlos a 4°C protegidos de la luz (Jiménez, Rodríguez, Murillo, Méndez & Rueda, 2013).

6.1.2. Caracterización fitoquímica de los extractos

Los extractos obtenidos fueron caracterizados mediante pruebas fitoquímicas colorimétricas y cromatografía en capa delgada con el fin de determinar la presencia y ausencia de núcleos secundarios (Domínguez, 1973 y Murillo y Méndez, 2012), para lo cual se utilizaron las pruebas descritas a continuación:

- ❖ Saponinas: la presencia de este núcleo secundario se realizó mediante dos pruebas:
 - Prueba de la espuma: esta prueba se realiza mediante la mezcla del extracto a evaluar en proporciones 1:10 con agua caliente, tomando 1mL de esta mezcla y se agita vigorosamente por 30 segundos y la reacción se deja en reposo por 30min, la presencia de espuma sobrenadante indica la presencia de saponinas en la muestra.
 - Prueba de Rosenthaler: esta prueba se realiza mediante la adición dos gotas de solución etanólica de vainillina al 1% y dos gotas de ácido sulfúrico concentrado a 0,5mL del extracto a evaluar, reacción que

permite cambios de coloración a morado violeta del extracto en presencia de saponinas.

- ❖ Polifenoles: para verificar la presencia de polifenoles totales en los extractos, se utiliza el ensayo de Folin-Ciocalteu (FC) en el cual mediante la mezcla de 0,5mL del extracto con 5 gotas de reactivo FC y dos gotas de Na_2CO_3 , permite la identificación de polifenoles mediante el cambio a color azul oscuro de la mezcla indicativo de su presencia.
- ❖ Taninos: los taninos son compuestos polifenólicos astringentes con capacidad de unirse a proteínas con una alta sensibilidad a la oxidación especialmente en medios ácidos, la confirmación de su presencia se realiza mediante la reacción de 0,5mL del extracto con 5 gotas de cloruro férrico que mediante cambios de coloración a azul a negro indican la presencia de taninos hidrolizables y cambios de color a azul a verde indican la presencia de taninos condensados.
- ❖ Flavonoides: para verificar la presencia de flavonoides en los dos extractos, se realizó la prueba de Shinoda y cromatografías de capa delgada.
 - La identificación de flavonoides mediante la prueba de Shinoda se realiza mediante la adición de limaduras o polvo de magnesio a la muestra a evaluar, seguido de la adición gota a gota de HCl concentrado hasta finalizar el desprendimiento de hidrógeno. La reacción se interpreta como positiva para la presencia de flavonoides con la aparición de coloraciones rosadas, rojas, violetas o anaranjadas, posterior a la reacción.
 - Las cromatografías se realizaron utilizando como fase estacionaria placas de sílica gel 60 GF-254 con soporte de aluminio y como fase móvil una mezcla de acetato de etilo - ácido fórmico - ácido acético - agua en proporciones (10:0,5:1:1), las placas se observaron al visible y luz ultravioleta (254nm y 366nm) antes y después de revelarse con AlCl_3 interpretando la presencia de bandas de color amarillo, rojo, azul y púrpura como positivo para la presencia de flavonoides.

-
- ❖ Antraquinonas: para la identificación de antraquinonas en los extractos, se realizó la reacción de Bornträger la cual consistió en el fraccionamiento líquido/líquido del extracto etanólico con cloroformo con posterior adición de NaOH al 5% en agua a la fase clorofórmica del fraccionamiento, la aparición de coloración rojiza fase acuosa indica la presencia de este núcleo secundario.
 - ❖ Terpenos: la presencia de terpenos en los extractos etanólicos de las dos semillas se verificó mediante las reacciones de Lieberman-Burchard, Salkowski y CCD.
 - Reacción de Lieberman-Burchard se lleva a cabo posterior a la extracción sólido líquido del extracto, de una fracción clorofórmica la cual se lleva a sequedad y posterior a esto se le agrega anhídrido acético seguido de ácido sulfúrico que genera coloraciones azul o verde en presencia de esteroides; rojo, rosado o violeta en presencia de triterpenos y amarillas en presencia de triterpenos saturados.
 - La reacción de Salkowski se lleva a cabo mediante la mezcla de 0,5mL del extracto etanólico con 0,5mL de cloroformo a la cual le es agregada posteriormente 0,5mL de ácido sulfúrico al 85%. La reacción de la mezcla con el ácido genera un anillo en la interfase positivo para terpenos cuando se aprecia de color amarillo o rojo.
 - La CCD se realizó utilizando como fase estacionaria placas de sílica gel G-60 y como fase móvil una mezcla de éter de petróleo y acetato de etilo en proporciones (9:1); la placa se reveló mediante aspersion con vainillina al 1% en H₂SO₄ al 5% sometiéndola a calor durante 5 min, la aparición de bandas de color verde, rojo, rosado, azules y/o amarillo son indicativas de la presencia de terpenos en la muestra evaluada.
 - ❖ Alcaloides: la presencia de alcaloides en los dos extractos se evidenció mediante la reacción de Tanred, Dragendorff, Mayer y Valser; para lo cual, 10mL de cada extracto se secaron y resuspendieron en HCl al 10%, la suspensión se filtró y se dividió en 5 tubos para realizar las pruebas de reconocimiento nombradas

anteriormente. Cuatro tubos se destinaron para los reactivos de los cuales se agregó tres gotas y el quinto se destinó como control de comparación. Se consideró como positivo para las pruebas cuando aparecieron precipitados o turbiedad en la reacción, y negativo cuando no se formó ningún tipo de precipitado.

- ❖ **Cardiotónicos:** la presencia de este núcleo en los extractos se verificó mediante la reacción de Baljet la cual se realizó mezclando 2,5mL de cada extracto con 1,5mL de acetato de plomo al 10% y 1,5mL de agua destilada calentando durante 10min, la mezcla se filtró y se le agregó 5mL de CHCl_3 separando la fase clorofórmica en dos tubos y llevando a sequedad; uno de los tubos se le agregó el reactivo de Baljet (solución etanólica de ácido pícrico al 1% + NaOH al 10% en agua), el otro se tomó como control, la reacción se considera positiva para la presencia de este núcleo con la presencia de coloración naranja, roja o violeta en la reacción.

6.2. Actividad citotóxica de los extractos *in vitro*.

6.2.1. Ensayo de MTT

Para determinar la citotoxicidad de los extractos, se realizó un ensayo de MTT (metil tiazol tetrazolio) el cual evalúa la supervivencia y capacidad de proliferación de células posterior a recibir un tratamiento (Mosmann, 1983). El MTT 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) es una sal tetrazolio de color amarillo y soluble en agua; el cual al ingresar a una célula viable se descompone por la acción de enzimas deshidrogenasas mitocondriales (succinato-deshidrogenasas), transformándolo en cristales de formazán de color azul-violeta insolubles en agua, solubles en dimetilsulfóxido (DMSO) y cuantificable espectrofotométricamente a una longitud de onda $\lambda = 540\text{nm}$. Teniendo en cuenta esto, la transformación del tetrazolio a formazán es directamente proporcional a la cantidad de células viables en el medio posterior a la exposición de estas a una muestra (Mosmann, 1983 y Cárdenas, Aragón, Ospina, Isaza, y Pérez, 2012).

Los leucocitos polimorfonucleares humanos (PMNs) fueron obtenidos de sangre periférica humana previo consentimiento informado del paciente (anexo 1),

teniendo en cuenta la metodología propuesta por Cárdenas y colaboradores (2012) con algunas modificaciones. En tubos cónicos de 15mL se tomaron 3mL de la sangre y se adicionaron cuidadosamente sobre 9mL de Ficoll-Hypaque con el fin de crear un gradiente adecuado para separar células mononucleares de polimorfonucleares, los tubos fueron sometidos a centrifugación a 1400rpm durante 40min y temperatura ambiente, el resultado son tres fases de las cuales se descartan la fase superior (plasma) y la fase intermedia (mononucleares); la fase inferior que contiene los PMNs y eritrocitos es diluida al doble con buffer PBS pH 7,4 y mezclada con dextrano al 2% en solución salina al 0,9% en proporcione 1:1, la mezcla se homogeniza por inmersión del tubo con el fin de separar los eritrocitos de lo PMNs y se dejó en reposo durante 40 minutos a temperatura ambiente, posterior a esto se eliminó la fase superior que contiene los eritrocitos y se centrifugó a 325xg durante 15min descartando el sobrenadante, el precipitado final, se resuspendió en PBS con glucosa 10mM y se realizó un recuento celular determinando la viabilidad de las células presentes (Cárdenas et al., 2012).

Para la evaluación de la viabilidad celular, los PMNs fueron incubados con los extractos a diferentes concentraciones (500, 1000, 2000 y 4000µg/mL) durante 30min a 37°C, pasado este tiempo se centrifugan a 325xg durante 10 min a 4°C eliminando el sobrenadante teniendo cuidado de no eliminar las células adheridas al tubo, se les adiciona MTT a una concentración de 420µg/mL y se incuban nuevamente durante 1 hora a 37°C, nuevamente se centrifugan se elimina el sobrenadante y se le agregan 100µL de DMSO agitándolo vigorosamente durante 5 min; a la solución final se le determina la absorbancia a 540nm y mediante esta se determinó la viabilidad final de las células.

El porcentaje de viabilidad se calculó teniendo en cuenta la siguiente ecuación:

$$\%Viabilidad = \left(\frac{A_{tratamiento}}{A_{control}} \right) \times 100$$

Dónde: $A_{tratamiento}$: absorbancia de las células tratadas con los extractos y $A_{control}$: absorbancia de las células tratadas con el vehículo (solución salina).

6.3. Actividad Antioxidante

6.3.1. Actividad estabilizante del catión radical ABTS (catión del ácido 2,2', azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).

Para evaluar la capacidad antirradicalaria de los extractos frente a este radical, se utilizó la metodología propuesta por Granados, Yáñez y Santafé (2012) con algunas modificaciones. Para la elaboración del radical, se tomaron 17.5mg de ABTS (Sigma Aldrich®) y se disolvieron en 9ml de H₂O estéril; aparte se pesaron 34mg de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) (Merck®) disueltos en 1mL de H₂O; las dos soluciones se mezclaron constituyendo la solución madre, la cual fue almacenada por 24h en oscuridad; transcurrido el tiempo, el radical formado (ABTS+) se diluyó con etanol al 97% ajustando la absorbancia del mismo a 0.700 ± 0.05 a una longitud de onda de $\lambda = 734\text{nm}$ en un lector de microplacas Thermo Evolution®.

Los extractos fueron evaluados desde 1µg/mL hasta 125µg/mL con un n=3, combinando el radical ajustado con las diferentes concentraciones de los extractos en proporciones (50:1) e incubando la mezcla en oscuridad durante 7min para su posterior lectura. La actividad estabilizante del radical ABTS se determinó mediante la ecuación:

$$AEABTS = \left(\frac{A_{ABTS} - A_{6\text{min}}}{A_{ABTS}} \right) \times 100$$

Dónde: AEABTS: Actividad estabilizante del radical ABTS en porcentaje. AABTS: Absorbancia del ABTS antes de agregar la muestra. A_{6min}: Absorbancia de la mezcla reaccionante a los 7min. Como patrón se utilizó el vehículo de preparación de los extractos, el cual se sometió a las mismas condiciones de ensayo.

6.3.2. Actividad estabilizante del radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)

Para evaluar esta actividad se utilizó la metodología propuesta por Sánchez, Murillo y Méndez (2010). El método fue propuesto por Blois en 1958 donde demostró inicialmente la capacidad para aceptar un hidrogenión por parte del radical, la molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo es conocida como un radical libre estable que al reaccionar con un sustrato antioxidante con capacidad de donar un átomo de hidrógeno cambia de color violeta oscuro a un color amarillo claro o

inoloro; este cambio de color es posible monitorearlo mediante espectrometría y dependiendo del cambio en la coloración. El radical se preparó a una concentración de 20mg/L en metanol cubriendo los recipientes con papel aluminio para evitar su degradación; la evaluación de los extractos se realizó desde 1µg/mL hasta 125µg/mL concentración final con un n=3, combinando el radical ajustado con las diferentes concentraciones de los extractos en proporciones (1:0,25) La mezcla se conservó en oscuridad (30min) y se midió la absorbancia a 517nm contra un blanco (solvente y DPPH).

La actividad estabilizante del radical DPPH se determinó mediante la ecuación:

$$AEDPPH = \left(\frac{A_{DPPH} - A_{30min}}{A_{DPPH}} \right) \times 100$$

Dónde: AEDPPH: Actividad estabilizante del radical DPPH en porcentaje. A_{DPPH} : Absorbancia del DPPH antes de agregar la muestra. A_{30min} : Absorbancia de la mezcla reaccionante a los 30 minutos.

6.4. Evaluación de la actividad antihipertensiva

6.4.1. Actividad antihipertensiva *in vivo*

Para la evaluación de la actividad antihipertensiva *in vivo* se utilizaron ratas Wistar macho de 9-11 semanas de edad, suministradas por el Bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia; los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura y ciclos luz-oscuridad de 12h con libre acceso a alimento y agua excepto durante los días de administración de los extractos cuando se dejó en un periodo de ayuno de 12h. Los ensayos de esta investigación fueron realizados cumpliendo los lineamientos éticos plasmados en la resolución N. 008430 de 1993 por el Ministerio de Salud y la ley 84 de 1989 de la Republica de Colombia; la propuesta de investigación se presentó ante el Comité de Bioética de la Facultad de ciencias de la Universidad Nacional y las metodologías planteadas fueron avaladas para su realización bajo el acta 16 del 13 de septiembre de 2016 (Anexo 2).

6.4.2. Modelo de inducción de hipertensión arterial con L-NAME

Para llevar a cabo este modelo se realizó un acondicionamiento previo de los animales a la técnica ("Tail-cuff") y al ambiente del Bioterio (Bareño, 2015), posterior a esto los animales fueron asignados aleatoriamente a los siguientes grupos (n=6):

Grupo 1: extracto *P. edulis* (150mg/Kg)+ L-NAME (30mg/Kg)

Grupo 2: extracto *P. vitifolia* (150mg/Kg)+ L-NAME (30mg/Kg).

Grupo 3: Grupo blanco (únicamente vehículo).

Grupo 4: L-NAME a (30mg/Kg)+vehículo.

Grupo 5: Enalapril (10mg/Kg)+L-NAME (30mg/Kg).

Los extractos y el enalapril (fármaco de referencia) fueron suspendidos en el vehículo, se administraron de forma oral con la ayuda de cánulas y el L-NAME disuelto en solución salina se administró intraperitonealmente; tanto los extractos como el L-NAME se administraron cada 48 durante. El vehículo utilizado para resuspender los extractos y el enalapril consistió en una mezcla de glicerol, propilenglicol y agua en proporciones (10:10:80).

6.4.3. Medición de la presión arterial

La medición de la presión sistólica se determinó por el método no invasivo de "dispositivo de manguito en la cola" ("Tail- Cuff"), el cual mediante la oclusión del paso de sangre a través de un sensor permite realizar un seguimiento al pulso del animal y de esta forma determinar la presión arterial del mismo. Las ratas se colocaron en cepos y las colas se calentaron a una temperatura de $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ con el fin de dilatar la arteria caudal del animal y de esta forma permitir una mejor lectura, posterior a esto, en la base de la cola se colocó el manguito y transductor de ultrasonido conectados a un medidor de presión no invasiva marca ("PANLAB-LE 5002"), equipo necesario para expresar numéricamente el pulso y presión arterial del animal. La presión se calculó mediante la generación de presión externa a la cola mediante el manguito, lo que disminuye la señal del pulso hasta desaparecer debido a la oclusión de los vasos sanguíneos y al disminuir la presión ejercida por

el manguito, el pulso reaparece; teniendo en cuenta la presión externa que se está infringiendo al momento de aparecer nuevamente el pulso esta es considerada como la presión sistólica (PS) del animal (Vanvliet, Chafe, Vladan, Schnyder y Montani, 2000).

6.5. Modelo de vasodilatación en anillos aislados de aorta

Para la realización de esta técnica, se utilizaron ratas Wistar adultas con pesos entre los 250 a 350g, las cuales se sacrificaron mediante el uso de cámara de éter etílico; se realizó la toracotomía del animal y se extrajo la arteria aorta torácica la cual fue sumergida inmediatamente en solución de Krebs pH 7,4 compuesta por: NaCl 1,18M, KCl 4,75mM, CaCl₂ 1,8mM, MgSO₄ 1,20mM, KH₂PO₄ 1,24mM, ácido L-ascórbico 0.1M, glucosa 11mM y bicarbonato de sodio 25mM, a una temperatura de 37°C con carbogenización constante, esto con el fin de conservarla de la mejor manera durante la limpieza del tejido conectivo circundante y montaje en el baño de órganos (Torres, Ibáñez & Pabón, 2012).

La aorta libre de tejido conectivo fue cortada en fragmentos de 5mm de longitud y los anillos vasculares resultantes se montaron en un sistema de baño de órganos que contenía 20mL de solución de Krebs pH 7,4 a 37°C y oxigenación constante con carbógeno; cada anillo se fijó mediante alambres de acero inoxidable por el extremo inferior a la base del baño y por el superior a un transductor isométrico acoplado a un sistema de amplificación de señal y registro computarizado marca ("Data Trax 2", WPI). Los anillos se sometieron a una tensión basal de 2g permitiendo un periodo de estabilización aproximado de 1h realizando cambio de la solución de Krebs y ajustando la tensión basal cada 15min (Torres et al., 2012).

Transcurrido el periodo de estabilización y para verificar la integridad de los anillos, se aplicó a cada baño una solución 1μM (concentración final) de fenilefrina (FE) y se incubó hasta que los anillos alcanzaran un valor de contracción estable (valor meseta), en este momento a cada pozo se le adicionó solución de acetilcolina (ACh) 1*10⁻⁵M y se calculó el porcentaje de relajación; los anillos cuya contracción

con fenilefrina no fuese \geq a 1g y relajación con acetilcolina \geq al 30% se descartaron del experimento. Posterior a su verificación, los anillos se lavaron con solución de Krebs hasta alcanzar la contracción basal y se estabilizaron durante 15min.

6.5.1. Evaluación de la relajación inducida por el extracto etanólico de *P. vitifolia* y *P. edulis* var. *edulis*.

Con el fin de comprobar si los extractos etanólicos de *P. vitifolia* y *P. edulis* var. *edulis* ejercen vasorrelajación de los anillos precontraídos con KCl 80mM (agonista despolarizante de membrana por activación de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes) (Brunton *et al.*, 2006) y fenilefrina 1 μ M (agonista de los receptores α -adrenérgicos (Lorenzo *et al.*, 2008), se aplicaron por separado cada uno de ellos, previa verificación de la viabilidad de los anillos, incubándolos hasta lograr la meseta máxima de contracción, posterior a esto se agregaron a los baños los extractos en concentraciones acumulativa de 1, 10, 30, 100 y 300 μ g/mL (concentración final en la copa) aplicando la concentración a acumular cada 20 minutos y registrando el potencial relajante con cada aplicación; como control se utilizó DMSO al 1% (concentración final en la copa) vehículo en el cual se disolvieron los extractos (Torres et al, 2012).

6.5.2. Determinación de la relajación de acetilcolina y nitroprusiato en aorta de rata tratada pre-contraída con Fenilefrina.

Ratas hipertensas tratadas con los extractos de *P. edulis* var. *edulis* y *P. vitifolia*, se sacrificaron en cámara de éter etílico y mediante toracotomía se extrajo la aorta torácica la cual se seccionó y montó en el baño de órganos, los anillos se contrajeron mediante FE 1 μ M y una vez alcanzada la máxima contracción se le adicionaron concentraciones acumulativas de acetilcolina (1.0* 10⁻⁴, 1.0* 10⁻³, 5.0*10⁻³, 1.0*10⁻², 5.0*10⁻², 8.0*10⁻², 1.0*10⁻¹, 3.0*10⁻¹, 5.0*10⁻¹, 1.0, 5.0, 10, 50, 100 μ M) y nitroprusiato (5.0 * 10⁻⁵, 1.0*10⁻⁴, 1.0*10⁻³, 5.0*10⁻³, 1.0*10⁻², 5.0*10⁻², 1.0*10⁻¹, 5.0*10⁻¹, 1.0, 5, 10 μ M), anotando la máxima relajación que se lograba al agregar cada una de las alícuotas (Bareño, 2015).

6.5.3. Evaluación de los mecanismos de acción del extracto etanólico de *P. vitifolia* y *P. edulis* var. *edulis*.

Mediante el modelo de baño de órganos utilizando ratas sin tratamiento, anillos de aorta previamente verificados se incubaron durante 15min con: L-NAME 100 μ M (inhibidor de la NOS), azul de metileno 1 μ M (inhibidor de la guanilato ciclasa), indometacina 1 μ M (inhibidor de ciclooxigenasa), atropina 30 μ M (antagonista muscarínico) y propanolol 1,0 μ M (bloqueador del receptor β) (Brunton et al., 2006; Lorenzo et al., 2008; Champion et al., 1999), posterior al tiempo de incubación los anillos se sometieron a contracción con fenilefrina hasta alcanzar la meseta máxima de contracción y se agregaron a los baños los extractos en concentraciones acumulativas de 1, 10, 30, 100 y 300 μ g/mL cada 20min observando la relajación producida, que se comparó con la establecida en anillos sin presencia de estos compuestos. Esta metodología permite evaluar si la vasodilatación producida por los extractos está ligada a los mecanismos mediados por los compuestos anteriormente nombrados (Torres et al., 2012).

6.5.4. Inhibición de la angiotensina II (AT-II) por el extracto etanólico de *P. vitifolia* y *P. edulis* var. *edulis*.

Teniendo en cuenta la metodología de baño de órganos, anillos de aorta previamente verificados fueron precontraídos con NaCl 60mM y lavados con solución de Krebs pH 7,4 hasta alcanzar la tensión basal (2g), posterior a esto se adicionó a cada baño AT-II de forma acumulativa en concentraciones de $1 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-2}$, $5 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-1}$, $5 \cdot 10^{-1}$ y 1 μ M, estableciendo la curva de contracción de este compuesto, los anillos fueron nuevamente lavados hasta lograr la contracción basal y se incubaron durante 15min con los extractos a 300 y 30 μ g/mL, logrado el tiempo de incubación se repite la curva de contracción con AT-II comparando los resultados de contracción obtenidos en presencia y en ausencia de los extractos.

6.6. Análisis de los datos

Todos los resultados obtenidos en este trabajo se expresaron como el promedio \pm el error estadístico de la media (e.s.m), las diferencias de presión arterial y relajación de los anillos de aorta se analizaron mediante la aplicación de un análisis de varianza (Anova paramétrico de dos vías), previa verificación de la distribución normal de los datos (prueba de Shapiro Will) y de su dispersión homogénea (prueba de homocedasticidad de varianzas).

Las gráficas de los resultados de relajación en anillos de aorta fueron comparadas mediante el test de Tukey, con el fin de encontrar diferencias significativas entre los ensayos. La concentración efectiva 50 (CE₅₀) de los extractos (la concentración necesaria para disminuir en 50% la contracción máxima obtenida con el agonista), se obtuvo mediante un análisis de regresión lineal logarítmica con al menos tres puntos de concentración que generaran porcentajes de respuesta entre el 20 y el 80% de contracción. Todos los datos se archivaron en el programa Excel (Microsoft® office Excel 2013) y su análisis se realizó por medio del programa GraphPad Prism 6.

7. CONSIDERACIONES ÉTICAS

De acuerdo con los principios establecidos en la Declaración de Helsinkien (Manzini, 2000), la ley 84 de 1989 y la resolución 008430 de Octubre 4 de 1993 y debido a que esta investigación se consideró como riesgo mínimo en cumplimiento con los aspectos mencionados en el artículo 6 de la presente resolución, este estudio se desarrolló conforme a los siguientes criterios:

- Las muestras de sangre utilizadas para el desarrollo de los ensayos de citotoxicidad planteados en esta investigación, se adquirieron previa notificación y firma de un consentimiento informado de los pacientes donantes (anexo 1).
- Los animales utilizados en ésta investigación fueron proporcionados por el Bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, institución que cuenta con los permisos y certificaciones necesarias, así como las instalaciones adecuadas para el uso y cría de animales de experimentación.
- Los investigadores recibieron la inducción necesaria para llevar a cabo las pruebas y manipulación correcta de los animales, tratando los animales como seres sensibles y brindándoles un cuidado ético apropiado para evitarles angustia y dolor.
- Los animales seleccionados para la realización de las pruebas contaban con características y calidad apropiadas y se utilizó el mínimo número requerido para obtener resultados validos según las 3R de Russel y Burch.
- Al finalizar las pruebas *in vivo*, o cuando fue necesario, los animales que presentaron signos de dolor, invalidez, angustia o algún otro síntoma de discomfort, se sacrificaron mediante técnicas adecuadas que no generen dolor tal como vapores de éter en cámara de vidrio.
- El proyecto fue evaluado por el comité de bioética de la facultad de ciencias, quien aprobó la realización de los ensayos planteados en el mismo (anexo 2)

8. RESULTADOS

8.1. Caracterización fitoquímica preliminar

8.1.1. Determinación del material biológico

Partes aéreas (hojas, flores y frutos) de las dos especies estudiadas fueron colectadas y secadas para su posterior envío al Herbario Nacional Colombiano (COL) del Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá; donde se les realizó su determinación taxonómica. Las plantas fueron determinadas como *Passiflora edulis* Sims y *Passiflora vitifolia* Kunth y quedaron registradas en el herbario en los números de colección COL. 592023 y COL. 592024 respectivamente (anexo 3).

8.1.2. Identificación de los principales núcleos secundarios

La identificación de los principales núcleos secundarios representativos de los metabolitos se realizó mediante una serie de pruebas cualitativas que permitieron comparar la diversidad química de los extractos obtenidos de las semillas de las dos especies estudiadas (tabla 1).

	Extracto		S.P.E	S.P.V		Extracto		S.P.E	S.P.V
	Prueba					Prueba			
Polifenoles	Foling-Ciocalteu		+++	+++	Terpenos	Lieberman-Burchard		+++	+++
Cardiotónicos	Baljet		+	+		Salkowski		+++	+++
Antraquinonas	Bornträger		+	+		CCD		+++	+++
Flavonoides	CCD		+++	+++	Alcaloides	Tanred		++	++
	Shinoda		+++	+++		Dragendorff		++	++
Taninos	Cloruro Férrico		+++	+++		Mayer		++	++
Saponinas	Espuma		-	-		Valser		-	-
	Rosenthaler		-	-					

Tabla 1: Tamizaje fitoquímico preliminar extractos crudos de semillas *P. edulis* var. *edulis* (S.P.E) y *P. vitifolia* (S.P.V).

Dónde: (-) indica la no detección del núcleo secundario por esta prueba, (+++) indica la detección del metabolito en altas concentraciones, (++) indica la detección del metabolito en mediana concentración y (+) indica la presencia del metabolito en bajas concentraciones (Murillo y Méndez, 2012).

Los extractos se destacan por la presencia de alcaloides, terpenos, flavonoides y taninos condensados que pueden llegar a cumplir funciones biológicas en la planta tales como reserva de nutrientes y defensa del embrión.

Las semillas de estas dos especies mostraron la presencia de núcleos relacionados estructuralmente con compuestos tales como: flavonoides, taninos, antraquinonas, terpenos, alcaloides, fenoles y antocianinas, según lo indicado por Murillo y Méndez (2012). Lo anterior indica que durante el proceso de secado del material vegetal y los dos métodos de extracción evaluados, estos metabolitos no sufren alteraciones, garantizándose así la calidad de los extractos a evaluar. Además de ello, algunos de los núcleos secundarios que se encontraron en los extractos están relacionados con actividades biológicas como antihipertensiva, antiinflamatoria, antioxidante y antitumoral (Roy & Saraf, 2006).

8.2. Actividad citotóxica de los extractos *in vitro*

8.2.1. Ensayo de MTT

Para poder llevar a cabo la determinación de citotoxicidad de los dos extractos utilizados, se verificó su comportamiento citotóxico frente a células polimorfonucleares humanas (PMNs) las cuales fueron ajustadas a una concentración de 5×10^6 células/mL de muestra, la viabilidad de las células se estableció con respecto a la absorbancia dada por el vehículo al cual se le asigna una supervivencia del 100%; teniendo en cuenta que un extracto es considerado como citotóxico cuando el porcentaje de la viabilidad celular de los tratamientos es inferior al 80% (Rodríguez, Vergel, Ospina, Calle y Pinzón, 2004). Los extractos a las concentraciones evaluadas, no presentaron toxicidad elevada (figura 4; tabla 2) cumpliendo con los parámetros de seguridad planteados por Rodríguez et al; (2004).

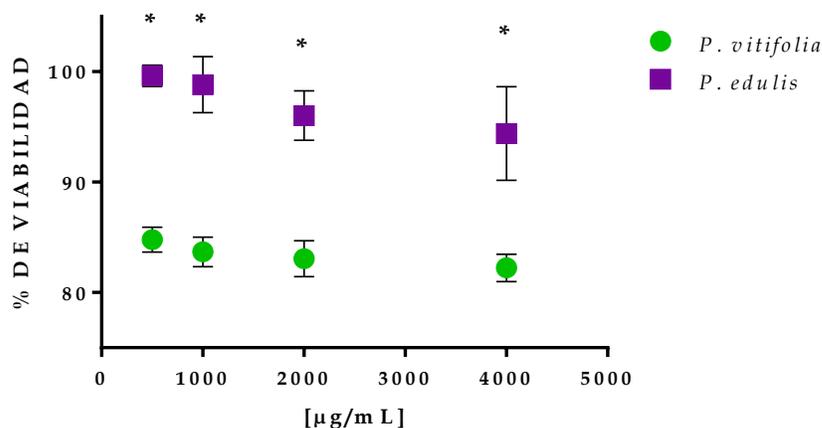


Figura 4: Efecto citotóxico de los extractos frente a PMNs.

Dónde: Cada barra representa la media del % de viabilidad \pm la D.E de cada tratamiento $n=3$. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los extractos.

Tabla 2: viabilidad de las PMNs en presencia de los extractos por el método de MTT.

VIABILIDAD CELULAR (MTT)					
Tratamiento	<i>Passiflora edulis</i>		<i>Passiflora vitifolia</i>		
	[µg/mL]	Absorbancia	%viabilidad	Absorbancia	%viabilidad
Control		0,617 \pm 0,09	100	0,617 \pm 0,09	100
500		0,615 \pm 0,01	99,63 \pm 1,68	0,523 \pm 0,01	84,79 \pm 1,93
1000		0,610 \pm 0,03	98,83 \pm 4,41	0,516 \pm 0,01	83,68 \pm 2,33
2000		0,592 \pm 0,02	96,02 \pm 3,88	0,513 \pm 0,02	83,06 \pm 2,81
4000		0,582 \pm 0,05	94,39 \pm 7,34	0,507 \pm 0,01	82,239 \pm 2,15

Dónde: Cada resultado representa la media \pm la D.E de cada tratamiento $n=3$.

8.2.2. Actividad estabilizante del radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)

Los resultados de la capacidad estabilizante de los extractos etanólicos de las dos passifloras frente al radical DPPH se pueden observar en la figura 5 donde podemos observar que la capacidad del extracto para estabilizar el radical evidenció un comportamiento concentración-dependiente; en la tabla 3, se puede observar la CE_{50} de los extractos que es necesaria para la estabilización del radical con sus respectivos límites de confianza superior e inferior.

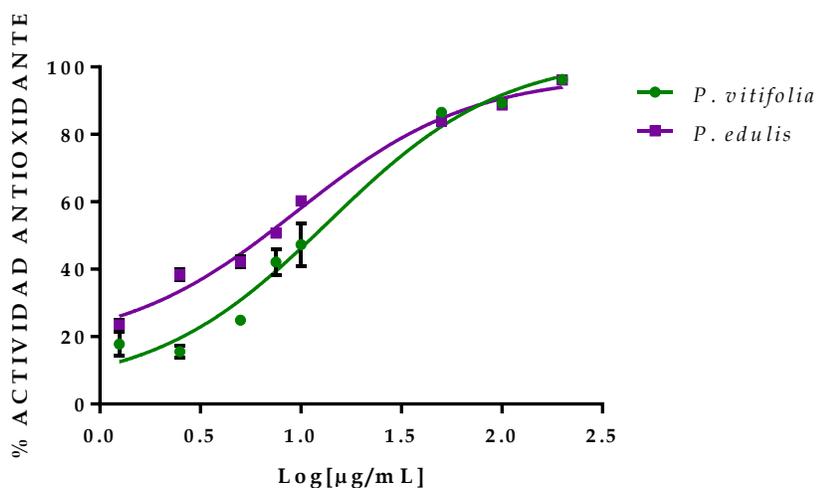


Figura 5: Capacidad antioxidante de los extractos frente al radical DPPH.

Actividad estabilizante del radical DPPH			
Extracto	LogEC ₅₀ (µg/mL)	L.I.	L.S
<i>P. vitifolia</i>	1,14	0,83	1,44
<i>P. edulis</i>	0,98	0,74	1,22
Ácido ascórbico (control +)	0,25	0,23	0,27

Tabla 3: Concentración efectiva media del extracto, frente al radical DPPH.

8.2.3. Actividad estabilizante del radical ABTS (catión del ácido 2,2', azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).

La capacidad de estabilizar el radical ABTS por parte de los extractos se pueden observar en la figura 6, donde se logró demostrar que los extractos de semilla de las dos passifloras presentaron un comportamiento concentración-dependiente; en la tabla 4 se establecen las CE₅₀ de los extractos frente al radical ABTS con sus respectivos límites de confianza superior (L.S) e inferior (L.I).

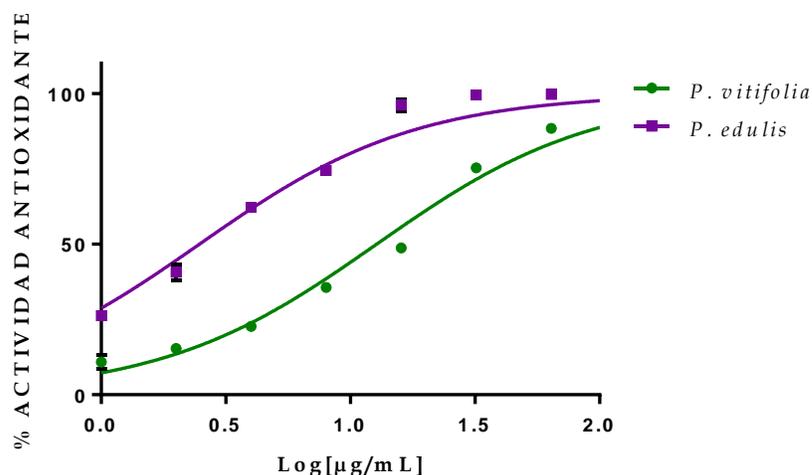


Figura 6: Capacidad antioxidante de los extractos frente al radical ABTS.

Actividad estabilizante del radical ABTS			
Extracto	LogEC ₅₀ (µg/mL)	L.I.	L.S
<i>P. vitifolia</i>	1,62	1,69	1,52
<i>P. edulis</i>	0,41	0,46	0,28
<i>Trolox (Control +)</i>	0,73	1,23	0,24

Tabla 4: Concentración efectiva media del extracto, frente al radical ABTS.

8.3. Evaluación de la actividad Antihipertensiva *in vivo*

El tratamiento realizado con los extractos etanólicos de las semillas de las dos especies permitió realizar diferentes observaciones en los animales; se logró evaluar la toxicidad por parte de los extractos utilizados, esto gracias a que los animales no presentaron síntomas (pérdida de peso, cambios comportamentales y/o mortalidad) con las dosis seleccionadas para la administración de los mismos.

Por otra parte, los extractos administrados presentaron un efecto preventivo del incremento de la presión arterial de los animales posterior a la administración del L-NAME (figura 7), donde se logra observar que los valores de PAS de los animales no se alteraron posterior a la administración del L-NAME, resultado que se puede contrastar con la PAS de los animales control la cual aumentó significativamente ($p < 0.0001$) con respecto a los animales tratados con los extractos, el enalapril y los vehículos.

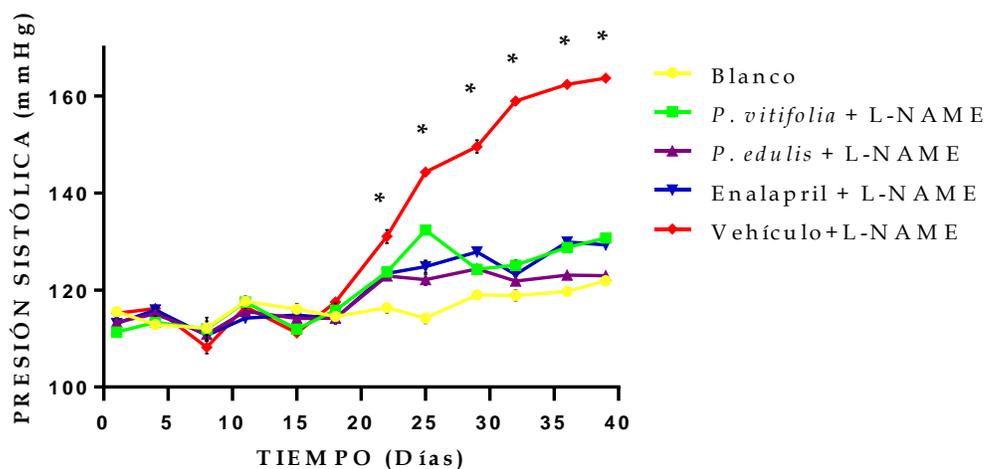


Figura 7: Potencial antihipertensivo de los extractos sobre la presión arterial sistólica de ratas hipertensas inducidas por L-NAME.

Dónde: cada punto representa la media de la PAS de cada grupo tratado ($n=6$) \pm el (e.m.s); los asteriscos indican diferencias ($p \leq 0,0001$) entre el grupo tratado con L-NAME y los grupos tratados con los extractos, enalapril y vehículo.

Las diferencias de presión entre los tratamientos realizados fueron comparadas mediante una Anova de dos vías con múltiples comparaciones la cual se puede observar en la siguiente tabla (tabla 5) donde se logran evidenciar diferencias significativas ($p < 0.0001$) a partir del día 22 del tratamiento entre el L-NAME, los extractos, el enalapril y el blanco y hasta dar por finalizado los ensayos de medición de la presión (día 39).

Tratamiento	DÍA											
	1	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39
Blanco	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>P. edulis</i>	a	a	a	a	a	a	b	b	b	a	a	a
Enalapril	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b
<i>P. vitifolia</i>	a	a	a	b	b	a	b	c	b	ab	b	b
Vehículo	a	a	b	c	c	a	c	d	c	c	c	c

Tabla 5 Comparación de la PAS entre los diferentes tratamientos por día
Dónde: Las letras iguales representan similitud entre los resultados y letras diferentes representan diferencias significativas ($p \leq 0,001$) entre los grupos por día.

8.4. Evaluación de la actividad vasodilatadora *In vitro*

8.4.1. Efecto relajante de los extractos etanólicos de semillas de *P. edulis* var. *edulis* y *P. vitifolia* sobre la contracción ejercida por fenilefrina (FE 10^{-6} M) y KCl (80mM).

Los extractos de las dos semillas presentaron efecto relajante en anillos íntegros contraídos con FE (1×10^{-6} M) y KCl (80mM) figura 8, siendo mayor la relajación (E_{max}) en los anillos tratados con el extracto de *P. edulis* precontraídos con FE y KCl, que la relajación dada por *P. vitifolia*; se logró evidenciar un efecto relajante mayor por parte de los dos extractos en los anillos precontraídos con FE encontrando diferencias significativas entre las CE_{50} y el efecto máximo ($E_{máx}$) de los tratamientos y los compuestos utilizados para contraer los anillos (tabla 6).

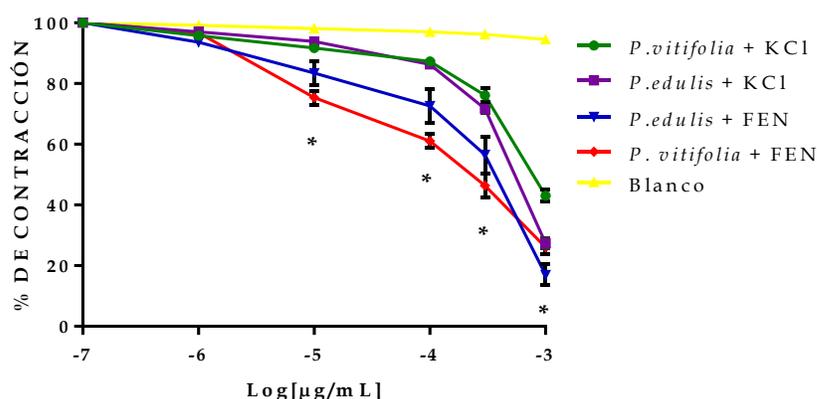


Figura 8: Relajación ejercida por los extractos en anillos de aorta contraídos con FE (10^{-6} M) y KCl (80 mM).

Dónde: Cada punto representa el promedio \pm e.m.s. de 6 anillos; (*), representan diferencias ($P \leq 0,05$) entre la relajación de los anillos precontraídos con KCl y FE.

Tratamiento	CE_{50}	L.I. CE_{50}	L.S. CE_{50}	E_{MAX} (%) \pm e.m.s	Anova
<i>P. vitifolia</i> KCl	$3,38 \times 10^{-3}$	$1,23 \times 10^{-4}$	$2,19 \times 10^{-2}$	$56,96 \pm 1,99$	a
<i>P. edulis</i> KCl	$3,33 \times 10^{-3}$	$5,05 \times 10^{-4}$	$2,19 \times 10^{-2}$	$72,59 \pm 1,53$	b
<i>P. edulis</i> FE	$8,80 \times 10^{-4}$	$7,13 \times 10^{-5}$	$1,09 \times 10^{-2}$	$83,05 \pm 3,43$	c
<i>P. vitifolia</i> FE	$1,58 \times 10^{-4}$	$4,86 \times 10^{-5}$	$5,15 \times 10^{-2}$	$73,97 \pm 2,11$	b
Blanco	-	-	-	$5,47 \pm 1,1$	d

Tabla 6: Concentración efectiva media (CE_{50}) y efecto máximo de relajación (E_{max}) de los extractos en anillos precontraídos con KCl y FE.

Dónde: letras iguales representan similitud y letras diferentes representan diferencias significativas ($p \leq 0,001$) entre los E_{max} .

8.4.2. Efecto relajante de acetilcolina (ACh) sobre anillos de aorta de ratas hipertensas tratadas con los extractos.

Se comparó la relajación causada por la acción acumulativa de ACh sobre anillos aislados de aorta de ratas hipertensas tratadas con los extractos, frente a la relajación provocada en anillos de ratas normotensas (figura 9). Se observó que la relajación disminuye respecto a la relajación provocada por ACh en anillos de aorta aislados de la rata control; sin embargo los anillos aislados de ratas tratadas con los extractos presentaron una relajación mayor que los aislados de ratas tratadas con enalapril y ratas hipertensas.

Debido a que la relajación por ACh en los anillos aislados de aorta de ratas tratadas no superó el 50% de relajación, no se logró determinar la CE_{50} de relajación en estos anillos; pero al realizar el anova, se logró evidenciar que no se presentaron diferencias significativas entre la relajación de los anillos de aorta de la rata normal y la rata tratada con el extracto de *P. edulis* (tabla 7)

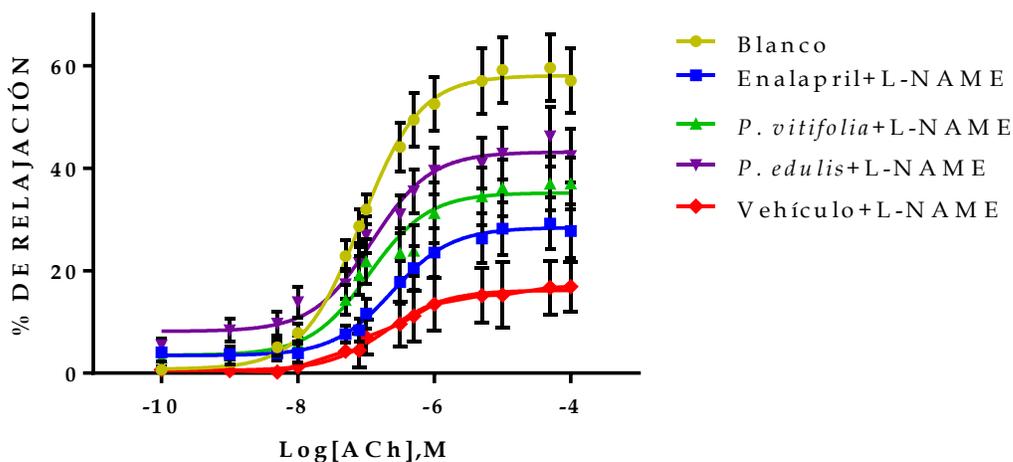


Figura 9: Comparación del efecto relajante de acetilcolina (ACh) en anillos de aorta de ratas hipertensas tratadas con los extractos. Dónde: Cada punto en la figura representa el promedio \pm e.m.s. de 6 anillos.

Tratamiento	CONCENTRACIÓN [μ M]													
	1×10^{-4}	1×10^{-3}	5×10^{-3}	1×10^{-2}	5×10^{-2}	8×10^{-2}	1×10^{-1}	3×10^{-1}	5×10^{-1}	1	5	10	50	100
Blanco	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>P. edulis</i>	a	a	a	a	a	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
Enalapril	a	a	a	a	a	b	bc	bc	bc	bc	bc	bc	bc	bc
<i>P. vitifolia</i>	a	a	a	a	a	ab	abc	bc	bc	bc	b	b	b	b
Vehículo	a	a	a	a	a	b	c	c	c	c	c	c	c	c

Tabla 7 Comparación de la relajación por ACh en anillos de ratas hipertensas tratadas con los extractos.

Dónde: letras iguales representan similitud entre los resultados y diferentes representan diferencias ($p \leq 0,005$) entre los grupos por concentración de ACh.

8.4.3. Efecto relajante de nitroprusiato (NP) sobre anillos de aorta de ratas hipertensas tratadas con los extractos.

Al igual que con ACh se realizó la comparación de la relajación causada por concentraciones acumulativas de NP sobre anillos aislados de aorta de ratas hipertensas tratadas con los extractos, frente a la relajación provocada en anillos de ratas normotensas (figura 10). Se observó que la relajación disminuye respecto a la relajación provocada por NP en anillos de aorta aislados de la rata control. La adición de concentraciones acumulativas de NP desde 5×10^{-11} M hasta 1×10^{-5} M, evidenció un marcado efecto relajante de todos los anillos, sin embargo en los anillos extraídos de ratas tratadas hipertensas se observa un desplazamiento hacia la derecha de la curva respecto a los anillos de la rata control, provocando que la CE_{50} sea mayor en los tratamientos, pero cuando estos alcanzan la concentración mayor solo se logró observar una diferencia significativa entre el E_{max} del blanco y el animal hipertenso (tabla 8)

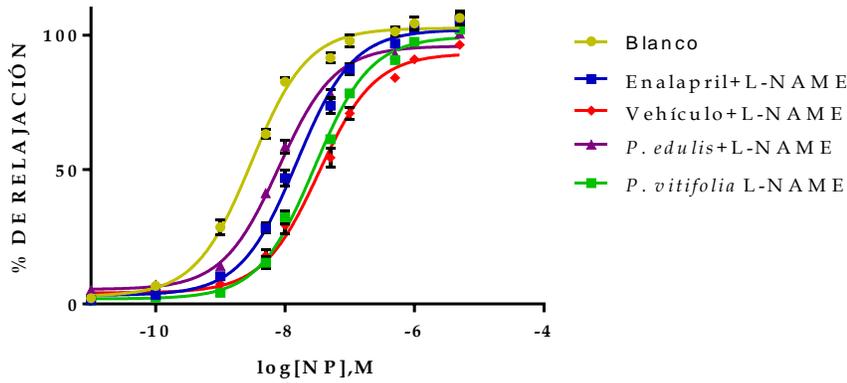


Figura 10: Comparación de la relajación por Nitroprusiato (NP) en anillos de aorta aislados de ratas hipertensas tratadas con los extractos.

Dónde: Cada punto en la figura representa el promedio \pm e.m.s. de 6 anillos de aorta.

Tratamiento	CE ₅₀	L.I. CE ₅₀	L.S. CE ₅₀	E _{MAX} (%) \pm e.m.s	Anova
Vehículo	-8,52	-8,58	-8,45	106,39 \pm 2,54	a
Enalapril + L-NAME	-7,82	-7,89	-7,75	105,74 \pm 1,99	a
<i>P. vitifolia</i> + L-NAME	-7,55	-7,61	-7,49	102,03 \pm 1,43	ab
<i>P. edulis</i> + L-NAME	-8,10	-8,15	-8,04	100,51 \pm 0,50	ab
L-NAME	-7,48	-7,56	-7,40	96,42 \pm 032	b

Tabla 8: Concentración efectiva media (CE₅₀) y efecto máximo de relajación (E_{max}) por NP en anillos de aorta aislados de ratas hipertensas tratadas con los extractos.

Dónde: letras iguales representan similitud entre los resultados y diferentes representan diferencias ($p \leq 0,005$) entre los E_{max} generados por NP en los anillos de cada tratamiento.

8.5. Mecanismo de acción de los extractos etanólicos.

8.5.1. Relajación en presencia de L-NAME

La acción relajante de los extractos etanólicos de semillas de las dos passifloras en anillos de aorta íntegros precontractados con FE (10^{-6} M) e incubados con L-NAME (100 μ M) fue parcialmente revertida en comparación con la relajación en anillos sin presencia de L-NAME (figura 11)

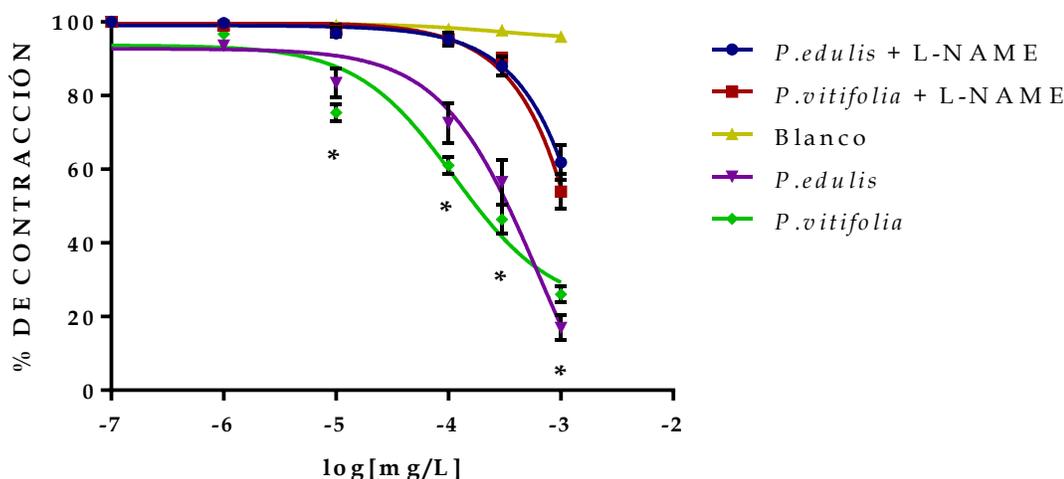


Figura 11: Relajación de los extractos en anillos de aorta contraídos con FE (10^{-6} M) en presencia y ausencia de L-NAME ($100 \mu\text{M}$).

Dónde: Cada punto representa el promedio \pm e.m.s. de 6 anillos; (*) representan diferencias ($P \leq 0,05$) entre los tratamientos en presencia y ausencia de L-NAME.

Se encontraron diferencias significativas entre los efectos máximos de relajación de los extractos en presencia y ausencia de L-NAME y debido a que los extractos en presencia de L-NAME no superaron el 50% relajación de los anillos, no se logró calcular su CE_{50} (tabla 9).

Tratamiento	LogIC ₅₀	L.I. IC ₅₀	L.S. IC ₅₀	E _{MAX} (%) \pm e.m.s	Anova
<i>P. vitifolia</i>	-3,95	-4,93	-2,96	73,97 \pm 2,11	a
<i>P. edulis</i>	-3,19	-4,03	-2,36	83,05 \pm 3,43	a
<i>P. edulis</i> + L-NAME	-	-	-	38,16 \pm 4,74	b
<i>P. vitifolia</i> + L-NAME	-	-	-	46,02 \pm 4,76	b
blanco	-	-	-	4,01 \pm 0,40	c

Tabla 9: Concentración efectiva media (CE_{50}) y efecto máximo de relajación (E_{max}) de los extractos en anillos de aorta precontraídos con FE (10^{-6} M) en presencia y ausencia de L-NAME ($100 \mu\text{M}$).

Dónde: Letras iguales representan similitud entre los resultados y letras diferentes representan diferencias significativas ($p \leq 0,005$) entre los E_{max} en presencia y ausencia de L-NAME.

8.5.2. Relajación de anillos de aorta en presencia de Atropina, Indometacina, Propanolol y Azul de metileno

La acción relajante de los extractos etanólicos de semillas de las dos passifloras en anillos de aorta íntegros precontraídos con FE (10^{-6} M) e incubados con Atropina ($30 \mu\text{M}$), indometacina ($1 \mu\text{M}$), propanolol ($1 \mu\text{M}$) y azul de metileno ($1 \mu\text{M}$), no

evidenció diferencias significativas con respecto a la relajación provocada por los mismos extractos en ausencia de estos compuestos (anexo 4).

Los efectos máximos (E_{max}) de los extractos así como las concentraciones efectivas 50 (CE_{50}) en presencia de atropina, indometacina, propranolol y azul de metileno, no presentaron diferencias significativas siendo similares al efecto provocado por los extractos en ausencia y presencia de dichos compuestos.

8.5.3. Efecto inhibitorio de los extractos etanólicos de *P. edulis* y *P. vitifolia* sobre la contracción ejercida por angiotensina-II (AT-II) en anillos íntegros precontraídos con KCl 80mM.

Los extractos etanólicos de las dos especies lograron inhibir la contracción producida por las concentraciones acumulativas de AT-II en anillos de aorta íntegros, sin embargo, se logra observar que el extracto de *P. edulis* a las dos concentraciones probadas (30 y 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) presentó un mayor efecto antagónico sobre los receptores AT-II que el extracto de *P. vitifolia* (figura 12).

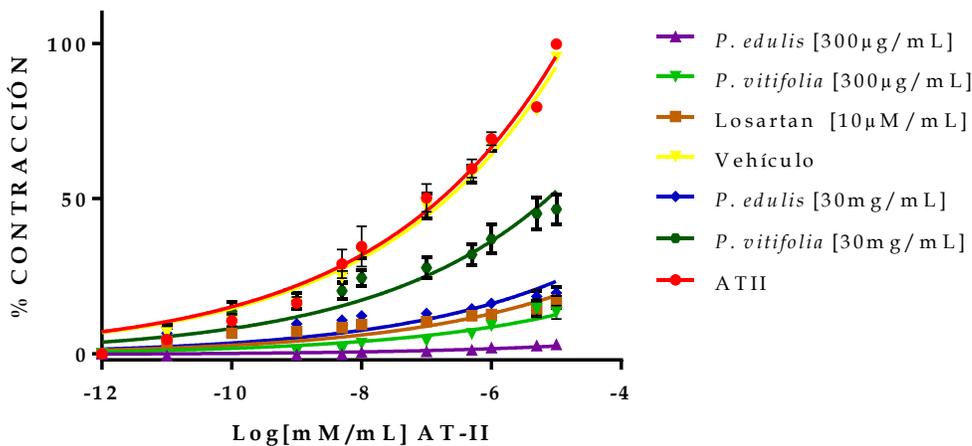


Figura 12: Comparación entre la contracción ejercida por Ang-II sobre anillos de aorta íntegros en presencia y ausencia de los extractos, losartan y vehículo.

Dónde: cada punto representa la media \pm el e.s.m. de seis anillos de aorta.

Al realizar la contracción de los anillos mediante concentraciones acumulativas de Ang-II en anillos incubados con los extractos, se evidenció un efecto concentración respuesta de los mismos siendo *P. edulis* el extracto que presentó una mayor

inhibición de la Ang-II; se logró comparar el efecto de los extractos contra el Losartan (antagonista de la Ang-II) obteniendo resultados similares a los del fármaco (figura 13)

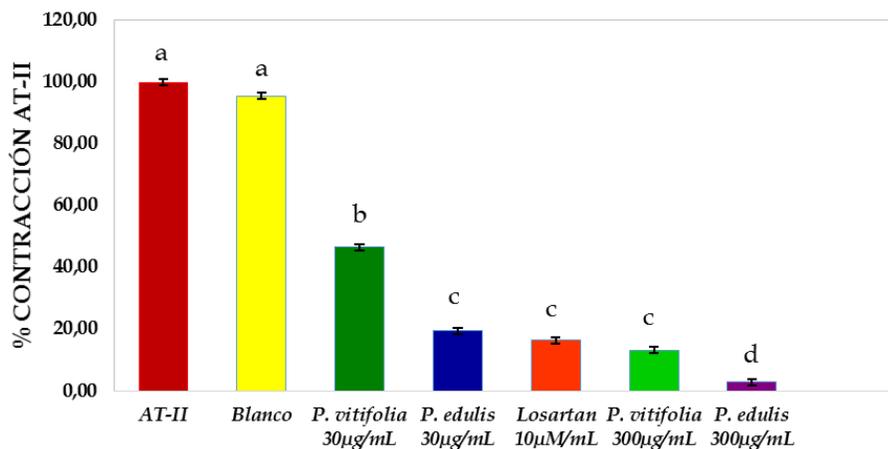


Figura 13: Comparación del efecto máximo (E_{max}) de contracción por AT-II, en presencia y ausencia de los extractos, losartan y vehículo.

Dónde: letras iguales representan similitud entre los resultados y letras diferentes representan diferencias significativas ($p \leq 0,005$) entre los E_{max} de la AT-II en presencia de los tratamientos.

9. DISCUSIÓN

9.1. Identificación de los principales núcleos secundarios

El tamizaje fitoquímico preliminar indicó la presencia de diferentes núcleos secundarios tales como alcaloides, compuestos polifenólicos, taninos entre otros, muchos de los cuales son reportados en otras investigaciones con especies de passifloras donde han sido utilizados para la identificación quimiotaxonómica de la familia, sin embargo, la mayoría de los reportes se realiza a extracciones obtenidas de las hojas y no a los residuos agroindustriales de sus frutos (Sakalem et al., 2012).

Los grupos secundarios identificados en los extractos han sido reportados con diferentes actividades biológicas, entre ellos se logró determinar la presencia de compuestos polifenólicos los cuales se conocen por su potencial estabilizante de radicales libres y son utilizados por las plantas como protección a diferentes factores tales como radiación UV, ataque de animales, hongos y bacterias entre otros (Stevenson y Hurst, 2007).

Los compuestos de naturaleza polifenólica han sido ampliamente reportados como uno de los principales grupos en la estabilización de radicales libres, esta capacidad se encuentra relacionada con el potencial que estos tienen para la captación de especies reactivas de oxígeno, superóxido, peróxido, hidroxilo, hipocloroso entre otras, las cuales se desencadenan de procesos fisiológicos tales como inflamación, aterosclerosis, accidentes cerebrovasculares, carcinogénesis y el envejecimiento (Lambert, Sang y Yang, 2007).

Los alcaloides presentes en los extractos de las dos semillas de passifloras también se convierten en un grupo importante en la búsqueda de compuestos con actividad antihipertensiva, ya que algunos alcaloides de los tipos tropano y harmano extraídos de plantas como *Schizantus grahammi* y *Peganum harmala* provocan la disminución de la contractibilidad producida por noradrenalina y fenilefrina (Chao, Yin, Jane, Fei y Fu, 1999; Ortillo, 2002; Gottschalk, 2003).

9.2. Actividad citotóxica de los extractos *in vitro*

9.2.1. Ensayo de MTT

Los ensayos de citotoxicidad son el paso inicial para la realización de screening farmacológicos a moléculas o extractos, a los cuales se les desea conocer su potencial farmacológico, ya sea como posibles principios de fármacos, cosméticos o suplementos alimentarios, esto debido a que se debe demostrar su inocuidad.

En la evaluación de la citotoxicidad de los extractos etanólicos de las semillas de las dos passifloras estudiadas, frente a la viabilidad de células PMNs humanos, éstos no presentaron un comportamiento citotóxico frente a las células a las concentraciones utilizadas (figura 4, tabla 2) ya que con todas se observó una viabilidad mayor al 80%, con una desviación menor al 20% (Rodríguez et al., 2004); sin embargo, al realizar una comparación entre los extractos se encontró que la viabilidad obtenida con el de semillas de *P. edulis* fue mayor ($p \leq 0,05$) que la obtenida con el extracto de semillas de *P. vitifolia* (figura 4). Los resultados obtenidos mediante el ensayo de MTT y la administración de los extractos a los animales en el ensayo de presión *in vivo*, demostraron que los dos extractos no presentan toxicidad, ni generan cambios comportamentales a los animales.

9.3. Actividad Antioxidante

9.3.1. Actividad estabilizante del catión radical ABTS (catión del ácido 2,2', azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).

Los dos extractos presentaron estabilización del radical en dosis-dependiente, sin embargo se logra observar una diferencia significativa ($p \leq 0,05$) entre las CE_{50} de cada extracto siendo menor la de *P. edulis* ($4,03 \pm 0,61 \mu\text{g/mL}$) que la de *P. vitifolia* ($16,15 \pm 0,71 \mu\text{g/mL}$) esta diferencia puede estar relacionada con la concentración de los metabolitos secundarios evaluados, ya que en los dos extractos se observó la presencia de los mismos metabolitos (tabla 1). La actividad estabilizante de los radicales evaluados puede estar relacionada con la presencia de compuestos polifenólicos los cuales han sido ampliamente reportados como los principales compuestos con esta actividad (Salatino, Salatino, & Negri, 2007).

9.3.2. Actividad estabilizante del radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)

Al igual, que con el radical ABTS, los dos extractos permitieron la estabilización del radical DPPH a concentraciones bajas y en concentración-dependiente, sin embargo frente a este radical no se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) al momento de registrar la CE_{50} de los extractos (*P. edulis* ($9,80 \pm 1,34 \mu\text{g/mL}$) y *P. vitifolia* ($10,04 \pm 0,88 \mu\text{g/mL}$)); y al igual con la estabilización del radical DPPH esta actividad podría ser atribuida a la presencia en los extractos de compuestos fenólicos (Olleta, Apaza y Viturro, 2011) así como terpenos (Carreras, Miguel y de Artiñano, 2012) los cuales estructuralmente podrían llegar a presentar características apropiadas para la estabilización de este tipo de radicales; la amplia variedad de metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos de las dos semillas, los proponen como una fuente promisoría de compuestos y su *screening* en diferentes modelos de enfermedades que se encuentran relacionadas al estrés oxidativo.

9.4. Evaluación de la actividad Antihipertensiva *in vivo*

La inducción de la hipertensión mediante la administración intraperitoneal de L-NAME se convierte en un método eficaz para la aparición de la hipertensión en animales de laboratorio. El L-NAME es un inhibidor de la enzima NOs la cual es la encargada de generar óxido nítrico a partir de L-Arginina en el endotelio, lo que a su vez origina vasoconstricción, aumento de renina e hipertensión arterial.

La evaluación de la actividad antihipertensiva *in vivo* de los extractos etanólicos de las dos passifloras, mostró que la presión arterial sistólica de los animales tratados oralmente con los extractos y el enalapril se mantuvo constante durante la administración del L-NAME, observando diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con la presión de los animales tratados únicamente con L-NAME; al realizar una comparación de la PAS de los animales tratados (*P. vitifolia*, *P. edulis* y enalapril) se presentaron diferencias significativas a partir del día 32 de tratamiento entre los animales tratados con *P. edulis* y los tratados con *P. vitifolia* y enalapril, siendo menor la PAS en los animales tratados con *P. edulis* la cual tuvo al finalizar el ensayo

un comportamiento similar al que presentaron las ratas normotensas (figura 5, tabla 5); lo anterior sugiere que los extractos produjeron un efecto comparable e incluso mayor que el inducido por el enalapril el cual es ampliamente reportado en el control de la hipertensión.

El efecto favorable de los extractos podría llegar a ser atribuido a diferentes metabolitos secundarios identificados en los extractos, ya que se encontraron diferentes reportes en los que se indica que compuestos fenólicos y alcaloides generan un efecto hipotensor tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* utilizados para la evaluación de compuestos antihipertensivos (Chao et al, 1999; Carrón et al., 2010; Wang et al., 2014)

9.5. Evaluación de la actividad vasodilatadora *In vitro*

9.5.1. Efecto relajante de los extractos etanólicos de semillas de *P. edulis* var. *edulis* y *P. vitifolia* sobre la contracción ejercida por FE (10^{-6} M) y KCl (80 mM).

La determinación de los efectos relajantes en baño de órganos de los extractos etanólicos de las dos semillas demostró que éstos tienen la capacidad de disminuir los efectos contráctiles provocados por KCl y FE en anillos de aorta aislados de rata. La contracción producida por KCl se establece como un método sencillo para el estudio de nuevos compuestos que puedan llegar a tener propiedades bloqueantes de los canales de Ca^{+2} ya que altas concentraciones de potasio extracelular contraen sostenidamente los anillos de aorta mediante la despolarización de las membranas celulares de músculo liso, lo que a su vez incrementa el flujo de calcio por los canales de Ca^{+} voltaje dependientes tipo L y tipo P, activando la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico (Topouzis, Pelton, y Miller, 1989 (citado por Chaves, 2010)).

En cuanto a la contracción que se logra por efecto de la fenilefrina, ésta produce la activación de los receptores α -adrenérgicos tipo postsinápticos que contraen los anillos mediante dos mecanismos claramente diferenciados; inicialmente se produce contracción física por la liberación de Ca^{+2} que se encuentran en depósitos

intracelulares; esta liberación es mediada por la activación de receptores inositol trifosfato (IP₃); posteriormente se produce contracción lenta y sostenida de los anillos la cual se debe al ingreso de Ca⁺² mediante canales Ca⁺ voltaje dependientes (Tran, Rozec, Audigane y Gauthier, 2009 (citado por Chaves, 2010)).

La relajación inducida por los extractos de las semillas de las dos passifloras sobre anillos precontraídos con ACh y FE presenta un comportamiento concentración-dependiente, presentando un efecto mayor cuando la contracción es producida por FE que cuando esta es causada por KCl, esto sugiere que los efectos relajantes de los extractos pueden estar vinculadas con el movimiento de calcio intracelular que es estimulado por diferentes mecanismos que actúan sobre canales de Ca⁺² voltaje-dependientes (figura 6).

9.5.2. Efecto relajante de acetilcolina (ACh) sobre anillos de aorta de ratas hipertensas tratadas con los extractos.

La estimulación de las células endoteliales con compuestos como ACh activan receptores muscarínicos M₂ y pueden llegar a aumentar la liberación de NO induciendo la disminución de la presión arterial. La determinación del efecto relajante de ACh en anillos de ratas tratadas con L-NAME, enalapril y extractos; evidenció que los tratamientos disminuyen la relajación producida por ACh respecto a ratas normotensas (figura 9) sin embargo se logró evidenciar una relajación dosis-dependiente de su concentración. Al comparar el efecto de la relajación entre tratamientos, se observó que las ratas hipertensas presentaron el menor E_{max} seguidas por las tratadas con enalapril, *P. vitifolia* y *P. edulis*, esta última no presentó diferencias significativas (p≤0,05) en la relajación comparada con los resultados de relajación obtenidos con las ratas normotensas (figura 9, tabla 7).

9.5.3. Efecto relajante de nitroprusiato (NP) sobre anillos de aorta de ratas hipertensas tratadas con los extractos.

El NP actúa como dador exógeno de NO el cual actúa rápidamente como un vasodilatador independiente de la presencia de endotelio. En cuanto a la comparación ejercida por la aplicación de concentraciones-acumulativas de NP en anillos de aorta obtenidos de ratas normotensas y tratadas con L-NAME, los extractos, enalapril y los vehículos y precontractados con FE (10^{-6} M), se logró evidenciar una disminución entre la relajación provocada por NP en los anillos obtenidos de ratas normotensas y los anillos de ratas tratadas; al igual que con la relajación presentada por ACh las ratas hipertensas fueron las que presentaron un menor efecto E_{max} seguidas por las que se trataron con *P. edulis*, *P. vitifolia* y enalapril sin embargo al comparar los resultados con los obtenidos de las ratas normotensas, la relajación máxima de los anillos de las ratas tratadas con los extractos y el enalapril no se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$), mientras que el efecto E_{max} en las ratas hipertensas si presentó diferencias ($p \leq 0,05$) (figura 10, tabla 8).

9.6. Mecanismo de acción de los extractos etanólicos.

9.6.1. Relajación en presencia de L-NAME y azul de metileno.

La evaluación de la síntesis de óxido nítrico mediante la adición de L-NAME al baño de órganos, evidenció que este reduce parcialmente la capacidad relajante de los dos extractos en comparación a la relajación producida en ausencia de este antagonista (figura 11), lo anterior sugiere que el efecto del extracto podría ser en parte endotelio dependiente relacionándolo con la síntesis de óxido nítrico.

Es importante conocer que el NO produce su efecto cuando este activa la enzima Guanilato ciclasa y aumenta la formación de GMPc, por ende se hace necesario evaluar los extractos en presencia de un inhibidor de esta enzima (azul de metileno) y de esta manera determinar si estos actúan a su vez en la vía NO/GMPc (Krumenacker, Hanafy, y Murad, 2004; Underbakke et al., 2014). Al evaluar la

capacidad de relajación de los extractos en presencia de azul de metileno $1\mu\text{M}$, no se logró evidenciar diferencias significativas entre la relajación dada en presencia y ausencia del agonista por parte de los extractos (tabla 10, anexo 4), lo que indica que la vía de acción de los extractos limita su acción a la síntesis de NO.

9.6.2. Relajación en presencia de atropina, indometacina, propanolol.

Los resultados obtenidos en este trabajo, evidenciaron que la incubación previa de los anillos de aorta con estos compuestos no presentó una influencia significativa ($p\leq 0,05$) en la relajación provocada por los dos extractos (tabla 10, anexo 4) lo cual sugiere que su efecto relajante no se encuentra relacionado a estos mecanismos endotelio-dependientes.

9.6.3. Efecto inhibitorio de los extractos etanólicos de *P. edulis* y *P. vitifolia* sobre la contracción ejercida por angiotensina-II (Ang-II) en anillos íntegros precontractados con KCl 80mM.

El efecto de los extractos frente a la contracción ejercida por Ang-II se evaluó en anillos de ratas normotensas los cuales fueron precontractados con KCl (60mM) con el fin de lograr una mayor contracción al momento de adicionar las concentraciones-acumulativas de la angiotensina II y se verificó la integridad de los anillos mediante la adición de ACh ($5.0\cdot 10^{-3}\mu\text{M}$); se realizó una curva de contracción inicial de los anillos con la angiotensina, con el fin de valorar la contracción máxima de cada uno de ellos; los anillos se lavaron hasta obtener nuevamente la contracción basal. El efecto de los extractos frente a la contracción de Ang-II se evaluó mediante la aplicación de los extractos (300 y $30\mu\text{g}/\text{mL}$) y losartan ($10\mu\text{M}$) 15 minutos antes de comenzar la aplicación de las dosis-acumulativas de AT-II, los resultados obtenidos evidenciaron una reducción en la capacidad de contracción de la AT-II (figura 12, figura 13), el efecto demostrado por los extractos presentó una efectividad similar e incluso mayor a la presentada por el Losartan el cual es un antagonista selectivo del receptor AT-I produciendo la reducción de los efectos de la Ang-II.

Los extractos presentaron un comportamiento concentración-respuesta y según los resultados podrían actuar como un posible antagonista de la Ang-II; también se logró evidenciar un mayor efecto ($p \leq 0,05$) del extracto de *P. edulis* que el producido por *P. vitifolia* en las dos concentraciones utilizadas (grafica 13).

10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El análisis fitoquímico preliminar de los extractos permitió evidenciar la presencia de diferentes grupos de metabolitos secundarios (flavonoides, taninos, antraquinonas, terpenos, alcaloides, fenoles y antocianinas), muchos de los cuales han sido reportados como activos no solo en la evaluación de actividades antihipertensivas sino también en la evaluación de posibles efectos en enfermedades de importancia mundial.

Aunque las metodologías utilizadas para la evaluación de la actividad antioxidante no son concluyentes, los dos extractos permitieron la estabilización de los radicales utilizados a bajas concentraciones, lo que los propone como una posible fuente de compuestos con capacidad antioxidante.

La acción de los extractos sobre células PMNs y los animales utilizados, demostró que estos no presentan una toxicidad evidente a las dosis utilizadas.

Los dos extractos etanólicos previnieron la aparición de la hipertensión inducida por déficit de óxido nítrico, sin embargo se logró evidenciar que las semillas de *P. edulis var. edulis* presentaron un efecto mayor el cual al finalizar el ensayo permitió comparar los resultados de presión con los obtenidos de animales normotensos.

Los posibles mecanismos de acción de los extractos estudiados se encuentran principalmente relacionados a la síntesis de óxido nítrico y antagonismo de la angiotensina II.

El fraccionamiento de los extractos y la identificación de los metabolitos secundarios presentes, mediante técnicas más robustas, permitiría realizar una identificación de los compuestos encargados de la actividad antihipertensiva.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abourashed, E., Vanderplanck, J. y Khan, I. (2002). High-speed extraction and HPLC fingerprint of medicinal plants I. Application to *Passiflora* flavonoids. *Pharm Biol* 40: 81-91.
- Agronet (2010). Evaluaciones Agropecuarias - Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural: análisis y estadísticas. Recuperado el 10 de octubre de 2011, en <http://www.agronet.gov.co/agronetweb/AnalisisEstadisticas/tabid/73/Default.aspx>.
- Aguillón, J., Maldonado, M., Loango, N., Arango, S. y Landázuri, P. (2013). Actividad antioxidante y antiproliferativa de extractos etanólicos y acuoso de las hojas y el jugo del fruto de *Passiflora edulis*. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 15(1), 13.
- Angulo, C. (2009). *Gulupa (Passiflora edulis var. edulis Sims)*. Bogotá: Bayer CropScience, p.28.
- Badyal, K., Lata, H. y Dadhich, A. (2003). Animal models of hypertension and effect of drug. *Indian Journal of Pharmacology*. 35 : 349-362.
- Bareño, L. (2015) Estudio de la actividad antihipertensiva de *Passiflora quadrangularis* L en ratas con hipertensión inducida por déficit de óxido nítrico. (Tesis de maestría) Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Blois, M. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200.
- Brown, S. (2006). Fisiopatología de la hipertensión arterial sistémica. En: Ettinger, S. y Feldman, E. (2007). *Tratado de medicina veterinaria: enfermedades del perro y gato*. 6ª editorial El sevier, Madrid, España, Pp 472-476.

-
- Brunton, L., Lazo, J., Parker, K. (Ed.). (2006). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11th ed. New York: McGraw Hill, p 789-800.
- Cárdenas, P., Aragón, D., Ospina, L., Isaza, G. y Pérez, J. (2012). Efecto de algunas especies vegetales antiinflamatorias sobre la actividad enzimática de elastasa y mieloperoxidasa. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 41(2), 157-168.
- Carreras, N., Miguel, M. y de Artiñano, M. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*, 32(3), 81-91.
- Carrero, J., Bautista, E., Baró, L., Fonollá, J., Jiménez, J., Boza, J. y López, E. (2005). Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. *Nutrición Hospitalaria*. 20. 63 - 69.
- Carrón, R., Sanz, E., Puebla, P., Martín, M., San Roman, L. y Guerrero, M. (2010). Mechanisms of relaxation induced by flavonoid ayanin in isolated aorta rings from Wistar rats. *Revista Colombia Médica*. 41. 10-16.
- Castillo, C. (2002). Evaluación del efecto inhibitorio del tono muscular de alcaloides tipo tropano presente en *Schizanthus hookeri* sobre íleon de rata. Memoria de Título, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- Champion, H., Bivalacqua, T., Hyman, A., Ignarro, L., Hellstrom, W. y Kadowitz, P. (1999). Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase to the penis augments erectile responses in the aged rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(20), 11648-11652.

-
- Chao Shi, C., Ying Chen, S., Jane Wang, G., Fei Liao, J. y Fu Chen, C. (1999). Vasorelaxant effect of harman. *European Journal of Pharmacology*. Volumen. 390. 319-325.
- Chaves, N. (2010). Effects of *Croton schiedeanus* extract on nitric oxide production in the preparation of isolated aortic rings (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).
- Contreras, J., Calderón, L., Guerra, E. y García, B. (2011). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, 44(7), 2047-2053.
- Cushman, D., Cheung, H., Sabo, E. y Ondetti, M. (1981). Angiotensin converting enzyme inhibitors: evolution of a new class of antihypertensive drugs. Ed. The Squibb Institute for Medical Research, Princeton, New Jersey.
- Dhawan, K., Dhawan, S. y Sharma, A. (2004). *Passiflora*: as review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 94:1-23.
- Dominguez, X. (1973). Métodos de investigación fitoquímica. Ed. Limusa. México.
- Estrada, A. y Rodríguez, A. (2009). Flores de pasión de Costa Rica. Santo Domingo de Heredia, C.R., Editorial INBio.
- FitzGerald, R., Murray, B. y Walsh, D. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *Journal of Nutrition* 134, 980s-988s.
- Goldblatt, H., Lynch, J., Hanzal, R. y Summerville, W. (1934). Studies on experimental hypertension: I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *The Journal of Experimental Medicine*, 59(3), 347.
- Gottschalk, C. (2003). Evaluación de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii* sobre la actividad contráctil de aorta de rata.

Memoria de Título, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.

- Granados, C., Yáñez, X. y Santafé, G. (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, 10(1).
- Guyton, A. y Hall, J. (2001). Tratado de Fisiología Médica. 10a editorial Interamericana Mc Graw-Hill, Ciudad de México, México.
- Guyton, A. y Hall, J. (2011). Regulación nerviosa de la circulación y control rápido de la presión arterial (cap. 18). Función dominante de los riñones en el control a largo plazo de la presión arterial y en la hipertensión: el sistema integrado de regulación de la presión arterial (cap. 19). In: Tratado de Fisiología Médica (12a Edition). Ed. S.A. El sevier, España, 191-211
- Hernandez, B., Lourdes, R. y Isidra, M. (2002). Caracterización y bioactividad de péptidos obtenidos a partir de proteínas lácteas mediante hidrolisis enzimática y procesos fermentativos (No. 577.1). e-libro, Corp.
- Isaacs, M. (2009). Mercados nacionales e internacionales de las frutas pasifloráceas, cultivo, postcosecha y comercialización de las passifloráceas en Colombia: Maracuyá, Granadilla, Gulupa y Curuba. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas. Bogotá. pp358.
- Jauhiainen, T. y Korpela, R. (2007). Milk peptides and blood pressure. Journal of Nutrition 137, 825S-829S.
- Jiménez, A., Rodríguez, L., Murillo, W., Méndez, J. & Rueda, E. (2013). Antifeedant activity of secondary metabolites of citrus waste on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Revista Colombiana de Entomología, 39(1), 113.

-
- Krumenacker, J., Hanafy, K. y Murad, F. (2004). Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Research Bulletin*, 62(6), 505-515.
- Lambert, J., Sang, S. y Yang, C. (2007). Possible controversy over dietary polyphenols: benefits vs risks. *Chem Res Toxicol* 20, 583-585.
- Leong, X., Ng, C. y Jaarin, K. (2015). Animal models in cardiovascular research: hypertension and atherosclerosis. *BioMed Research International*, 2015.
- Lorenzo, P., Moreno, A., Leza, J., Lizasoain, I., Moro, M. y Portolés, A. (2008). *Farmacología Básica y Clínica (18ª edición)* Editorial Médica Panamericana, pág. 73-78.
- Lüllmann, Mohr & Hein. (2010). *Farmacología: Texto y Atlas*. Editorial Médica Panamericana. Madrid. España.
- Majumder, K. y Wu, J. (2014). Molecular targets of antihypertensive peptides: Understanding the mechanisms of action based on the pathophysiology of hypertension. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 256-283.
- Mancia, G., Fagard, R., Narkiewicz, K., Redón, J., Zanchetti, A., *et al.* (2013). Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Journal of Hypertension* 31, 1281-1357.
- Manzini, J. (2000). Declaración de Helsinki: Principios éticos para la investigación médica sobre sujetos humanos. *Acta bioethica*, 6(2), 321-334.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: 72 application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63.

-
- Murillo, E. y Méndez, J. (2012). Guía rápida para la determinación de núcleos secundarios en extractos vegetales. Universidad del Tolima.
- Ocampo, J., Coppens, G. y Jarvis, A. (2010). Distribution of the genus *Passiflora* L. diversity in Colombia and its potential as an indicator for biodiversity management in the Coffee Growing Zone. *Diversity*. (11):1158- 1180.
- Ocampo, J., Coppens, G., Restrepo, M., Jarvis, A., Salazar, M. y Caetano, C. (2007). Diversity of Colombian Passifloraceae: biogeography and an updated list for conservation. *Biota Colombiana*, 8(1): 1-45.
- Olleta, A., Apaza, A., y Viturro, C. (2011). Evaluación de la relación estructura-actividad antioxidante de terpenos de *Tagetes minuta* de jujuy por métodos computacionales.
- Oparil, S. y Haber, E. (1974). The renin-angiotensin system (first of two parts). *The New England Journal of Medicine* 291, 389-401.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2013). A global brief of hypertension; silent killer, global public health crisis. World Health Day 2013. World Health Organization.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2015). Prevención de las enfermedades crónicas: Una inversión vital. Recuperado el 7 de febrero de 2017 de la Word Wide Web: http://www.who.int/chp/chronic_disease_report/overview_sp.pdf.
- Ortiz, D. (2010). Estudio de la variabilidad genética en materiales comerciales de gulupa (*Passiflora edulis f. edulis* Sims) en Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Tesis de doctorado en Ciencias Agrarias.
- Pamplona, R. (2007). Enciclopedia de las plantas medicinales. 2ª ed. Sudamericana, Florida.

-
- Pérez, J. y d'Eeckenbrugge, G. (2017). Morphological characterization in the genus *Passiflora* L.: an approach to understanding its complex variability. *Plant Systematics and Evolution*, 303(4), 531-558.
- Perry, N., Alberston, G., Blunt, J., Cole, A. y Munro, M. (1991). 4.4-Hydroxy-2-cyclopentenone an antipseudomonas and cytotoxic component from *Passiflora tetrandra*. *Planta Medica*, 57 (2), 129-131.
- Pinzón, I., Fischer, G. y Corredor, G. (2007). Determinación de los estados de madurez del fruto de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims.). *Agronomía Colombiana*, 25(1), 83-95.
- Ramírez, J., Palacios, M. y Gutiérrez, O. (2006). Estudio del efecto antihipertensivo de *Salvia scutellarioides* en un modelo de ratas hipertensas. *Colombia Médica* 37.
- Remillard, R. y Wynn, S. (2006). Fitomedicina. En: Ettinger, S. y Feldman, E. (2007). Tratado de medicina veterinaria: enfermedades del perro y gato. 6ª editorial Elsevier, Madrid, España, pp 524-527.
- Rodríguez, J., Gómez, J., Núñez, A., Rico, L., Fortes, J., de Andrés, R., Cabestrero, F., Farré, J., Casado, S. y López, A. (2001). Doxazosina y guanilato ciclasa soluble en un modelo de ratas hipertensas. *Revista Española de Cardiología* 54, 880-886.
- Rodríguez, M., Vergel, N., Ospina, L., Calle, J. y Pinzón, R. (2004). Evaluación de actividades enzimáticas elastasa y mieloperoxidasa como marcadores de desgranulación leucocitaria en modelos de inflamación aguda. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*, 34 (1), 35-45.
- Rojas, J. (2009). Estudio preclínico y clínico de la seguridad y actividad antihipertensiva de *Passiflora edulis* Sims (maracuyá). Memoria para optar al

-
- título de Doctor en Farmacia y Bioquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Roy A. y Saraf S. (2006). Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. *Biol. Pharm. Bull.* 29(2) 191-201.
- Rudnicki, M., Oliveira, M., Pereira, T., Reginatto, F., Dal, F. y Moreira, J. (2007). Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. *Food Chemistry*, 100, 719-724.
- Sakalem, M., Negri, G. y Tabach, R. (2012). Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(6), 1219-1232.
- Salatino, A., Salatino, M. y Negri, G. (2007). Traditional uses, chemistry and pharmacology of croton especies (Euphorbiaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, 18: 11-33.
- Sánchez, W., Murillo, E., y Méndez, J. (2010). Potencial antioxidante de residuos agroindustriales de tres frutas de alto consumo en el Tolima. *Scientia et Technica*, 3(46), 138-143.
- Segura, L., Agusti, R. y Parodi, J. (2006). Factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares en el Perú. *Revista Peruana de Cardiología*. Volumen 32, 82-128.
- Sharma, P., Vyawahare, N. y Ladhha, A. (2010). Preclinical screening models for hypertension in rodents: A review. *Pharmacology Online*. Volumen 3, 458-472.
- Souza, V. y Lorenzi, H. (2005). *Botânica Sistemática. Guia ilustrada para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Editora Plantarum. Nova Odessa, San Pablo, Brasil. 640 p.

-
- Stevenson, D. y Hurst, R. (2007). Polyphenolic phytochemicals- just antioxidant or much more. *Cell Mol Life Sci* 64(22), 2900-2916.
- Topouzis, S., Pelton, J. y Miller, R. (1989). Effects of calcium entry blockers on contractions evoked by endothelin-1,[Ala3, 11] endothelin-1 and [Ala1, 15] endothelin-1 in rat isolated aorta. *British Journal of Pharmacology*, 98(2), 669-677.
- Torres, M., Ibáñez, P. y Pabón, M. (2012). Vasodilatación inducida por *Croton schiedeanus* Schlecht vinculada con la ruta metabólica de guanilato ciclasa. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 41(1), 36-39
- Torruco, J., Domínguez, M., Dávila, G., Martínez, A., Chel, L., y Betancur, D. (2008). Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: una revisión. *Cyta-Journal of Food*, 6(2), 158-168.
- Tran, T., Rozec, B., Audigane, L. y Gauthier, C. (2009). Investigation of the different adrenoceptor targets of nebivolol enantiomers in rat thoracic aorta. *British Journal of Pharmacology*, 156(4), 601-608.
- Underbakke, E., Iavarone, A., Chalmers, M., Pascal, B., Novick, S., Griffin, P., y Marletta, M. (2014). Nitric oxide-induced conformational changes in soluble guanylate cyclase. *Structure*, 22(4), 602-611.
- Vanvliet, N., Chafe, L., Vladan, A., Schnyder, S. y Montani, J. (2000). Direct and indirect methods used to study arterial blood pressure. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. Volumen. 44, 361-373.
- Velázquez, M., Rosas, P., Lara, E., Pastelín, H., Attie, F. y Tapia, R. (2003). Prevalencia e interrelación de las enfermedades crónicas no transmisibles y factores de riesgo cardiovascular en México. *Archivos de Cardiología de México* 73, 62-77

-
- Wang, H., Lu, J., Zhang, G., Li, X., Peng, H., Lu, Y., Zhao, L., Ye, Z., Bruce, I., Xia, Q & Qian, L. (2014). Endothelium- dependent and independent vasorelaxant actions and mechanisms induced by total flavonoids of *Elsholtzia splendens* in rats aortas. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Volumen 38, 453-459.
- Wohlmuth, H., Penman, K., Pearson, T. y Lehmann, R. (2010). Pharmacognosy and chemotypes of passion flower (*Passiflora incarnata* L.). *Biol Pharm Bull* 33: 1015-1018.
- Yockteng, R. y Nadot, S. (2004). Phylogenetic relationships among *Passiflora* species based on the glutamine synthetase nuclear gene expressed in chloroplast (ncpGS). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31(1), 379-396.

12. ANEXOS

Anexo 1: Consentimiento informado para la toma de muestras sanguíneas.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN FARMACOLOGÍA MOLECULAR (FARMOL) Y UNIVERSIDAD DEL TOLIMA GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN PRODUCTOS NATURALES DE LA UNIVERSIDAD DEL TOLIMA (GIPRONUT)

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE, para evaluar la actividad citotóxica y antioxidante en un modelo de células sanguíneas, con extractos obtenidos de subproductos (semillas) de *Passiflora vitifolia* y *Passiflora edulis* var. *edulis*.

DECLARACIÓN DE INFORMACION

El señor: Diego Fernando Montoya Yepes

1. Ha suministrado información acerca de su condición de salud y el consumo de medicamentos.
2. Ha recibido información de la señor **Angel Arturo Jimenez R.** respecto a su propósito de desarrollar estudios de actividad biológica de extractos de semillas de *Passiflora vitifolia* y *passiflora edulis* var. *edulis*.
3. Ha suministrado 5 mL de sangre periférica para tal fin.
4. Ha tenido la libertad de hacer preguntas y estas han sido respondidas adecuadamente con el fin de aclarar sus inquietudes.
5. Ha sido informado de su derecho de declinar su continuidad en este proyecto en el momento en el que lo considere necesario.
6. Ha sido informado acerca de la finalidad y naturaleza de este estudio, que hace parte del desarrollo del proyecto del señor **Angel Arturo Jimenez R.**, en calidad de investigador, que consiste en evaluar nuevas aplicaciones biológicas de esta especie.

Yo consiento que el señor Angel Arturo Jimenez R, en su calidad de investigador, obtenga muestras de sangre suministradas por mí, con el fin de desarrollar su trabajo de tesis, que consiste en **evaluar el potencial antihipertensivo y antioxidante de extractos etanólicos obtenidos de semillas de *Passiflora vitifolia* Kunth y *Passiflora edulis* Sims var. *Edulis***. Así mismo, se me ha explicado que el grado de riesgo existente en este procedimiento es mínimo y que la información obtenida será utilizada únicamente con fines investigativos.

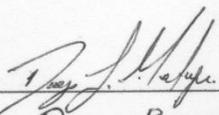
El investigador Angel Arturo Jimenez R, bajo la tutoría del doctor Mario Francisco Guerrero Pabón y codirección del doctor Jonh Jairo Méndez Arteaga, desarrollará su trabajo investigativo en los grupos FARMOL y GIPRONUT; con el fin de aclarar

las dudas o decisiones que con respecto al propósito del presente documento puedan surgir se adjuntan el correo electrónico y número telefónico del investigador.

- Correo electrónico: anajimenezro@unal.edu.co
- Número telefónico móvil: 315 2883242

En constancia a lo anterior firma el donante.

Firma:


Nombre: Diego Fernando Montoya Yepes

C.C. 4.110.545.616

Ciudad y fecha: Ibaqué 15 de Julio de 2016

El testigo

Firma:


Nombre: Luisa Fernanda Velásquez Holguín

C.C. 1110561697 Ibaqué

Ciudad y fecha: Ibaqué, 15 de Julio de 2016

Anexo 2: Aval comité de ética Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia.



COMITÉ DE ÉTICA FACULTAD DE
CIENCIAS

Bogotá, septiembre 13 de 2016

Estudiante
Ángel Arturo Jiménez Rodríguez
Departamento de Farmacia

Respetado Estudiante:

Atentamente le comunico que el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias, en reunión realizada el día 13 de septiembre de 2016 (Acta 16), 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: / Potencial antihipertensivo y antioxidante de extractos etanólicos obtenidos de semillas de *Passiflora vitifolia* Kunth y *Passiflora edulis* Sims var. *edulis*".
Proyecto Tesis de Maestría en Ciencias Farmacéuticas.

Responsables: Ángel Arturo Jiménez Rodríguez (Tesis de Maestría en Ciencias Farmacéuticas), Mario Francisco Guerrero Pabón (Director de Tesis, Grupo de Investigación en Farmacología Molecular – FARMOL) y Jonh Jairo Méndez (Codirector de Tesis, Grupo de Investigación en Productos Naturales de la Universidad del Tolima – GIPRONUT).

Observaciones:

Se emplearán ratas Wistar a las cuales se les inducirá experimentalmente hipertensión con el compuesto L-NAME. La presión arterial se medirá mediante método no invasivo ("manguito en la cola", *tail-cuff*). Se harán pruebas in vitro con anillos de aorta (preparación de órgano aislado) obtenidos de animales sacrificados bajo atmósfera de éter etílico. Los parámetros de citotoxicidad y actividad antioxidante se evaluarán en células de sangre periférica humana, muestras que serán obtenidas de donantes, previa aceptación mediante protocolo de consentimiento informado y bajo las debidas medidas de bioseguridad para estos procedimientos.

El personal participante estará debidamente entrenado en el cuidado y uso de animales de laboratorio, acatando orientaciones contenidas en la Resolución 008430 de 1993 – MSP.

La manipulación de reactivos químicos y biológicos así como la disposición de sus desechos se hará acorde con los protocolos de bioseguridad contemplados en el sistema institucional de gestión ambiental.

Concepto: Avalado.

LUIS FERNANDO OSPINA G.
Coordinador Comité de Ética

Anexo 3: Determinación taxonómica de las plantas utilizadas en este estudio.


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

COL - 373
Bogotá D.C., 07 de septiembre de 2016

Señores
Prof. Mario Francisco Guerrero
Ciudad

Asunto: **Identificación Taxonómica muestras**

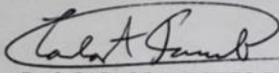
Cordial Saludo,

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 edulis</i> Sims	PASSIFLORACEAE	592023	Angel Arturo Jiménez Rodríguez	1	O. Rivera-Díaz/2016
<i>Passiflora vitifolia</i> Kunth	PASSIFLORACEAE	592024	Angel Arturo Jiménez Rodríguez	2	O. Rivera-Díaz/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 Fabio

Carrera 30 No. 45-03, **INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES**,
"HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)" Edificio 425- 2º piso, Oficina 222
Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext.11538 – 11518 Fax: 11538
Correo electrónico: herbacol_fcbog@unal.edu.co
Bogotá, Colombia, Sur América

Anexo 4: Anexo 4: Relajación de los extractos en anillos de aorta contraídos con FE (10-6 M) en presencia y ausencia de atropina (30 μ M), indometacina (1 μ M), propranolol (1 μ M) y azul de metileno (1 μ M).

