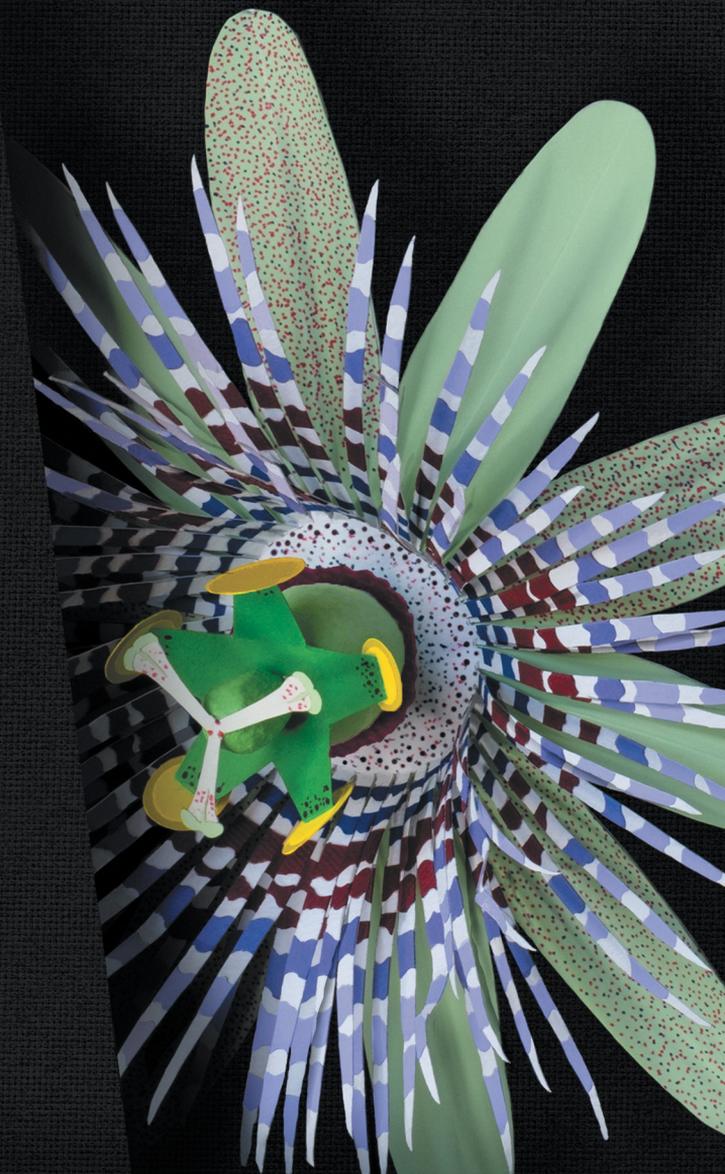


Passiflora ligularis Juss (granadilla)

Diana Marcela
Aragón Novoa
(editora)

Estudios químicos
y farmacológicos
de una planta con
potencial terapéutico



Apoyan

Organiza

Facultad de Ciencias
Departamento de Farmacia



El conocimiento
es de todos

Minciencias



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Colombia



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

***Passiflora ligularis*
Juss. (granadilla):
estudios químicos y
farmacológicos de una
planta con potencial
terapéutico**

Diana Marcela Aragón Novoa (editora)
Profesora titular
Departamento de Farmacia
Universidad Nacional de Colombia

***Passiflora ligularis* Juss. (granadilla): estudios químicos y farmacológicos de una planta con potencial terapéutico**

Diana Marcela Aragón Novoa (editora)
Profesora titular
Departamento de Farmacia
Universidad Nacional de Colombia

Apoyan



El conocimiento
es de todos

Minciencias



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Colombia

Organiza



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Bogotá, D. C., Colombia, 2021

© Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá
© Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Primera edición, agosto 2021

ISBN papel 978-958-794-642-0

ISBN digital 978-958-794-643-7

Edición:

Daniela Guerrero Acosta
Coordinación de publicaciones
Facultad de Ciencias
coopub_fcbog@unal.edu.co

Corrección de Estilo:

Ricardo Camacho Gil

Concepto y diseño de portada:

Jorge Mario Ordóñez Duque

Diseño y diagramación:

Leonardo Fernández Suárez

Impreso en Bogotá, Colombia

Reservados todos los derechos: queda rigurosamente prohibida, sin la autorización escrita de los titulares del Copyright, bajo las sanciones establecidas en las leyes, la reproducción total o parcial de esta obra por cualquier medio o procedimiento comprendidos, la reprografía y el tratamiento informático.

Coautores

- Diana Marcela Aragón Novoa.** Química farmacéutica. Ph. D. Profesora titular, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia.
- Luis Fernando Ospina Giraldo.** Químico farmacéutico. Ph. D. Profesor titular, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia.
- Leonardo Castellanos Hernández.** Químico. Ph. D. Profesor asociado, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia.
- Freddy Alejandro Ramos Rodríguez.** Químico. Ph. D. Profesor asociado, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia.
- Geison Modesti Costa.** Farmacéutico. Ph. D. Profesor asociado, Departamento de Química, Pontificia Universidad Javeriana.
- Fátima Reina Mena Barreto Silva.** Química. Ph. D. Profesora titular, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.
- Fabián López Vallejo.** Químico. Ph. D. Profesor asociado, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia.
- Gabriel Monzón Daza.** Químico farmacéutico. M. Sc. Universidad Nacional de Colombia.
- Carolina Meneses Macías.** Licenciada en Química. M. Sc. Universidad Nacional de Colombia.
- Diana Patricia Rey Padilla.** Química farmacéutica. M. Sc., c. Ph. D. Universidad Nacional de Colombia.
- María Isabel Cardona Paredes.** Química farmacéutica. M. Sc., c. Ph. D. Universidad Nacional de Colombia.
- Sandra Milena Echeverry González.** Licenciada en Química. M. Sc., c. Ph. D. Universidad Nacional de Colombia.
- Paula Michelle Sepúlveda.** Química farmacéutica. Universidad Nacional de Colombia.
- Laura Gómez Devia.** Bióloga. Pontificia Universidad Javeriana.

Agradecimientos

Los autores de este libro agradecemos al Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación (Minciencias), a la Universidad Nacional de Colombia y a la Pontificia Universidad Javeriana por la financiación del proyecto “Estudio de la actividad antidiabética de un extracto nanovehiculizado de hojas de *Passiflora ligularis* (granadilla)”, mediante el Contrato 836/2017 para su ejecución.

A la Universidade Federal de Santa Catarina, por facilitar el uso de sus instalaciones para el desarrollo de algunos de los experimentos presentados en este libro. La profesora Fátima Regina Mena Barreto Silva agradece al CNPq 304051-424 2015/2 y a CAPES.

A los estudiantes de pregrado, maestría y doctorado que participaron en los diseños experimentales, la realización de los ensayos de laboratorio y la redacción de cada uno de los capítulos.

Contenido

Presentación	13
<i>Capítulo 1</i>	
Estudio <i>in silico</i> y evaluación <i>in vitro</i> de la actividad inhibitoria de flavonoides y saponinas identificados en hojas de <i>Passiflora ligularis</i> Juss. sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa	15
<i>Capítulo 2</i>	
Evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso, la fracción butanólica y compuestos identificados en las hojas de <i>Passiflora ligularis</i> Juss.	41
<i>Capítulo 3</i>	
Efecto del extracto acuoso de hojas de <i>Passiflora ligularis</i> Juss. y de sus metabolitos mayoritarios sobre la homeostasis de glucosa	55
<i>Capítulo 4</i>	
Metodologías analíticas para el estudio y cuantificación de flavonoides en extractos de hojas de <i>Passiflora ligularis</i> Juss.	87
<i>Capítulo 5</i>	
Estandarización del extracto de hojas de <i>Passiflora ligularis</i> Juss. (granadilla)	111
Autores	145

Presentación

La investigación interdisciplinaria en el estudio de productos naturales con fines medicinales es la piedra angular para lograr un avance significativo en esta área tan valiosa e importante para nuestro país, el segundo más biodiverso del mundo.

Durante muchos años, se han estudiado las plantas como fuente de principios activos, que han sido aislados y posteriormente sintetizados como fármacos para el desarrollo de medicamentos usados en el tratamiento de diversas patologías; tal es el caso de la artemisinina, la quinina y el ácido salicílico, entre otros.

Sin embargo, en años más recientes, las plantas medicinales se han entendido de una manera más integral, considerando la importancia no solo de los principios activos aislados, sino también del extracto completo como posible ingrediente activo, teniendo en cuenta sus posibles ventajas en términos de acción farmacológica (derivados de efectos en la farmacocinética y la farmacodinamia). De esta forma, llegó también la necesidad de lograr una mejor caracterización de estos extractos con el fin de producir medicamentos seguros, eficaces y de calidad.

Con esto en mente, hace aproximadamente 20 años, el grupo de investigación Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia ha trabajado de la mano con el grupo de investigación Principios Bioactivos de Plantas Medicinales en el estudio químico y farmacológico de posibles compuestos, fracciones y extractos de origen natural con fines terapéuticos. En años más recientes, junto con el Grupo de Investigación en Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana, se ha profundizado en el desarrollo de métodos analíticos que permitan realizar una caracterización completa de la composición del extracto; y ante la necesidad de tener extractos estandarizados y llegar a la propuesta de productos fitoterapéuticos caracterizados, el grupo de investigación Sistemas para Liberación Controlada de Moléculas Biológicamente Activas se ha unido a este equipo de trabajo. Aunque este es el equipo base de un gran número de nuestros trabajos de investigación, siempre hemos contado con el apoyo de otros grupos de investigación a nivel nacional e internacional en áreas complementarias.

Han sido varios los productos marinos y plantas que hemos estudiado en conjunto, principalmente los órganos de plantas frutales que son considerados subproductos o residuos de cosecha, como las hojas de la badea (*Passiflora quadrangularis*), granadilla (*Passiflora ligularis*), gulupa (*Passiflora edulis* var. *edulis*) y curuba (*Passiflora tripartita*), además de los cálices de la uchuva (*Physalis peruviana*). Este libro resume algunos de los avances de investigación realizados por este equipo durante varios años en torno a las hojas de la granadilla (*Passiflora ligularis*). Estudios que se han enfocado a contribuir al desarrollo de un producto fitoterapéutico, en el que estamos avanzando de manera sostenida.

En el capítulo 1 se describe la composición química del extracto de las hojas de *P. ligularis* y se muestra la evaluación *in silico* e *in vitro* de los compuestos mayoritarios de dicho extracto sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa, enzimas intestinales que han sido identificadas como un blanco importante para el tratamiento de la diabetes mellitus.

En el capítulo 2 se muestran los resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso, de la fracción butanólica y de siete compuestos aislados de las hojas de *P. ligularis*. Esta actividad farmacológica fue evaluada teniendo en cuenta que la inflamación es un proceso presente en un gran número de patologías, en especial en síndromes complejos como lo es la diabetes mellitus.

Con base en los estudios químicos y farmacológicos presentados en los primeros dos apartes, en el capítulo 3 se evaluó la actividad hipoglicemiante tanto del extracto acuoso como de los flavonoides mayoritarios presentes en este extracto, lo que condujo a proponer dichos compuestos como los responsables de la actividad hipoglicemiante, elucidando además algunos de sus mecanismos de acción.

Una vez identificados los flavonoides como los compuestos activos (hipoglicemiantes) del extracto evaluado, en el capítulo 4 se desarrollaron dos metodologías analíticas que permitieran la caracterización del extracto y la correcta cuantificación tanto de los flavonoides totales como de los mayoritarios.

Considerando que la investigación presentada en este libro está orientada a contribuir en el desarrollo de un producto fitoterapéutico, y que para esto es necesario tener un extracto completamente caracterizado, el capítulo 5 presenta no solo la obtención de un extracto estandarizado, sino también la optimización de dicho extracto en los compuestos demostrados como activos, con lo cual se corrobora el incremento de la actividad hipoglicemiante respecto a la mostrada por el extracto acuoso evaluado inicialmente.

Diana Marcela Aragón Novoa, Ph. D.
Profesora titular
Departamento de Farmacia
Universidad Nacional de Colombia

Capítulo 1

Estudio *in silico* y evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria de flavonoides y saponinas identificados en hojas de *Passiflora ligularis* Juss. sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa

Gabriel Monzón Daza^a

Diana Marcela Aragón Novoa^b

Freddy Alejandro Ramos Rodríguez^c

Leonardo Castellanos Hernández^d

Fabián López-Vallejo^e

- a. Químico farmacéutico. *M. Sc.* Universidad Nacional de Colombia. jgmonzond@unal.edu.co
- b. Química farmacéutica. *Ph. D.* Profesora titular, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. dmaragonn@unal.edu.co
- c. Químico. *Ph. D.* Profesor asociado, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. famosr@unal.edu.co
- d. Químico. *Ph. D.* Profesor asociado, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. lcastellanosh@unal.edu.co
- e. Químico. *Ph. D.* Profesor asociado, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. fhlopezv@unal.edu.co @unal.edu.co

Introducción

Las glucosil-hidrolasas pertenecen a un grupo de enzimas que se caracterizan por catalizar la hidrólisis de carbohidratos, y que se encuentran ampliamente distribuidas en diferentes procesos biológicos¹. Estas enzimas desempeñan un papel clave en el metabolismo de carbohidratos, puesto que representan la primera vía de degradación facilitando su absorción¹. Es así como estas enzimas se han perfilado como dianas biológicas de interés para el tratamiento de la diabetes, y cuentan actualmente con diferentes inhibidores usados a nivel clínico². No obstante, los perfiles de seguridad de algunos de estos fármacos se caracterizan por un gran número de efectos adversos², por lo que la búsqueda de alternativas más efectivas y seguras, que complementen la terapia, sigue siendo el objetivo de diversas investigaciones. En este contexto, los productos naturales ofrecen una alternativa como fuente de este tipo de inhibidores, dada su diversidad estructural y la bioactividad que han mostrado en diversos modelos de inhibición enzimáticos³.

Un gran número de reportes evidencian que compuestos polifenólicos, terpenos, alcaloides, quinonas, entre otros productos naturales, han presentado inhibición de la actividad catalítica de enzimas como la α -glucosidasa y la α -amilasa³. Dentro de estos grupos de compuestos, son los flavonoides los que poseen un mayor número de reportes de actividad inhibitoria e incluso cuentan con estudios de relación estructura-actividad (SAR). Estos últimos han permitido establecer algunas características estructurales de los flavonoides que favorecen la unión al sitio activo³⁻⁴. Con respecto a los compuestos de tipo terpenoico, se han reportado diferentes triterpenos, esteroides y saponinas con esta actividad³. Tanto los flavonoides como las saponinas son de interés para el estudio aquí descrito, puesto que son compuestos frecuentemente encontrados

en especies del género *Passiflora*, un género de gran interés económico y cultural en países de la región andina como Colombia⁵⁻⁶.

En el caso de *Passiflora ligularis* (conocida como granadilla) se han identificado tentativamente al menos 14 compuestos polifenólicos, que incluyen flavonoles, flavonas, flavonoides *O*-glicosidados y esterificados; además de al menos 4 saponinas de núcleo tipo lanostano⁷⁻⁸. Estos hallazgos representan evidencia base para el direccionamiento de investigaciones en la búsqueda de inhibidores de glucosil-hidrolasas a partir de esta especie. Sin embargo, las estrategias tradicionales de purificación y evaluación de la actividad biológica representan procesos arduos que muchas veces se materializan en esfuerzos no aprovechables; esto es particularmente cierto si los compuestos son minoritarios (como es el caso de flavonoides en esta especie)⁸. De esta forma, métodos de *screening* alternativos se han venido implementando como estrategias de identificación de compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales⁹. Algunos de estos métodos son los estudios computacionales, los cuales se han posicionado como herramientas de predicción de interacciones moleculares entre moléculas y dianas biológicas de interés; y es por ello por lo que actualmente representan herramientas potentes en la búsqueda, identificación y optimización de fármacos¹⁰.

Este capítulo presenta los resultados y conclusiones de un estudio de acoplamiento molecular que pretendió establecer aquellos compuestos identificados en hojas de *P. ligularis* con mejores predicciones de interacción frente a los sitios activos de las estructuras tridimensionales de las enzimas α -amilasa pancreática porcina, y la subunidad *N*-terminal de la α -glucosidasa (glucomaltasa) intestinal humana. Por último, los estudios computacionales se correlacionaron con la actividad inhibitoria de algunos compuestos, mediante la determinación de los valores de IC_{50} *in vitro* contra ambas enzimas.

Metodología

Reactivos y equipos

En los ensayos de inhibición enzimática se emplearon los reactivos α -D-glucopiranosido (pNPG) N1377, acarbosa A8980, polvo intestinal de rata (en acetona) I1630, alfa amilasa de páncreas porcino (PPA) A3176, almidón azul Sigma-Aldrich S7776, TRIS base, K_2HPO_4 , y KH_2PO_4 , adquiridos a Sigma-Aldrich (San Luis, EE. UU.). Los estándares de referencia usados fueron: quercetina-3-*O*- β -glucósido (Sigma, > 98 %), kaempferol-3-*O*- β -glucósido (Sigma, > 97 %), (-)-catequina (Sigma, > 95 %), y crisina (Fluka, > 98 %). La identidad y pureza de los compuestos de referencia se verificó por RMN-¹H y HPLC-MS.

Para el procesamiento de las muestras se usó una microcentrífuga refrigerada Hettich D-78532 (Tuttlingen, Alemania), y el lector de microplacas BIORAD modelo 550 fue empleado en la determinación de la absorbancia. Para la obtención de la solución de α -glucosidasa, a partir de extracto acetónico de intestino de rata, se usó un sonicador Qsonica (Melville, EE. UU.). En la incubación de las muestras se utilizó una incubadora con agitación (Polimax 1040, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Alemania). Para los estudios de acoplamiento molecular se utilizó un equipo ASUS VivoBook X524U, Intel (R) Core™ i8-8550U CPU 4.0 GHz x64, memoria RAM de 12.0 GB, con sistemas operativos Windows10 y Linux (Ubuntu).

Estudios de acoplamiento molecular

Selección de las estructuras 3D de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa

Las estructuras de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa se descargaron de la base de datos Protein Data Bank (PDB)¹¹. Los archivos descargados se seleccionaron con base en tres criterios: organismo de origen (de acuerdo con el origen de la enzima usada en el bioensayo), presencia del inhibidor acarboxa en el sitio activo y resolución de la estructura cristalográfica.

Preparación de las estructuras 3D de las enzimas para el acoplamiento molecular

El desarrollo del preprocesamiento de los archivos de las estructuras proteicas seleccionadas se ejecutó a través de la herramienta Protein Preparation Wizard del *software* académico Maestro 11.5¹². Esta herramienta permite hacer correcciones a la estructura mediante la adición de hidrógenos, órdenes de enlaces, corrección de los estados de protonación de los aminoácidos de acuerdo con el pH (pH=6,8), remoción de moléculas de agua, selección de tautómeros, eliminación de subunidades proteicas, entre otros.

Preparación de las estructuras de los ligandos

Las estructuras 3D de los metabolitos aislados de *P. ligularis* fueron construidas con base en las estructuras identificadas en trabajos previos⁷⁻⁸. Este proceso se realizó mediante la modelación en 3D de las estructuras en el *software* Maestro 11.5, cuidando la asignación de la estereoquímica en los centros asimétricos y los estados de ionización de acuerdo al pH de los bioensayos (6,8)¹². En el caso de metabolitos cuya estereoquímica no ha sido elucidada en su totalidad (saponinas), se generaron todos los diastereoisómeros para su evaluación frente a las enzimas de estudio.

Determinación y validación del protocolo de acoplamiento molecular

El proceso de acoplamiento molecular se llevó a cabo usando el *software* AutoDock Vina 1.1.2 (ADV)¹³. Los archivos de entrada, tanto de las proteínas como de los ligandos, se prepararon mediante el uso del paquete de herramientas MGLTools, específicamente la herramienta AutoDockTools 1.5.6 (ADT)¹⁴. Los parámetros, como las coordenadas y el tamaño de rejilla, se definieron teniendo como referencia la ubicación del inhibidor cocrystalizado y la distancia en Å entre los átomos más distantes de los inhibidores en las estructuras proteicas seleccionadas. Para el caso de la α -amilasa, las coordenadas empleadas fueron $x = 36,03$, $y = 19,95$, $z = 59,54$, y el tamaño de rejilla de 35 Å. Respecto a la α -glucosidasa, se emplearon las coordenadas $x = -20,78$, $y = -6,7$, $z = -5,33$, y un tamaño de rejilla de 30 Å. Por otro lado, la exhaustividad de búsqueda conformacional correspondió al valor establecido por defecto en el *software*.

Para el proceso de validación de los parámetros se establecieron dos estrategias: la primera se basó en someter la conformación del inhibidor cocrystalizado a un reacoplamiento, mientras que la segunda partió de conformaciones aleatorias del inhibidor. De esta forma, se pretendió evidenciar qué conjunto de parámetros generaba el mayor grado de similitud (menor valor de RMSD) conformacional entre las conformaciones resultantes y la conformación bioactiva del inhibidor cocrystalizado.

Acoplamiento molecular y huellas digitales de interacción proteína-ligando (protein-ligand interaction fingerprint, PLIF)

El acoplamiento molecular entre los metabolitos y las enzimas de estudio se realizó empleando los parámetros de *docking* validados en la sección anterior. La huella digital de interacciones o *interaction fingerprint* se estableció mediante el *software* Maestro 11.5¹². Este perfil de interacciones muestra el conteo de interacciones que presentan los ligandos con los residuos de aminoácidos en una distancia menor a 4 Å, y se compararon con las interacciones del ligando cocrystalizado (molécula de referencia). Adicionalmente, se usó la métrica de Tanimoto para establecer la similitud entre los modos de unión de los resultados de los acoplamientos, de los diferentes ligandos, con los correspondientes ligandos cocrystalizados.

Ensayos de actividad inhibitoria sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa de compuestos identificados en hojas de *Passiflora ligularis* Juss.

La evaluación de la actividad inhibitoria sobre las enzimas α -amilasa pancreática porcina y la α -glucosidasa presente en el polvo de intestino de rata fue determinada para el extracto total (25 mg hojas secas/ml), y para las fracciones acuosas

y butanólicas obtenidas tras un proceso de partición. Además, en el caso de los compuestos polifenólicos y saponinas identificados en hojas de *P. ligularis* y disponibles en cantidades suficientes, se calculó la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀). Para esto, se partió de una solución de 1 mg/ml del compuesto a ensayar y se realizaron hasta 6 diluciones del compuesto, de acuerdo con la disponibilidad de este. Finalmente, se empleó el *software* Graphpad para el cálculo de la IC₅₀. Las metodologías de los ensayos de inhibición enzimática fueron:

- Inhibición de la α -amilasa pancreática porcina.

Se utilizó la metodología descrita por Hansawasdi-Kawabata *et al.*¹⁵, modificada por Rey *et al.*¹⁶, en la cual se determina la actividad enzimática mediante la absorbancia a 600 nm generada por fragmentos solubles de dextrinas unidas al colorante remazol azul producto de la hidrólisis del almidón azul.

- Inhibición de la α -glucosidasa obtenida a partir del extracto acetónico de intestino de rata.

La metodología empleada fue la descrita por Ayinampudi *et al.*¹⁷, modificada por Rey *et al.*¹⁶. Esta se basa en la determinación de la actividad enzimática mediante la absorbancia medida a 405 nm por el producto de hidrólisis del sustrato α -D-glucopiranosido de *p*-nitrofenilo (pNPG).

Resultados y discusión

En esta sección se describen los resultados del proceso de búsqueda de estructuras 3D de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa. Posteriormente, se presentan los resultados de los ensayos de validación que permitieron definir los parámetros de rejilla para el acoplamiento molecular. Por otro lado, se detallan las estructuras 2D de los flavonoides y saponinas identificados en las hojas de *P. ligularis*, junto con los diastereoisómeros de la cadena lateral de las saponinas cuya estereoquímica absoluta no ha sido determinada. Finalmente, se listan los compuestos seleccionados como mejores candidatos para la inhibición de estas enzimas, con base en los resultados tabulados del estudio de acoplamiento, el perfil de interacciones y los valores de IC₅₀ calculados.

Selección de las estructuras 3D para las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa

La estructura de la α -amilasa pancreática porcina se buscó mediante el uso de las palabras claves “*pig*”, “*alpha amylase*”, “*acarbose*” y “*pancreati*” en la base de datos del Protein Data Bank, encontrándose las 4 estructuras presentadas en la tabla 1. La estructura con código 1HX0 posee la mejor resolución cristalográfica (1,38 Å). Además, los valores de R y R *free* (0,130 y 0,108) indican una baja desviación entre el patrón de difracción modelado y el obtenido experimentalmente. Por lo tanto, se infiere que la estructura reportada tiene una buena calidad para estos estudios¹⁸. Esta estructura además posee como ligando cocristalizado un pseudo-hexasacárido (PHAC), generado por la transglicosilación de subproductos de la reacción de hidrólisis de la acarbosa.

Para la búsqueda de las estructuras de α -glucosidasa, se emplearon las palabras claves “*rat*”, “*alpha glucosidase*” y “*acarbose*”. Sin embargo, no se encontraron estructuras 3D reportadas con estos términos. Por ello, se direccionó la búsqueda a estructuras 3D con alto grado de homología estructural respecto a la enzima de origen murino. De esta forma, dos estructuras de origen humano fueron incluidas como se detalla en la tabla 1. Finalmente, con base en el porcentaje de homología respecto a la isomaltasa intestinal de rata (P23739 *uniprot entry*), en los valores de resolución cristalográfica (1,9 Å), y valores de R y R *free* (0,177 y 0,215), la estructura con código PDB 2QMJ, correspondiente a la subunidad N-terminal de la α -glucosidasa (glucoamaltosa) intestinal humana, se empleó en los estudios de acoplamiento molecular.

Tabla 1. Estructuras de la α -amilasa pancreática porcina y de la α -glucosidasa obtenidas del PDB de acuerdo con los parámetros de búsqueda (en cursiva se resaltan las estructuras usadas en este estudio)

Código PDB	Nombre	Resolución (Å)
1OSE	Porcine pancreatic alpha-amylase complexed with acarbose ¹⁹	2,3
<i>1HX0</i>	<i>Structure of pig pancreatic alpha-amylase complexed with the “truncate” acarbose molecule (pseudotrisaccharide)²⁰</i>	<i>1,38</i>
1PPI	The active center of a mammalian alpha-amylase. the structure of the complex of a pancreatic alpha-amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2 angstroms resolution ²¹	2,2
1JFH	Structure of a pancreatic alpha-amylase bound to a substrate analogue at 2.03 angstrom resolution ²²	2,03
<i>2QMJ</i>	<i>Crystral structure of the N-terminal subunit of human maltase-glucoamylase in complex with acarbose²³</i>	<i>1,9</i>
3TOP	Crystral structure of the C-terminal subunit of human maltase-glucoamylase in complex with acarbose ²⁴	2,0

Preparación de las estructuras proteicas para el acoplamiento molecular

La figura 1 presenta las estructuras tridimensionales de las enzimas α -amilasa (1HX0) y α -glucosidasa (2QMJ) después de su preparación con la herramienta Protein Preparation Wizard. El pH seleccionado para generar los estados de ionización de los residuos fue de 6,8, puesto que este es el de máxima actividad enzimática y el que se empleó en los bioensayos *in vitro*^{16,25}.

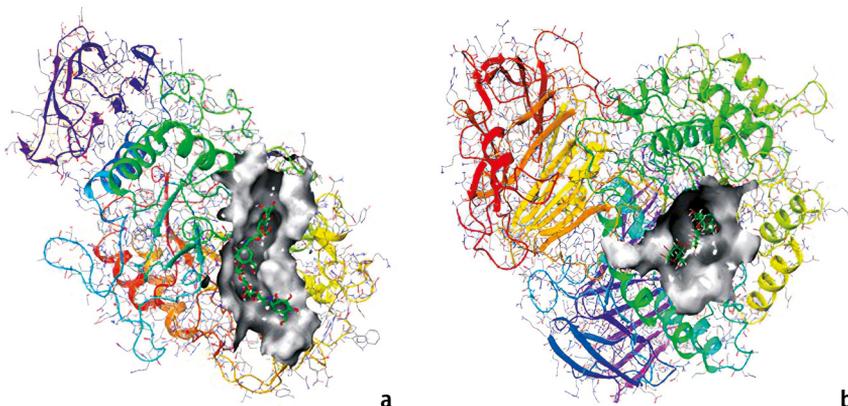


Figura 1. Estructuras 3D de las enzimas empleadas para los estudios de acoplamiento molecular y procesadas mediante la herramienta Protein Preparation Wizard del software Maestro 11.512. a) Estructura α -amilasa pancreática porcina código PDB 1HX0, b) estructura subunidad N-terminal de la α -glucosidasa intestinal humana código PDB 2QMJ.

Nota: los sitios de unión del ligando se esquematizan mediante superficie de Van der Waals.

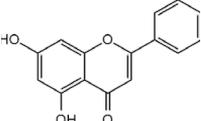
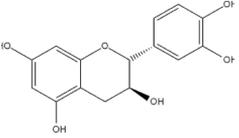
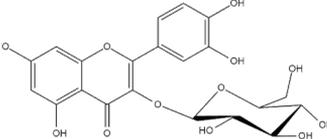
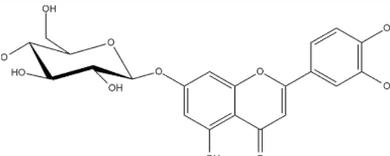
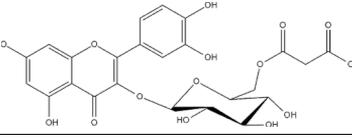
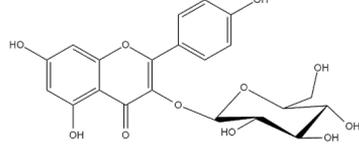
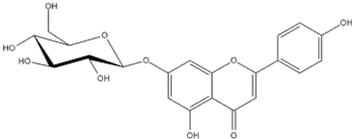
Preparación de las estructuras de los ligandos

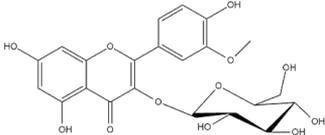
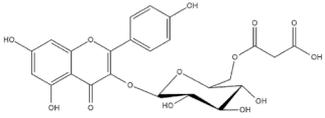
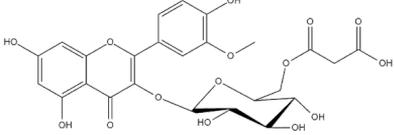
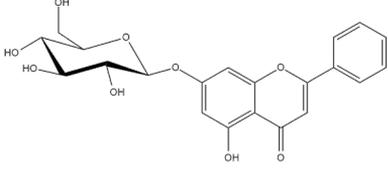
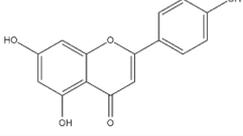
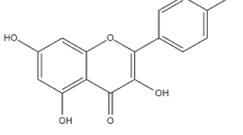
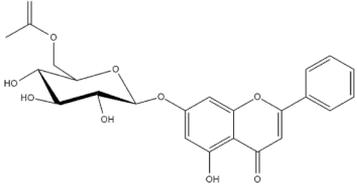
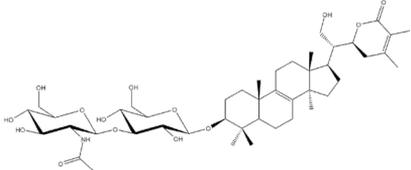
Las estructuras de 14 compuestos polifenólicos y 4 saponinas fueron modeladas. Adicionalmente, se incluyó un flavonoide *C*-glicosidado (compuesto 19) identificado y aislado en *Passiflora bogotensis* como control positivo, puesto que presenta actividad inhibitoria frente a α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*²⁶. En la tabla 2 se listan los compuestos usados en este estudio.

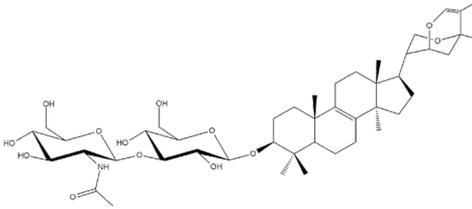
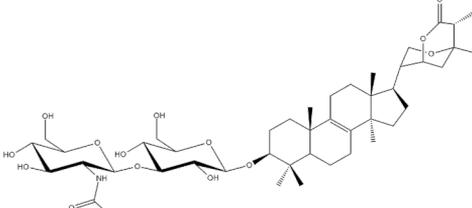
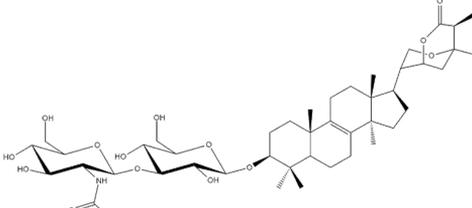
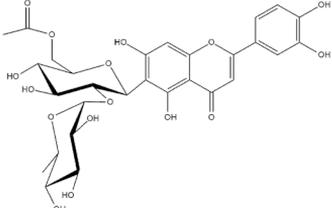
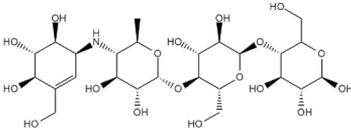
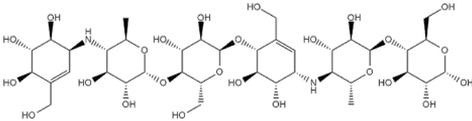
Las saponinas (ligularósidos B-D) no cuentan con la determinación de la estereoquímica absoluta de los centros quirales de la cadena lateral⁷. En el caso del ligularósido A, la configuración relativa está determinada para los centros estereogénicos de la cadena lateral a través de experimentos de RMN⁸. La figura 2 presenta las estructuras 3D de las saponinas propuestas por Meneses-Macías⁷, numerando los carbonos quirales de la cadena lateral. No obstante, Meneses-Macías aclara que no se conoce toda la información sobre la estereoquímica de los centros asimétricos de la cadena lateral. Ante esta falta

de información, se decidió modelar la estructura de todos los diastereoisómeros posibles, la cual se presenta con detalle en la tabla 3. En ella solo se enlistaron aquellos energéticamente viables.

Tabla 2. Listado de metabolitos de hojas de *P. ligularis* usados en el estudio de acoplamiento molecular frente a las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa. Se tuvo en cuenta la protonación al pH de trabajo de los ensayos de inhibición enzimática

N.º del compuesto	Nombre	Estructura 2D
1	Crisina	
2	(-)-Catequina	
3	Quercetina-3-O- β -glucósido	
4	Luteolin-7-O- β -glucósido	
5	Quercetin-3-O-(6''-malonil)-glucósido	
6	Kaempferol-3-O-glucósido	
7	Apigenin-7-O-glucósido	

N.º del compuesto	Nombre	Estructura 2D
8	Isoramnetin-3-O-glucósido	
9	Kaempferol-3-O-(6''-malonil)-glucósido	
10	Isoramnetin-3-O-(6''-malonil)-glucósido	
11	Crisin-7-O-β-glucósido	
12	Apigenina	
13	Kaempferol	
14	Crisin 7-O-β-(6''-acetil)-glucósido	
15	Ligularósido A	

N.º del compuesto	Nombre	Estructura 2D
16	Ligularósido B	
17	Ligularósido C ^a	
18	Ligularósido D ^a	
19	Luteolin-6-C- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-(6''-O-acetil)- β -D-glucósido. Control positivo.	
AC	Acarbosa	
PHAC	<i>Pseudo</i> -hexasacárido derivado de acarbosa	

^a Diastereoisómero representado por Meneses-Macías⁷.

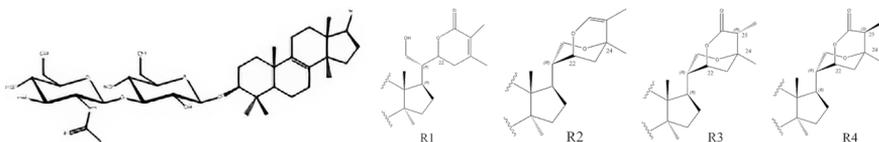


Figura 2. Estructuras de las cadenas laterales de las saponinas identificadas por Menezes-Macías⁷ en hojas de *Passiflora ligularis*: R1 ligularósido A (15), R2 ligularósido B (16), R3 ligularósido C (17) y R4 ligularósido D (18).

Tabla 3. Diastereoisómeros modelados para los compuestos 15-18

Compuesto	Código diastereoisómero	Estereoquímica absoluta modelada			
		C20	C22	C24	C25
15	15.1	R	R	N. a.	N. a.
	16.1	R	R	R	N. a.
16	16.2	R	R	S	N. a.
	17.1	R	R	R	R
17	17.2	R	R	S	R
	18.1	R	R	R	S
18	18.2	R	R	S	S

Nota: se describe la estereoquímica absoluta de cada uno de los centros quirales presentados en la figura 3. Solo se muestran los que son energéticamente viables. N. a.: no aplica.

Determinación y validación del protocolo de acoplamiento molecular

α -Amilasa

El alineamiento entre la conformación energéticamente más estable del ligando sometido a “*re-docking*” y la conformación del ligando cocrystalizado arrojó un RMSD de 8,198 Å. Este valor es alto, y se considera aceptable para un ligando de gran tamaño y con un gran número de enlaces rotables como es el caso del PHAC, siempre que se mantenga la misma orientación. No obstante, con el objetivo de visualizar el impacto de cambios en las coordenadas y dimensiones de la rejilla, se evaluaron otros parámetros de rejilla presentados en la tabla 4. Estos resultados permitieron establecer que el conjunto de coordenadas y dimensión de la rejilla denominada como “P3” produce el confórmero que mejor asemeja la conformación del ligando cocrystalizado.

Tabla 4. Parámetros de la rejilla empleada en el protocolo de validación del acoplamiento para la enzima α -amilasa.

Código	Coordenada x	Coordenada y	Coordenada z	Tamaño (Å) Direcciones x, y, z	RMDS (Å)
P1	36,03	19,95	59,54	35	8,20
P2	32,02	14,86	52,54	35	13,04
P3	36,03	19,95	59,54	30	7,94
P4	36,03	19,95	59,54	25	8,98

Nota: el ligando corresponde a un pseudo-hexasacárido derivado de acarbosa (PHAC).

La superposición de los resultados del acoplamiento entre conformeros aleatorios del ligando cocrystalizado y su conformación experimental permitieron evidenciar que la mayoría de los ángulos diedros de los enlaces se conservan y las conformaciones superpuestas son similares. Todo esto muestra que el modelo permite predecir la interacción entre el ligando y el sitio activo de la enzima.

α -Glucosidasa

De acuerdo con los datos recopilados en la tabla, se encontró que el conjunto de coordenadas y tamaño de la rejilla denominado P2 reproduce de mejor manera la conformación del ligando cocrystalizado. Al igual que en el caso anterior, se encontraron valores de RMSD altos para el *re-docking* de la acarbosa cocrystalizada en la estructura 2QMJ; esto se explica por el número de enlaces rotables y la remoción de moléculas de agua.

Tabla 5. Parámetros de la rejilla empleada en ensayos de validación del protocolo de acoplamiento para la enzima α -glucosidasa

Código	Coordenada x	Coordenada y	Coordenada z	Tamaño (Å) direcciones x, y, z	RMDS (Å)
P1	-20,78	-6,7	-5,33	30	7,6706
P2	-20,78	-6,7	-5,33	25	7,3770
P3	-20,78	-6,7	-5,33	35	17,0189
P4	-18,95	-5,2	-4,33	30	7,4858

Nota: el ligando corresponde a acarbosa.

Acoplamiento molecular y huellas digitales de interacción proteína-ligando (PLIF) para los compuestos identificados de hojas de *Passiflora ligularis* Juss. y las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa

α -Amilasa

El estudio de acoplamiento molecular, realizado entre los compuestos de la tabla 2 y la estructura rígida de la enzima α -amilasa pancreática porcina 1HX0, permitió identificar que bajo las condiciones modeladas todos los compuestos interactúan en el sitio activo de la proteína, y los complejos allí formados son energéticamente viables. La energía de afinidad obtenida fue normalizada al incluir el número de átomos pesados, obteniendo el parámetro de eficiencia de ligando²⁷. Adicionalmente, se tuvo en cuenta el perfil de interacciones que presenta el ligando con el sitio activo. De acuerdo con esto, en el presente trabajo se seleccionaron estos dos criterios en conjunto para la clasificación de los diferentes ligandos identificados en hojas de *P. ligularis*.

De esta forma, mediante los valores recopilados en la tabla 6 se identificó que todos los compuestos de naturaleza polifenólica poseen una eficiencia teórica del ligando superior al PHAC ($-0,18$ kcal*átomo/mol), mientras que las saponinas poseen valores cercanos o iguales a este, mas no superiores. De igual forma, al comparar la eficiencia calculada para el control positivo o compuesto 19 ($-0,20$ kcal*átomo/mol) con los compuestos identificados en *P. ligularis* se encontró la misma tendencia. Los resultados obtenidos muestran que la mayoría de los compuestos estudiados interactúan con los aminoácidos del sitio activo de la enzima, incluyendo los residuos Asp197, Glu233 y Asp300 de la triada catalítica descrita por Qian *et al.*²⁰. Es importante resaltar que no se identificaron interacciones electrostáticas relevantes entre los grupos ionizables de los compuestos y los aminoácidos presentes en el espacio de búsqueda. Por lo tanto, las interacciones de tipo puente de hidrógeno fueron consideradas de mayor relevancia para la selección de los mejores candidatos. Sin embargo, también se identificaron interacciones con aminoácidos necesarias para la estabilización y reconocimiento del sustrato, como interacciones hidrofóbicas²⁰.

La cuantificación de la similitud de los patrones de interacción generados por los inhibidores y los compuestos estudiados se realizó mediante el coeficiente de Tanimoto. Este coeficiente relaciona el número de elementos similares entre los dos conjuntos respecto al número de elementos diferentes¹². De forma puntual, el análisis de interacciones arrojó que los compuestos de mayor tamaño, como las saponinas y algunos flavonoides glicosilados con ésteres del ácido malónico, presentan un patrón de interacción modelado de mayor similitud al inhibidor PHAC. En relación con los flavonoides de un mismo núcleo estructural, se encontró que la glicosilación aumenta el número

de interacciones favorables con los aminoácidos del sitio activo. Por otra parte, la esterificación con malonato de los flavonoides *O*-glicósidos también impacta en el perfil de interacciones calculado.

Como resultado de la integración de los datos de eficiencia de ligando y los perfiles de interacción, se seleccionaron el ligularósido A (diastereoisómero 15.1, tabla 3), la quercetina-3-*O*- β -glucósido (compuesto 3), la luteolina-7-*O*- β -glucósido (4), el kaempferol-3-*O*-glucósido (6) y a la apigenina-7-*O*-glucósido (7) como los compuestos con mayor potencial como inhibidores de la α -amilasa pancreática porcina. Las interacciones de algunos de estos compuestos con aminoácidos del sitio activo se presentan en la figura 3.

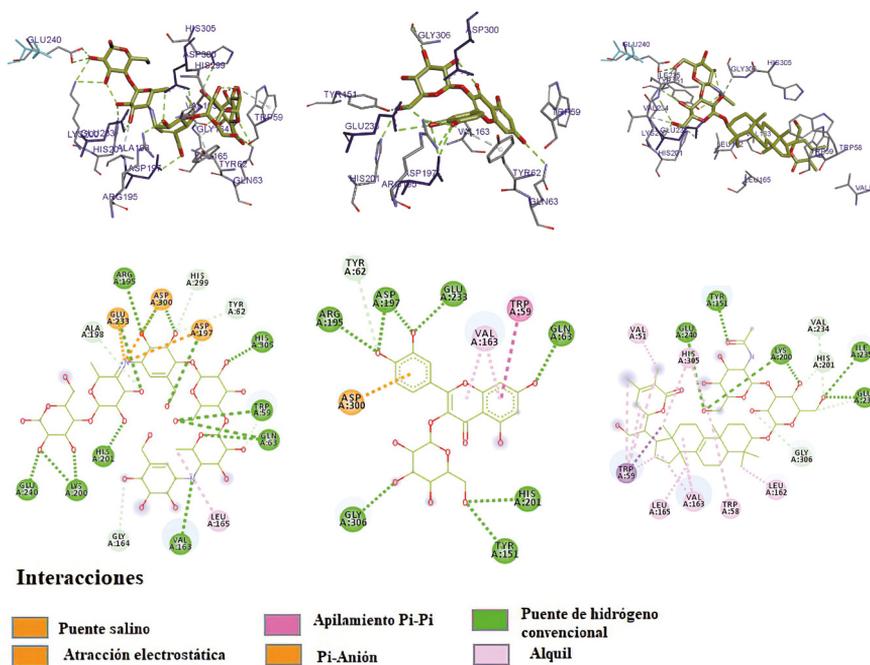


Figura 3. Representación gráfica 3D y 2D de las interacciones receptor-ligando entre los compuestos: a-b) *pseudo*-hexasacárido derivado de acarbosa, c-d) quercetina-3-*O*- β -glucósido (3), y e-f) ligularósido A (15.1), y el sitio activo de la estructura de la α -amilasa pancreática porcina (1HX0), mostrando los aminoácidos de contacto a 4 Å.

α -Glucosidasa

En el caso de los estudios de acoplamiento con la estructura rígida de la subunidad *N*-terminal de la glucosidasa intestinal humana 2QMJ, se evidenció que tanto los compuestos polifenólicos como las saponinas presentan interacciones

con el sitio activo de la enzima, de acuerdo con el modelo planteado (tabla 7). Los compuestos polifenólicos son los que presentan una mayor eficiencia de ligando respecto a la acarbosa ($-0,17 \text{ kcal}^* \text{ átomo/mol}$); mientras que las saponinas, teniendo en cuenta los diasteroisómeros previstos, presentaron valores inferiores. Para esta enzima la triada catalítica corresponde a los residuos Asp203, Asp327, y Asp443²³, y se observó que la mayoría de los ligandos estudiados interactúan con los aminoácidos de la triada catalítica. De igual forma, los ligandos presentaron interacciones con residuos de aminoácidos claves para la estabilización de los ligandos, como: Tyr299, Arg526, Asp542 e His600, entre otros²³.

Los compuestos de tipo saponina son aquellos que presentan mayor número de interacciones, lo cual está relacionado con su tamaño. El comportamiento opuesto se encontró para los compuestos polifenólicos sin glicosilación (como el 1 y el 2), en los que, aunque se presentaron menores interacciones, se encontró una mayor eficiencia de ligando. En el caso de las saponinas el efecto de los cambios en la configuración absoluta de los centros quirales de la cadena lateral no tuvo un impacto significativo, en contraposición a lo observado con la α -amilasa. En conjunto, los compuestos que presentaron valores de eficiencia de ligando superiores a la acarbosa, e interacciones de puentes de hidrógeno con uno o más aminoácidos de la triada catalítica, fueron:

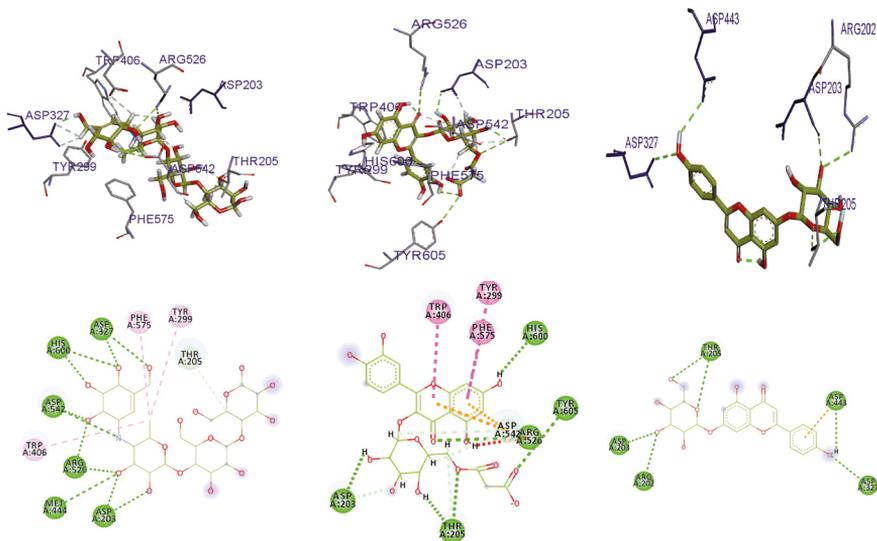


Figura 4. Representación gráfica 3D y 2D de las interacciones receptor-ligando entre los compuestos: a-b) acarbosa, c-d) querquetin-3-*O*-(6''malonil)-glucósido (5) y d-e) apigenina-7-*O*-glucósido (7), y el sitio activo de la estructura de la subunidad *N*-terminal de la glucosidasa intestinal humana (2QM), mostrando los aminoácidos de contacto a 4 Å.

quercetin-3-O-(6''malonil)-glucósido (5), apigenina-7-O-glucósido (7), kaempferol-3-O-(6''malonil)-glucósido (9), e isoramnetin-3-O-(6''malonil)-glucósido (10). Lo anterior indica que la esterificación con malonato podría repercutir en el número de interacciones efectivas para la formación del complejo ligando-receptor. La figura 4 esquematiza las interacciones de algunos de estos compuestos con los aminoácidos del sitio activo de la enzima.

Tabla 6. Datos del acoplamiento molecular y análisis de similitud de la interacción ligando-proteína entre la α -amilasa pancreática porcina 1HX0 y los ligandos identificados en hojas de *P. ligularis*, PHAC, y compuesto 19

Compuesto	Tipo de compuesto	Energía de afinidad (kcal/mol)	Número de átomos pesados	Eficiencia del ligando (kcal*átomo pesado/mol)	Aminoácidos involucrados en puentes de hidrógeno	Coefficiente de Tanimoto respecto al ligando cocrystalizado	Coefficiente de Tanimoto respecto al compuesto 19
PHAC	Pseudo-hexasacárido. Corresponde al ligando cocrystalizado	-11,7	65	-0,18	Trp59, Gln63, Val163, Gly164, Leu165, Arg195, Ala198, Lys200, His201, Glu233, Glu240, His299, Asp300, His305	N. a.	0,369
1	Flavonoide no glicosilado	-8,9	19	-0,46	Gln63	0,346	0,512
2	Flavonoide no glicosilado	-9,0	21	-0,43	Asp197	0,346	0,694
3	Flavonoide O-glicosilado	-8,7	32	-0,26	Gln63, Arg195, Asp197, Asp300	0,519	0,500
4	Flavonoide O-glicosilado	-9,7	31	-0,31	Gln63, Asp197, Asp356	0,346	0,788
5	Flavonoide O-glicosilado esterificado con malonato	-9,1	39	-0,23	Arg195, Val234	0,571	0,430
6	Flavonoide O-glicosilado	-8,2	32	-0,26	Arg195, Lys200, Glu233	0,630	0,383
7	Flavonoide O-glicosilado	-9,9	31	-0,32	Ser105, Asp197	0,496	0,492

Compuesto	Tipo de compuesto	Energía de afinidad (kcal/mol)	Número de átomos pesados	Eficiencia del ligando (kcal*átomo pesado/mol)	Aminoácidos involucrados en puentes de hidrógeno	Coefficiente de Tanimoto respecto al ligando cocrystalizado	Coefficiente de Tanimoto respecto al compuesto 19
8	Flavonoide O-glicosilado	-8,2	34	-0,24	Trp59, Gln63, Asp197, Glu233,	0,414	0,368
9	Flavonoide O-glicosilado esterificado con malonato	-9,0	38	-0,24	Gln63	0,630	0,493
10	Flavonoide O-glicosilado esterificado con malonato	-8,6	40	-0,22	Glu233, Ile235, Asp300	0,429	0,250
11	Flavonoide O-glicosilado	-9,6	30	-0,32	His201	0,481	0,366
12	Flavonoide no glicosilado	-9,0	20	-0,45	Asp197	0,385	0,750
13	Flavonoide no glicosilado	-8,9	21	-0,42	Gln63	0,385	0,787
14	Flavonoide O-glicosilado esterificado con acetato	-9,6	33	-0,29	Gln63, Gly164	0,483	0,431
15.1	Saponina	-10,6	60	-0,18	Tyr151, Arg195, Glu233, Asp300	0,698	0,353
16	Saponina	-9,2	59	-0,16	Asp197, Asp300, Trp357	0,385	0,355
16	Saponina	-10,3	59	-0,17	Try151, Lys200	0,586	0,360
17.1	Saponina	-10,3	60	-0,17	Lys200	0,586	0,360
17.2	Saponina	-10,2	60	-0,17	Tyr151, Glu233	0,607	0,360
18.1	Saponina	-10,5	60	-0,18	Try151, Lys200	0,586	0,360
18.2	Saponina	-10,3	60	-0,17	Try151, Lys200	0,586	0,369
19	Flavonoide C-glicosilado	-9,2	45	-0,20	Gln63, Asp197	0,369	N. a.

Tabla 7. Datos del acoplamiento molecular y análisis de similitud de la interacción ligando-proteína entre la subunidad **N**-terminal de la glucosidasa humana 2QMJ y los ligandos identificados en hojas de *P. ligularis*, sinigrina, acarbosa y compuesto 19

Compuesto	Tipo de compuesto	Energía de afinidad (kcal/mol)	Número de átomos pesados	Eficiencia del ligando (kcal/átomo pesado/mol)	Aminoácidos involucrados en puentes de hidrógeno	Coefficiente de Tanimoto respecto al ligando cocrystalizado	Coefficiente de Tanimoto respecto al compuesto 19
Acarbosa	Pseudo-tetrasacárido. Compuesto cocrystalizado	-7,5	44	-0,17	Asp203, Asp327, Met444, Arg526, Asp542, His600	N. a.	0,530
1	Flavonoide no glicosilado	-7,3	19	-0,38	Met444	0,350	0,391
2	Flavonoide no glicosilado	-7,4	21	-0,35	Arg526, Asp542	0,400	0,464
3	Flavonoide O-glicosilado	-7,9	32	-0,24	Arg526, Gln603	0,500	0,543
4	Flavonoide O-glicosilado	-8,2	31	-0,23	Arg202, Arg526, Asp542	0,524	0,382
5	Flavonoide O-glicosilado esterificado con malonato	-7,6	39	-0,19	Asp203, Thr205, Asp327, Arg526 Tyr605	0,650	0,573
6	Flavonoide O-glicosilado	-7,8	32	-0,24	Thr205, Arg526, Asp542	0,524	0,569
7	Flavonoide O-glicosilado	-8,0	31	-0,26	Asp203, Thr205, Asp327, Asp443	0,469	0,444
8	Flavonoide O-glicosilado	-7,0	34	-0,21	Arg526	0,473	0,407
9	Flavonoide O-glicosilado esterificado con malonato	-8,1	38	-0,21	Thr205, Asp443, Asp542	0,364	0,542
10	Flavonoide O-glicosilado esterificado con malonato	-7,7	40	-0,19	Asp203, Asp327, Asp443, Arg526	0,636	0,378

Compuesto	Tipo de compuesto	Energía de afinidad (kcal/mol)	Número de átomos pesados	Eficiencia del ligando (kcal*átomo pesado/mol)	Aminoácidos involucrados en puentes de hidrógeno	Coefficiente de Tanimoto respecto al ligando cocristalizado	Coefficiente de Tanimoto respecto al compuesto 19
11	Flavonoide O-glicosilado	-8,4	30	-0,28	Asp542	0,450	0,354
12	Flavonoide no glicosilado	-7,5	20	-0,38	Arg526, Asp542, Gln203	0,400	0,372
13	Flavonoide no glicosilado	-7,3	21	-0,35	Asp443	0,400	0,392
14	Flavonoide O-glicosilado esterificado con acetato	-8,2	33	-0,25	Thr205	0,579	0,457
15.1	Saponina	-8,1	60	-0,14	Asp203, Asn207, Asn209, Asp327, Asp443, Lys480, Arg526, Asp542, Gln603	0,500	0,477
16.1	Saponina	-7,8	59	-0,13	Thr205, Thr544	0,250	0,341
16.2	Saponina	-7,8	59	-0,13	Asp474, Lys480, Arg526	0,478	0,329
17.1	Saponina	-7,9	60	-0,13	Asn204, Thr544, Asp549	0,280	0,345
17.2	Saponina	-7,8	60	-0,13	Asp452, Lys480	0,565	0,411
18.1	Saponina	-7,8	60	-0,13	Arg202, Asp474	0,583	0,388
18.2	Saponina	-7,7	60	-0,12	Thr205	0,148	0,215
19	Flavonoide C-glicosilado	-8,4	45	-0,19	Arg526	0,530	0,542

Ensayos de actividad inhibitoria *in vitro* de compuestos identificados en hojas de *Passiflora ligularis* Juss. sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa

La composición del extracto polar de hojas de *P. ligularis* abarca diferentes tipos de compuestos, como carbohidratos, aminoácidos, flavonoides, saponinas, entre otros. En este ensayo se incluyeron los flavonoides crisina (1), catequina (2), quercetina-3-*O*- β -glucósido (3), kaempferol-3-*O*- β -glucósido (6), crisin-7-*O*- β -(6''-acetil)-glucósido (14), y la saponina ligularósido A (15). La selección de estos compuestos se realizó con base en los resultados de un estudio metabolómico que estableció que señales de ¹H-RMN en la región aromática y alifática están posiblemente relacionadas con la actividad inhibitoria de los extractos⁸. Por otra parte, como control positivo se usó acarbosa. Estos datos experimentales *in vitro* buscan validar los resultados de las secciones anteriores. En la tabla 8 se resumen los valores de IC₅₀ obtenidos para cada uno de los compuestos.

Tabla 8. Actividad inhibitoria de algunos compuestos identificados en hojas de *Passiflora ligularis* Juss. frente a las enzimas α -glucosidasa, presente en el extracto de intestino de rata, y α -amilasa pancreática porcina

Compuesto	IC ₅₀	
	α -Glucosidasa	α -Amilasa
Crisina (1)	> 786,7 μ M	> 1,57 mM
Catequina (2)	> 689,6 μ M	> 1,37 mM
Quercetin-3- <i>O</i> - β -glucósido (3)	15,37 + 1,05 μ M	31,04 + 1,06 μ M
Kaempferol-3- <i>O</i> - β -glucósido (6)	1,83 + 0,01 mM	33,45 + 2,45 μ M
Crisin-7- <i>O</i> - β -(6''-acetil)-glucósido (14)	> 463,78 μ M	> 873,36 μ M
Ligularósido A (15)	> 235,42 μ M	409,80 + 11,37 μ M
Acarbosa (control positivo)	156,6 + 1,11 μ M	234,1 + 15,9 μ M

De acuerdo con los datos de IC₅₀ para ambas enzimas de interés, los compuestos con mejor actividad inhibitoria son flavonoides glicosilados derivados de quercetina y kaempferol. Estos compuestos presentan mayor potencia en la inhibición de la α -amilasa respecto al inhibidor acarbosa. No se encontró inhibición de la actividad enzimática, dentro del rango de concentraciones evaluadas, por parte de otros compuestos polifenólicos como catequina, crisina y sus derivados. Respecto a las saponinas, el compuesto 15 presentó actividad inhibitoria frente a la α -amilasa, aspecto que es acorde con los resultados del acoplamiento molecular. En este punto es importante mencionar que no se disponía de la totalidad de los compuestos identificados en los extractos

polares de hojas de granadilla, por lo que esfuerzos posteriores a este deben realizarse en este sentido. Adicionalmente, dada la potencia en la inhibición de los flavonoides 3 y 6, se puede inferir que, aunque son minoritarios, la actividad biológica puede estar altamente relacionada con su presencia en el extracto.

Los estudios de acoplamiento molecular presentados en las secciones anteriores muestran la viabilidad *in silico* de la formación de complejos ligando-receptor para la mayoría de los compuestos. No obstante, los valores de IC₅₀ permitieron establecer que la inhibición de la actividad enzimática solo es presentada por algunos compuestos; dentro de estos, los flavonoides con mayor número de hidroxilaciones. Este hecho confirma los resultados de los estudios de acoplamiento molecular, en los que los flavonoides sin hidroxilaciones en el anillo B, como crisina y sus derivados, no presentaron interacciones significativas en el sitio activo de ninguna de las dos enzimas. Estudios QSAR publicados en la literatura científica comparan la actividad inhibitoria de 44 compuestos polifenólicos sobre la enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces* con la estructura de diferentes compuestos polifenólicos; por ejemplo, los estudios de Proença *et al.*²⁸ muestran que los flavonoides con dos hidroxilaciones en los anillos A y B y una en el anillo C son los más activos frente a glucosil-hidrolasas; este es el caso de los derivados de quercetina, lo que coincide con nuestros hallazgos. Los resultados de este estudio son coherentes con los datos disponibles de IC₅₀ reportados para los flavonoides, tales como los derivados de quercetina, kaempferol y crisina en diferentes carbohidrasas^{4,28}. Finalmente, en el caso de las saponinas no se encontraron estudios relevantes sobre la inhibición de la actividad de glucosil-hidrolasas por parte de saponinas con núcleo terpenoidal tipo lanostano.

Conclusiones

El estudio *in silico* tipo acoplamiento molecular permitió identificar el ligularósido A (15), la quercetina-3-O- β -glucósido (3), la luteolina-7-O- β -glucósido (4) y el kaempferol-3-O-glucósido (6) como aquellos compuestos que podrían presentar los complejos energéticamente más estables con el sitio activo de la enzima α -amilasa; a su vez estos podrían interactuar con aminoácidos claves para la hidrólisis de carbohidratos y para el reconocimiento de estos por parte de la enzima. En el caso de la α -glucosidasa, los compuestos quercetin-3-O-(6''-malonil)-glucósido (5), apigenina-7-O-glucósido (7), kaempferol-3-O-(6''-malonil)-glucósido (9) e isoramnetin-3-(6''-malonil)-glucósido (10) fueron los que el modelamiento identificó como mejores candidatos. Por otro lado, el análisis del perfil de interacciones de inhibidores reportados para las enzimas, respecto a los compuestos

identificados en hojas de *P. ligularis*, permitió establecer que compuestos tipo saponina y flavonoides *O*-glicosilados, con o sin esterificación con malonato, presentan un perfil de interacciones similar al mostrado por la acarbosa.

Los valores de IC_{50} obtenidos *in vitro* permitieron validar los resultados del estudio *in silico*, puesto que los compuestos con valores de IC_{50} mejores o cercanos al de acarbosa también presentaron energías calculadas de la formación del complejo favorables y un buen perfil teórico de interacciones con los aminoácidos del sitio activo de las enzimas. Dentro de estos están: el ligularósido A (15), la quercetina-3-*O*- β -glucósido (3) y el kaempferol-3-*O*- β -glucósido (6). Respecto a la inhibición de la α -glucosidasa, solo el compuesto quercetina-3-*O*- β -glucósido (3) presentó un IC_{50} mejor comparado con el compuesto de referencia, y este flavonoide es el más promisorio para continuar con estudios farmacológicos.

Estos resultados permiten sugerir que las hojas de *P. ligularis* son una fuente promisorio de compuestos con actividad inhibitoria sobre glucosil-hidrolasas. Además, representa evidencia soporte para el direccionamiento de investigaciones complementarias que permitan establecer el perfil de seguridad y eficacia para la especie, y que conlleven al desarrollo comercial de productos fitoterapéuticos basados en estas hojas.

Referencias

1. Gloster TM, Davies GJ. Glycosidase inhibition: Assessing mimicry of the transition state. *Org Biomol Chem*. 2010; 8: 305-20.
2. Derosa G, Maffioli P. α -Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice. *Arch Med Sci*. 2012; 8: 899-906.
3. Yin Z, Zhang W, Feng F, Zhang Y, Kang W. α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Sci Hum Wellness*. 2015; 3: 136-74.
4. Tadera KT, Minami YM, Takamatsu KT, Matsuoka TM. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. *Nutr Sci Vitaminol*. 2006; 52: 149-53.
5. Dhawan K, Dhawan S, Sharma A. *Passiflora*: A review update. *J Ethnopharmacol*. 2004; 94: 1-23.
6. Ocampo-Pérez J, Coppens-d'Eeckenbrugge G, Restrepo M, Jarvis A, Salazar M, Caetano C. Diversity of Colombian *Passifloraceae*: Biogeography and an updated list for conservation. *Biota Colomb*. 2007; 8: 1-45.
7. Meneses-Macías C. Saponinas y flavonoides de *Passiflora ligularis* y evaluación de su actividad antiinflamatoria [tesis de maestría]. [Bogotá] Universidad Nacional de Colombia; 2016. 122 p.

8. Monzón-Daza G, Meneses-Macías C, Forero M, Rodríguez J, Aragón-Novoa D, Jiménez C *et al.* Identification of α -amylase and α -glucosidase inhibitors and ligularoside A, a new triterpenoid saponin from *Passiflora ligularis* Juss. (Sweet Granadilla) leaves, by a nuclear magnetic resonance-based metabolomic study. *J Agric Food Chem.* 2021; 69: 2919-31.
9. Yuliana ND, Khatib A, Choi YH, Verpoorte R. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. *Phyther Res.* 2011; 25: 157-69.
10. Medina-Franco JL. Advances in computational approaches for drug discovery based on natural products. *Rev Latinoam Quim.* 2013; 41: 95-110.
11. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H *et al.* The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28: 235-42.
12. Schrödinger Release 2018-4. Maestro, Schrödinger. Nueva York, EE. UU. 2018.
13. Trott O, Olson A. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J Comput Chem.* 2010; 31: 455-61.
14. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* 2009; 30: 2785-91.
15. Hansawasdi C, Kawabata J, Kasai T. Alpha-amylase inhibitors from roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) tea. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000; 64: 1041-3.
16. Rey DP, Ospina LF, Aragón-Novoa D. Inhibitory effects of an extract of fruits of *Physalis peruviana* on some intestinal carbohydrases. *Rev Colomb Cienc Quím Farm.* 2015; 44: 72-89.
17. Ayinampudi SR, Domala R, Merugu R, Bathula S, Janaswamy MR. New icetexane diterpenes with intestinal α -glucosidase inhibitory and free-radical scavenging activity isolated from *Premna tomentosa* roots. *Fitoterapia.* 2012; 83: 88-92.
18. Kleywegt GJ, Jones TA. Model building and refinement practice. *Methods Enzymol.* 1997; 277: 208-30.
19. Gilles C, Astier J-P, Marchis-Mouren G, Cambillau C, Payan F. Crystal structure of pig pancreatic α -amylase isoenzyme II, in complex with the carbohydrate inhibitor acarbose. *Eur J Biochem.* 1996; 238: 561-9.
20. Qian M, Nahoum V, Bonicel J, Bischoff H, Henrissat B, Payan F. Enzyme-catalyzed condensation reaction in a mammalian α -amylase: High-resolution structural analysis of an enzyme-inhibitor complex. *Biochemistry.* 2001; 40: 7700-9.
21. Qian M, Haser R, Buisson G, Duée E, Payan F. The active center of a mammalian alpha-amylase: Structure of the complex of a pancreatic alpha-amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2-Å resolution. *Biochemistry.* 1994; 33(20): 6284-94.

22. Qian M, Spinelli S, Driguez H, Payan F. Structure of a pancreatic alpha-amylase bound to a substrate analogue at 2.03 Å resolution. *Protein Sci.* 1997; 6(11): 2285-96.
23. Sim L, Quezada-Calvillo R, Sterchi EE, Nichols BL, Rose DR. Human intestinal maltase-glucoamylase: Crystal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity. *J Mol Biol.* 2008; 375: 782-92.
24. Ren L, Qin X, Cao X, Wang L, Bai F, Bai G *et al.* Structural insight into substrate specificity of human intestinal maltase-glucoamylase. *Protein Cell.* 2011; 2(10): 827-36.
25. Lehoczki G, Kandra L, Gyémánt G. The use of starch azure for measurement of alpha-amylase activity. *Carbohydr Polym.* 2018; 183: 263-6.
26. Costa GM, Cárdenas PA, Gazola AC, Aragón-Novoa D, Castellanos-Hernández L, Reginatto FH *et al.* Isolation of C-glycosylflavonoids with α -glucosidase inhibitory activity from *Passiflora bogotensis* Benth by gradient high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2015; 990: 104-10.
27. Abad-Zapatero C, Metz JT. Ligand efficiency indices as guideposts for drug discovery. *Drug Discov Today.* 2005; 10(7): 464-9.
28. Proença C, Freitas M, Ribeiro D, Oliveira EFT, Sousa JLC, Tomé SM *et al.* α -Glucosidase inhibition by flavonoids: An in vitro and in silico structure-activity relationship study. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2017; 32(1): 1216-28.

Capítulo 2

Evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso, la fracción butanólica y compuestos identificados en las hojas de *Passiflora ligularis* Juss.

Carolina Meneses Macías^a

Gabriel Monzón Daza^b

Geison Modesti Costa^c

Diana Marcela Aragón Novoa^d

Freddy Alejandro Ramos Rodríguez^e

Leonardo Castellanos Hernández^f

- a.** Licenciada en Química. *M. Sc.* Universidad Nacional de Colombia. cmenesesm@unal.edu.co
- b.** Químico farmacéutico. *M. Sc.* Universidad Nacional de Colombia. jgmonzond@unal.edu.co
- c.** Farmacéutico. *Ph. D.* Profesor asociado, Departamento de Química, Pontificia Universidad Javeriana. modesticosta.g@javeriana.edu.co
- d.** Química farmacéutica. *Ph. D.* Profesora titular, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. dmaragonn@unal.edu.co
- e.** Químico. *Ph. D.* Profesor asociado, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. faramosr@unal.edu.co
- f.** Químico. *Ph. D.* Profesor asociado, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. lcastellanosh@unal.edu.co

Introducción

La inflamación comprende una serie de procesos fisiológicos de respuesta adaptativa frente a una lesión de un tejido por un agente externo o propio. Los procesos inflamatorios permiten el aislamiento y direccionamiento de la respuesta inmune, y la regeneración de los tejidos afectados. Por lo tanto, los tejidos afectados presentan una marcada pérdida de funcionalidad, la cual es producto de los múltiples eventos que se presentan, ya sea de manera aguda o crónica. Estos eventos abarcan: el daño celular, la vasodilatación e incremento de la permeabilidad capilar, la adhesión celular, la liberación de sustancias proinflamatorias que permiten el reclutamiento de células del sistema inmune, la destrucción de los agentes externos por fagocitosis, la remoción de restos celulares y la generación de una red proteica para recuperar el tejido¹.

El género *Passiflora* ha sido estudiado en la modulación de procesos inflamatorios en diferentes modelos farmacológicos². Este género está ampliamente distribuido en Colombia, con más de 167 especies, 48 de ellas ubicadas en la región andina; además de ser plantas con importancia en los campos agrícola y ornamental³. Una de las especies más representativas en Colombia es *Passiflora ligularis*, conocida comúnmente como granadilla, de la cual solo se consume la pulpa, siendo las hojas un subproducto de su cultivo⁴. Las hojas han sido objeto de estudios previos, realizados en nuestros grupos de investigación, sobre su actividad antiinflamatoria y su composición fitoquímica en flavonoides y saponinas⁵⁻⁷. Estos compuestos cuentan con diversos reportes en modelos de inflamación¹.

De acuerdo con diferentes autores, los procesos inflamatorios se pueden clasificar en dos componentes, relacionados entre sí: el celular y el molecular. A nivel celular se destacan cambios notorios en el tejido afectado debido a las

alteraciones en la microcirculación, producto de la vasodilatación de los vasos sanguíneos circundantes, que a su vez alteran la permeabilidad para permitir la migración de leucocitos y fagocitos. Por otro lado, los cambios generados a nivel molecular están mediados por moléculas mediadoras o efectoras de los procesos inflamatorios; estos compuestos endógenos pueden exacerbar o reducir los efectos de la inflamación en los tejidos¹. Así, se han establecido al menos 7 grupos de mediadores de acuerdo con sus características bioquímicas:

- Aminas vasoactivas
- Péptidos vasoactivos
- Fragmentos del sistema complemento
- Mediadores lipídicos
- Citoquinas pro- y antiinflamatorias
- Quimioquinas
- Enzimas proteolíticas

Estos mediadores están relacionados entre sí a través de diversas vías metabólicas, las cuales no solo afectan el tejido dañado, sino que también pueden tener otros efectos sistémicos. Las principales vías son: de ácido araquidónico, del factor de transcripción nuclear κB (NF- κB), del óxido nítrico y las citoquinas proinflamatorias. Debido a la complejidad de dichas vías, agentes externos y alteraciones genéticas que impactan en la homeostasis de los procesos inflamatorios se han relacionado con la aparición y progresión de un gran número de enfermedades¹, las cuales a la fecha cuentan con diferentes fármacos para su tratamiento, como se describe a continuación:

- Antiinflamatorios no esteroideos (AINE): los AINE inhiben la actividad de las enzimas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), lo que resulta en la disminución de la formación de prostaglandinas y tromboxanos a partir de ácido araquidónico. De esta forma, al disminuir la síntesis de prostaglandinas, disminuye el dolor, la inflamación y la hipertermia¹.
- Glucocorticoides: estos fármacos son derivados sintéticos de esteroides naturales. Estos compuestos se unen y activan el receptor tipo glucocorticoide, el cual es un receptor nuclear que desencadena la producción de lipocortina, que inhibe la PLA₂, la COX-1/COX-2, y procesos inflamatorios leucocitarios, como la adhesión, migración y fagocitosis¹.
- Productos biológicos: dentro de este grupo resaltan los anticuerpos monoclonales que actúan principalmente en la vía de las citoquinas y sus receptores, como en el receptor del TNF- α o en el bloqueo

directo de la IL-1. Aunque estos fármacos representan una de las alternativas terapéuticas más modernas, su costo y acceso representan limitantes para su uso¹.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el trabajo de investigación presentado en este capítulo tuvo como objetivo establecer la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso, la fracción butanólica y 7 compuestos aislados de las hojas de *Passiflora ligularis* (compuestos 2, 3, 6, 15-18), empleando un modelo de edema auricular inducido por TPA (13-*O*-tetradecanoilforbol acetato) en ratones Swiss ICR. Los compuestos fueron aislados mediante diferentes técnicas cromatográficas, como HSCCC, HPLC, entre otras; y su estructura fue determinada a través de técnicas espectroscópicas y espectrométricas. La evaluación de la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados mostró que la quercetina-3-*O*- β -glucopiranosido (6) y el ligularósido A (15) podrían ser los compuestos responsables de la actividad detectada en el extracto crudo y en la fracción butanólica. De esta forma se contribuyó a la caracterización farmacológica de las hojas de *P. ligularis* con miras al aprovechamiento de este subproducto de cosecha.

Productos naturales vegetales y actividad antiinflamatoria

Las plantas son una fuente importante de compuestos con actividad antiinflamatoria, lo que ha permitido darles usos que van desde los etnofarmacológicos hasta el aislamiento de compuestos bioactivos. Estos organismos han estado presentes en el tratamiento de diferentes enfermedades inflamatorias a lo largo de la historia, siendo el ácido salicílico uno de sus principales exponentes¹. Dentro de los compuestos con mayor número de reportes de actividad inflamatoria se encuentran los fenoles, terpenos y alcaloides, los cuales actúan mediante diversos mecanismos de acción que incluyen la modulación de la expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-1b, IL-6, IL-8, GM-CSF y TNF- α), así como de enzimas mediadoras (MMP-3, MMP-13, iNOS y COX-2) y catabolitos (NO y PGE₂)⁸.

El género *Passiflora* ha sido ampliamente estudiado como fuente promisoría de compuestos con actividad antiinflamatoria con base en reportes etnofarmacológicos y en estudios con modelos farmacológicos de extractos de algunas de sus especies². En el caso de *Passiflora ligularis*, los reportes etnofarmacológicos citan el uso de las hojas en cataplasmas para el tratamiento de contusiones musculares y paperas⁹.

Adicionalmente, la caracterización química de este extracto mostró que contiene compuestos polifenólicos tipo flavonoide, identificando la presencia de derivados de quercetina, kaempferol y crisina, y de al menos 4 saponinas con núcleo lanostano¹⁰⁻¹¹. De estos, los flavonoides son compuestos que han

sido evaluados en modelos tanto *in vitro* como *in vivo* y se han sugerido diferentes mecanismos de acción como: inhibición de enzimas proinflamatorias, por ejemplo, ciclooxigenasa 2 (COX-2), lipooxigenasa (LPO) y óxido nítrico sintasa (NOS)¹²⁻¹⁴. En el caso de las saponinas, se ha reportado actividad antiinflamatoria, en particular en las soyasaponinas producidas por *Glycine max*, con actividad quimiopreventiva a través de la regulación en baja de la COX-2¹⁵.

Esta evidencia indica que los flavonoides y saponinas previamente identificados en las hojas de *Passiflora ligularis* podrían tener actividad antiinflamatoria y a su vez estar relacionados con los reportes etnofarmacológicos anteriormente descritos para esta especie. Así, en este capítulo se presentan los resultados de la actividad antiinflamatoria, evaluada en un modelo de edema de oreja de ratón inducido por TPA, del extracto acuoso, de la fracción butanólica y de 7 compuestos identificados en el extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*, los cuales corresponden a: (-)-catequina (2), quercetina-3-O- β -glucósido (3), kaempferol-3-O- β -glucósido (6), y a 4 saponinas, los ligularósidos A-D (15-18).

Metodología

Material vegetal y extracción

Un total de 7,5 kg de material vegetal fresco fueron recolectados de un cultivo comercial ubicado en la vereda La Florida del municipio de Anolaima, en el departamento de Cundinamarca. Tras el proceso de secado a temperatura ambiente y molienda se obtuvo un peso total de 1786 g. Este material fue extraído mediante la técnica de infusión con agua a 90 °C para obtener el extracto acuoso (332,5 g). Posteriormente, se realizó la partición con butanol para obtener un total de 91,4 g de fracción butanólica.

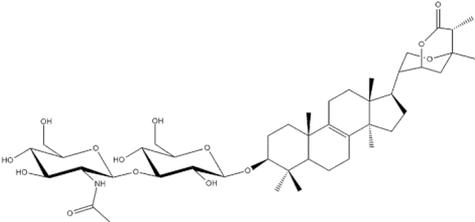
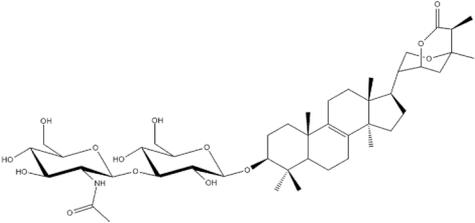
Aislamiento e identificación de los compuestos

Los compuestos se obtuvieron por diferentes procesos de fraccionamiento de la fracción butanólica dadas las características de polaridad de las saponinas y los flavonoides estudiados. El fraccionamiento se realizó empleando principalmente dos métodos: cromatografía en contracorriente (HSCCC, por sus siglas en inglés) y fraccionamiento usando la resina no iónica Amberlite XAD-2. Las fracciones obtenidas de este proceso fueron sometidas a pasos adicionales de purificación mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) usando una columna RP-18 (250x25 mm y 10 μ m de tamaño de partícula). Las fracciones que presentaron alta pureza de acuerdo con los análisis por HPLC analítico fueron analizadas por resonancia magnética nuclear

(RMN, por sus siglas en inglés) y espectroscopía de masas (ME, por sus siglas en inglés) para la determinación de la estructura plana de los compuestos¹⁰⁻¹¹. La estructura de los compuestos se presenta en la tabla 1; su numeración está acorde a la presentada en el capítulo 1 de este libro.

Tabla 1. Estructura de los compuestos aislados en hojas de *P. ligularis* evaluados en el modelo de edema auricular inducido por TPA

N.º de compuesto	Nombre	Estructura 2D
2	(-)-Catequina	
3	Quercetina-3-O-β-glucósido	
6	Kaempferol-3-O-glucósido	
15	Ligularósido A	
16	Ligularósido B	

N.º de compuesto	Nombre	Estructura 2D
17	Ligularósido C	
18	Ligularósido D	

Animales de experimentación

La evaluación de la actividad antiinflamatoria se realizó empleando el ensayo *in vivo* de edema auricular inducido por TPA (13-*O*-tetradecanoilforbol acetato). Para ello, se incluyeron 6 ratones hembra (Swiss ICR) por grupo de tratamiento. Los animales tenían un peso de 25-30 g y alrededor de 8 semanas de edad. La alimentación y agua fue administrada *ad libitum*. Este estudio fue avalado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia mediante el Acta 16 de 2015.

Evaluación de la actividad antiinflamatoria

Con el objetivo de establecer el potencial antiinflamatorio de los compuestos, la fracción butanólica y el extracto a evaluar, fueron administrados tópicamente 500 µg del tratamiento en la oreja derecha de cada animal. Posteriormente, se aplicaron en dicha oreja 2,5 µg de TPA. La oreja izquierda no fue tratada y se empleó como control de cada animal. En el caso del control positivo, se emplearon 500 µg de indometacina por oreja de animal, y como control negativo el vehículo empleado en las diferentes muestras (acetona/etanol 1:1). Los animales fueron sacrificados 4 horas después de la administración del TPA y se tomaron las respectivas muestras de tejido circulares de 5 mm de cada una de las orejas¹⁶.

La actividad antiinflamatoria se estableció con base en el porcentaje de inhibición, el cual relaciona la variación de peso entre la oreja tratada y la

no tratada de cada animal del grupo de tratamiento, con las variaciones de peso entre las orejas del grupo de control negativo. La siguiente ecuación fue empleada para la determinación de dicho parámetro:

$$\% \text{ inhibición} = \left(\frac{(Wt-Wnt)_{\text{control}} - (Wt-Wnt)_{\text{tratamiento}}}{(Wt-Wnt)_{\text{control}}} \right) \times 100$$

Donde Wt es el peso de la sección de la oreja tratada con TPA, y Wnt es el peso de la oreja no tratada.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido por la prueba t de Dunnett para comparaciones múltiples. La significación estadística se expresa como: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n. s.: no significativo.

Resultados y discusión

Los resultados de la actividad antiinflamatoria del extracto, la fracción y los compuestos se presentan en la tabla 2; estos se expresan como el cambio del peso de las orejas del ratón en mg (el peso de la oreja tratada menos el de la no tratada) y como el porcentaje de inhibición de la inflamación. El modelo empleado de edema auricular inducido por TPA fue seleccionado, entre otros aspectos, por otros trabajos realizados con saponinas de núcleo lanostano, el cual corresponde al núcleo identificado en los compuestos 15 a 18¹⁷.

Tabla 2. Efectos del extracto, la fracción butanólica y los compuestos aislados de *P. ligularis* sobre el edema auricular inducido por TPA

Tratamiento	Δ Edema (mg) \pm SEM	Inhibición (%) \pm SEM
Control	6,7 \pm 0,4	-
Indometacina	1,4 \pm 0,3 ***	79,2 \pm 5,0
Extracto acuoso de hojas	4,7 \pm 0,1	29,6 \pm 1,0
Fracción butanólica	3,3 \pm 0,1*	50,9 \pm 0,8
Ligularósido A (15)	2,9 \pm 0,6*	57,3 \pm 8,8
Ligularósido B (16)	19,1 \pm 0,8****	N. a.
Ligularósido C (17)	18,2 \pm 1,4****	N. a.
Ligularósido D (18)	13,9 \pm 0,4****	N. a.

Tratamiento	Δ Edema (mg) \pm SEM	Inhibición (%) \pm SEM
Kaempferol-3-O- β -glucopiranosido (6)	18,0 \pm 0,3****	N. a.
Quercetin-3-O- β -glucopiranosido (3)	1,9 \pm 0,3**	77,1 \pm 3,3
(-)-Catequina (2)	13,4 \pm 0,8****	N. a.

Nota: extracto acuoso, fracción butanólica y compuestos obtenidos de *P. ligularis* (dosis 500 μ g/oreja). Patrón: indometacina (500 μ g/oreja). Datos expresados como la media \pm SEM, $n = 10$ (ANOVA post-test Dunnet: * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). El delta de peso de las orejas del grupo tratado es mayor al delta de peso de las orejas del grupo de control. N. a.: no aplica.

Los datos anteriores muestran diversos efectos de los tratamientos sobre el edema auricular inducido por TPA, desde una disminución en la diferencia de peso entre las orejas de los animales respecto al grupo control, identificado como un efecto antiinflamatorio, hasta un aumento en dicho peso, lo que sugiere un efecto proinflamatorio. Específicamente, la administración del extracto y de la fracción butanólica produjo un menor efecto antiinflamatorio (asociado al menor cambio de peso en las orejas), aspecto contrastado con el efecto del antiinflamatorio no esteroideo empleado como patrón (indometacina), el cual presentó un porcentaje de inhibición del 79,2 %. Sin embargo, el hecho de que los compuestos generaron tanto un aumento como una disminución de la variación de peso respecto al efecto antiinflamatorio del extracto y de la fracción, parece indicar que la concentración de cada uno de estos compuestos en dichas mezclas podría influir en el efecto neto observado.

El porcentaje de inhibición obtenido para el extracto acuoso (29,6 %) es congruente con el reportado previamente¹⁸, el cual corresponde a un valor menor al 40 % de inhibición. Además, la actividad observada ha sido reportada para otras especies del género como *Passiflora quadrangularis*, *Passiflora edulis* var. *edulis* y *Passiflora edulis* var. *flavicapa*. El extracto acuoso de las hojas de *P. ligularis* inhibió la producción de citoquinas proinflamatorias y la liberación de mediadores como bradicinina, óxido nítrico, entre otros, en un modelo de pleuresía causado por carragenina¹⁹⁻²⁰. Respecto a la fracción butanólica, es importante resaltar que esta presentó una mayor inhibición del edema que el obtenido por el extracto acuoso, lo que indicaría que los algunos compuestos antiinflamatorios están presentes en esta fracción, y que corresponden a compuestos de mediana a alta polaridad no iónicos.

Uno de los compuestos con actividad antiinflamatoria fue el ligularósido A (15), identificado como uno de los compuestos mayoritarios de la fracción butanólica, con base en las áreas de los picos del cromatograma de HPLC-ELSD (siglas en inglés de Evaporative Light Scattering Detector) de la figura 3. Este

compuesto se diferencia de las otras saponinas aisladas por su cadena lateral¹⁰, aspecto que podría estar relacionado con la actividad observada, dado que fue la única que disminuyó la diferencia de peso entre la oreja tratada con TPA y la no tratada. El ligularósido A inhibió en un 53,4 % el edema, un resultado similar al reportado para otras saponinas de núcleo lanostano con actividad antiinflamatoria¹⁷.

De forma similar, la quercetina-3-O-β-glucopiranosido (3) presentó un efecto antiinflamatorio, contrario a los dos flavonoides evaluados, siendo incluso el compuesto más activo pues presenta un porcentaje de inhibición del 77,1 %. El anterior resultado concuerda con un reporte de inhibición de este compuesto del 51,2 % del edema plantar, inducido por carragenina en ratas²⁰. Es de importancia resaltar que la quercetina-3-O-β-glucopiranosido (3) es también uno de los compuestos mayoritarios de la fracción butanólica de *P. ligularis* (figura 1). Aunque el ligularósido B (16) también corresponde a uno de los picos mayoritarios del cromatograma, estudios posteriores permitieron comprobar que junto a este coeluyen dos saponinas adicionales que no pudieron ser aisladas¹¹.

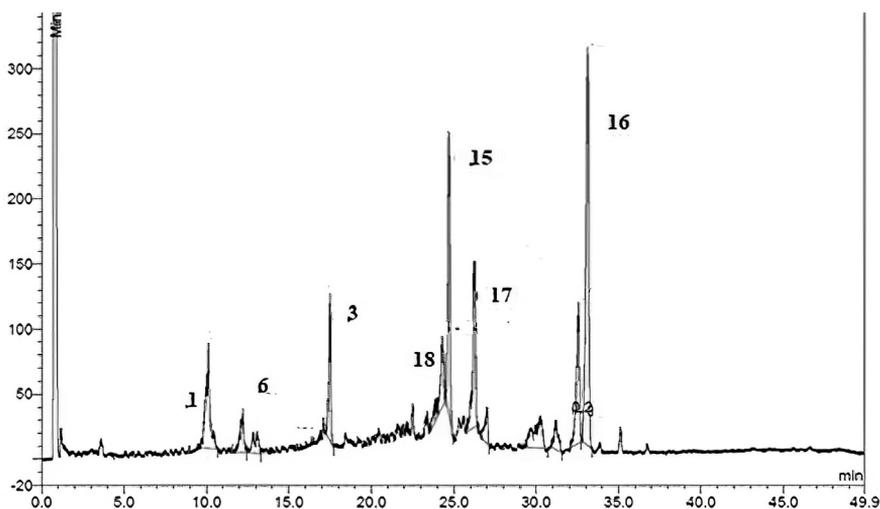


Figura 1. Cromatograma HPLC- ELSD de la fracción butanólica del extracto acuoso de las hojas de *P. ligularis*.

Nota: fase móvil: MeCN (A) y H₂O (B) 0-10 min 10-20 %A, 30 min 50 %A, 40 min 95 % A, 45 min 95 %A; fase estacionaria: columna Thermo® RP-18 (75 mm x 3 i.d.; 2,2 μm), detector: LT- ELSD. (-) Catequina (1), quercetina-3-O-β-glucopiranosido (3), kaempferol-3-O-β-glucopiranosido (6), C.1: ligularósido B, C.2: ligularósido C, C.3: ligularósido D, C.4: ligularósido A.

En relación con los resultados de los compuestos 1, 3 y 16-18 se evidenció una actividad proinflamatoria debido al aumento de la diferencia de pesos en las orejas respecto al grupo de control tratado con el vehículo. Esta tendencia podría relacionarse con la estructura pentacíclica en el caso de las saponinas, ya que otros estudios han demostrado el efecto proinflamatorio de este tipo de compuestos. Dichos hallazgos estarían relacionados con un efecto en la liberación de óxido nítrico (NO), TNF- α (factor de necrosis tumoral), aumento de la enzima mieloperoxidasa, entre otros²². Igualmente, los compuestos terpenoidales obtenidos de las familias *Euphorbiaceae* y *Thymelaeaceae* también han mostrado ser proinflamatorios²³.

No obstante, el hecho de que tanto el extracto como la fracción butanólica y otros compuestos presentes en ellos presentaran actividad antiinflamatoria indica que las diferencias en concentración de estos compuestos en dichas mezclas están relacionados con la actividad biológica observada. Por lo tanto, los resultados de esta investigación proporcionan evidencia de la actividad antininflamatoria observada a partir de las infusiones de las hojas de *P. ligularis*.

Conclusiones

El presente trabajo permitió establecer la actividad antiinflamatoria del extracto, la fracción butanólica y los compuestos quercetina-3-O- β -glucopiranosido (3) y ligularósido A (15) presentes en las hojas de *Passiflora ligularis* Juss. Estos resultados contribuyen a la búsqueda de alternativas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, y representan la base para el direccionamiento de investigaciones que permitan establecer la aplicabilidad, el perfil de seguridad y eficacia de esta especie y de extractos obtenidos de las hojas de *P. ligularis* y formulaciones derivadas de estos.

Referencias

1. Lin G, Li R. Chapter 10 - Natural products targeting inflammation processes and multiple mediators. En: Mandal SC, Mandal V, Konishi T. Natural products and drug discovery: An integrated approach. Ámsterdam: Elsevier, 2018. pp. 277-308.
2. Dhawan K, Dhawan S, Sharma A. *Passiflora*: A review update. J Ethnopharmacol. 2004; 94(1): 1-23.

3. Ocampo-Pérez J, Coppens-d'Eeckenbrugge G, Restrepo M, Jarvis A, Salazar M, Caetano C. Diversity of Colombian *Passifloraceae*: Biogeography and an updated list for conservation. *Biota Colomb.* 2007; 8: 1-45.
4. Ocampo J, Arias JC. Colecta e identificación de genotipos élite de granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) en Colombia. *Rev Colomb Cien Hortíc.* 2015; 9(1): 9-23.
5. Lopez G. Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad biológica de algunas especies de *Passiflora* [tesis de maestría]. [Bogotá] Universidad Nacional de Colombia; 2011.
6. Manrique K. Caracterización de flavonoides C-glicosidados en el extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* (granadilla) [tesis de pregrado]. [Bogotá] Universidad Nacional de Colombia; 2012.
7. Moreno A. Estudios químicos de saponinas presentes en el extracto acuoso de las hojas de *Passiflora ligularis* (granadilla) [tesis de pregrado]. [Bogotá] Universidad Nacional de Colombia; 2013.
8. Gómez H, González K, Medina J. Actividad antiinflamatoria de productos naturales. *Bol Latinoam Caribe Plantas Med Aromat.* 2011; 10(3): 182-217.
9. Carvajal-de Pabón L, Turbay S, Álvarez L, Rodríguez A, Alvarez J, Bonilla K *et al.* Relación entre los usos populares de la granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) y su composición fitoquímica. *Biotechnol Sector Agropecuario Agroind.* 2014; 12(2): 185-96.
10. Monzón-Daza G, Meneses-Macías C, Forero M, Rodríguez J, Aragón-Novoa D, Jiménez C *et al.* Identification of α -amylase and α -glucosidase inhibitors and ligularoside A, a new triterpenoid saponin from *Passiflora ligularis* Juss. (Sweet Granadilla) leaves, by a nuclear magnetic resonance-based metabolomic study. *J Agric Food Chem.* 2021; 69(9): 2919-31.
11. Meneses-Macías C. Saponinas y flavonoides de *Passiflora ligularis* y evaluación de su actividad antiinflamatoria [tesis de maestría]. [Bogotá] Universidad Nacional de Colombia; 2016. 122 p.
12. Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita.* 2011; 43(4): 394-405.
13. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000, 52(4): 673-751.
14. Yoon J, Baek S. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med J.* 2005; 46(5): 585-96.
15. Kang J-H, Sung M-K, Kawada T, Yoo H, Kim Y-K, Kim J-S *et al.* Soybean saponins suppress the release of proinflammatory mediators by LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cancer Lett.* 2005; 230(2): 219-27.
16. De Young L, Kheifets J, Ballaron S, Young, J. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be

differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*. 1989; 26(3-4): 335-41.

17. Giner-Larza E, Máñez S, Giner-Pons R, Recio C, Ríos J. On the anti-inflammatory and anti-phospholipase A(2) activity of extracts from lanostane-rich species. *J Ethnopharmacology*. 2000; 73: 61-9.

18. Aragón-Novoa D. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos acuosos de especies de *Passiflora* en el modelo de edema auricular inducido por TPA. En: Primer Congreso Internacional de Productos Fitofarmacéuticos; 2013 oct. 10-2; Centro de Convenciones Cafam, Bogotá.

19. Benincáa J, Montanher A, Zucolotto S, Schenkel E, Fröde T. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. *Food Chem*. 2007; 104(3): 1097-105.

20. Montanher A, Zucolotto S, Schenkel E, Fröde T. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. *J Ethnopharmacol*. 2007; 109(2): 281-8.

21. Valentová K, Vrba J, Bancířová M, Ulrichová J, Křen V. Isoquercitrin: Pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food Chem Toxicol*. 2014; 68, 267-82.

22. Ikeda Y, Murakami A, Ohigashi H. Ursolic acid: An anti- and pro-inflammatory triterpenoid. *Mol Nutr Food Res*. 2008; 52(1): 26-42.

23. Evans F, Taylor S. (1983). Pro-inflammatory, tumour-promoting and anti-tumour diterpenes of the plant families *Euphorbiaceae* and *Thymelaeaceae*. *Fortschr Chem Org Naturst*. 1983; 44: 1-99.

Capítulo 3

Efecto del extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* Juss. y de sus metabolitos mayoritarios sobre la homeostasis de glucosa

Diana Patricia Rey Padilla^a

María Isabel Cardona Paredes^b

Luis Fernando Ospina Giraldo^c

Diana Marcela Aragón Novoa^d

Fátima Regina Mena Barreto Silva^e

- a.** Química farmacéutica. *M. Sc.*, *c. Ph. D.* Universidad Nacional de Colombia. dpreyp@unal.edu.co
- b.** Química farmacéutica. *M. Sc.*, *c. Ph. D.* Universidad Nacional de Colombia. micardonap@unal.edu.co
- c.** Químico farmacéutico. *Ph. D.* Profesor titular, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. lfospinag@unal.edu.co
- d.** Química farmacéutica. *Ph. D.* Profesora titular, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. dmaragonn@unal.edu.co
- e.** Química. *Ph. D.* Profesora titular, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. mena.barreto@ufsc.br

Introducción

La diabetes mellitus es un desorden metabólico crónico caracterizado por hiperglicemia crónica debido a una deficiencia absoluta o relativa de insulina o por resistencia a la insulina a nivel celular¹. Esta enfermedad sigue siendo uno de los principales desafíos sanitarios a nivel mundial. Se estima que aproximadamente 578 millones de personas tendrá diabetes en 2030, y 700 millones de personas en 2045, siendo la diabetes mellitus tipo 2 el tipo más común, diagnosticada en un 90-95 % de los casos². Aunque no existe una cura para la diabetes, los tratamientos farmacológico y no farmacológico, como la modificación de la dieta y el estilo de vida, ciertamente mejoran el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, los tratamientos disponibles para la diabetes mellitus tipo 2 tienen algunos inconvenientes que van desde el desarrollo de resistencia y efectos adversos hasta la falta de respuesta en un gran segmento de la población de pacientes³.

Los extractos de plantas han sido utilizados a lo largo de la historia para tratar pacientes con diabetes en diferentes partes del mundo; debido a esto el Comité de Expertos en Diabetes de la Organización Mundial de la Salud recomendó una mayor investigación de las plantas medicinales y su efecto en el tratamiento de la diabetes, ya que con frecuencia se consideran menos tóxicas y libres de efectos adversos; por lo tanto, la búsqueda de agentes seguros y más efectivos sigue siendo un área importante de investigación. Algunas plantas y compuestos naturales, particularmente los flavonoides, han mostrado actividad antidiabética en estudios *in vitro* e *in vivo*^{3,4}. Investigaciones previas demostraron que el flavonoide kaempferitrina puede reducir los niveles de glucosa sérica en ratas diabéticas, aumentar la captación de glucosa en el músculo sóleo y estimular la translocación y síntesis de GLUT4 en los adipocitos. Además, se

reportó un efecto insulino-mimético de la kaempferitrina en la homeostasis de glucosa⁵. Otros flavonoides como la rutina también estimulan la captación de glucosa en el músculo sóleo mediado por el calcio extracelular y por la activación de la proteína quinasa II, dependiente de calcio-calmodulina (CaMKII)⁶. El papel antihiper glucémico y secretagogo de insulina del extracto crudo y de las fracciones butanólicas y acuosas de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. ha sido demostrado mediante estudios *in vivo* en los cuales la administración oral del extracto y de las fracciones redujo la glicemia en ratas hiper glucémicas. Además, la fracción butanólica, que presentó un alto contenido de flavonoides, estimuló la secreción de insulina exhibiendo un índice insulinogénico similar al de la glipizida⁷.

El efecto de *P. ligularis* en la homeostasis de la glucosa también ha sido estudiado, aunque se desconocen todos los metabolitos responsables de dicha actividad y su mecanismo de acción⁸. Dentro de los metabolitos presentes en *P. ligularis* se encuentran los flavonoides cuyo potencial antidiabético ha sido demostrado en varios modelos animales^{8,9}. Dentro de los mecanismos reportados para los flavonoides en la homeostasis de la glucosa se encuentran la estimulación de la captación de glucosa en tejidos periféricos, la influencia en los mecanismos pleiotrópicos de señalización de la insulina y la regulación de la actividad o expresión de las enzimas limitantes de la velocidad en la vía del metabolismo de los carbohidratos¹⁰.

Los flavonoides kaempferol-3-O- β -glucósido (astragalina) y quercetina 3-O- β -D-glucopiranosido (isoquercetina) son algunos de los compuestos mayoritarios de *P. ligularis* de los cuales se ha reportado previamente su actividad antidiabética; por lo tanto, se podría atribuir el efecto de *P. ligularis* en la homeostasis de la glucosa a la presencia de dichos flavonoides⁸.

En este capítulo se presentan los efectos del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* y de su fracción etanólica sobre la homeostasis de glucosa, evaluados mediante un estudio *in vivo* de tolerancia a la glucosa y de contenido de glucógeno; a la vez, se propone el mecanismo de acción de los flavonoides mayoritarios de *P. ligularis* (isoquercetina y astragalina) mediante estudios *in vivo* e *in vitro*.

Metodología

Preparación del extracto de hojas de *P. ligularis* y de sus fracciones

Las hojas de *P. ligularis* se recolectaron en el municipio de Anolaima, departamento de Cundinamarca (Colombia). Posteriormente, el material vegetal se secó a temperatura ambiente y se molió utilizando un molino de cuchillas. El extracto acuoso se obtuvo por medio de infusión del material vegetal con agua a 90 °C. Para obtener la fracción etanólica, el extracto crudo se agitó con resina XAD-2 y se lavó con etanol.

Finalmente, el compuesto 3-O-β-D-glucopiranosido (isoquercetina) se aisló mediante diferentes técnicas cromatográficas, incluida la HSCCC (cromatografía en contracorriente de alta velocidad). La caracterización de los compuestos aislados se basó en datos espectroscópicos de RMN (resonancia magnética nuclear) y EM (espectrometría de masas).

Evaluación del efecto hipoglicemiante del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* y de sus fracciones

La evaluación del posible efecto hipoglicemiante/antihiperglicemiante del extracto de hojas de *P. ligularis* y de sus fracciones se realizó mediante el ensayo *in vivo* de tolerancia a la glucosa, el cual se utilizó como punto de partida y *screening* en esta investigación. Se utilizaron ratas Wistar de al menos 5 semanas de edad con un peso corporal de entre 180-210 g. Las ratas se dividieron en cinco grupos (n=6) y se mantuvieron en ayuno durante 12 horas antes del ensayo, con libre acceso al agua. Inicialmente se midió la glucosa basal y posteriormente se administraron los tratamientos vía oral mediante sonda siguiendo el Protocolo CEUA-UFSC PP 2119/17 del Comité de Ética en Uso Animal (Universidade Federal de Santa Catarina). Después de 30 minutos se administró la sobrecarga de glucosa (4 g/kg) vía oral a todos los animales y se realizó la toma de muestras de sangre en tiempos determinados. Los niveles de glucosa en sangre (NGS) se determinaron usando un glucómetro (Accu-Chek Performa®).

Determinación del contenido de glucógeno en el músculo sóleo y el hígado

Para determinar el contenido de glucógeno, 180 minutos después de la sobrecarga oral de glucosa se realizó la eutanasia mediante protocolo de sobredosis de anestesia inhalatoria con isoflurano y posterior decapitación en guillotina; posteriormente, fueron extraídos el músculo sóleo y el hígado de las ratas hiperglicémicas (grupos de control) y de aquellas sometidas a los tratamientos respectivos (grupos tratados). Los tejidos fueron tratados de acuerdo con una

metodología previamente validada y el contenido de glucógeno se cuantificó con el reactivo de yodo, y posteriormente se leyó en un espectrofotómetro a 460 nm.

Evaluación del efecto de la isoquercetina sobre la captación de glucosa [U-¹⁴C]-2-desoxi-D-glucosa en el músculo sóleo de rata

Las porciones de músculo sóleo de las ratas normoglicémicas, de aproximadamente 40 mg cada uno, fueron disecados y posteriormente preincubados durante 30 minutos e incubados durante 60 minutos a 37 °C en O₂/CO₂ (95 %: 5 %, v/v), a pH 7,4, en tampón Krebs Ringer-bicarbonato (KRB). A continuación se agregó isoquercetina (10 nM, 10 μM, 25 μM, 50 μM, 100 μM y 150 μM) al medio de incubación en presencia o ausencia de 100 μM HNMPA-AM, wortmanina (100 nM), colchicina (1 μM), N-etilmaleimida (1 nM), PD98059 (50 μM), SB239063 (10 μM), metil-beta-ciclodextrina (10 mM), actinomicina D (1 μM) o cicloheximida (350 μM). Los resultados de la captación de glucosa se expresaron como nmol de glucosa/mg de proteína de 4 ratas por grupo en tres experimentos independientes. El ¹⁴C-DG se midió después de la incubación en un espectrómetro de centelleo líquido (modelo LS 6500; Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman, Boston, EE. UU.).

Evaluación del efecto de la astragalina sobre la glicemia y la secreción de insulina

Para este ensayo se utilizaron ratas Wistar macho de 7-8 semanas de edad con un peso corporal de 180-210 g. Los animales recibieron alimento (Nuvital, Curitiba, PR, Brasil) y agua *ad libitum*. Todos los animales fueron monitoreados y mantenidos de acuerdo con las recomendaciones éticas del Consejo Brasileño de Medicina Veterinaria y del Colegio Brasileño de Experimentación Animal. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con el Comité de Ética en Uso Animal CEUA-UFSC (Protocolo PP2119/17). La eutanasia se realizó mediante protocolo de sobredosis de anestesia inhalatoria con isoflurano y posterior decapitación en guillotina.

Ensayo de tolerancia a la glucosa

Las ratas se sometieron a un ayuno de 12 horas, y se dividieron en 3 grupos de 6 animales cada uno. Grupo I: grupo de control hiperglicémico que recibió glucosa (4 g/kg); grupo II: hiperglicémico + astragalina (1 mg/kg); y grupo III: hiperglicémico + astragalina (10 mg/kg). Todos los tratamientos se administraron por vía oral mediante sonda orogástrica y los niveles de glucosa sérica e insulina plasmática se midieron antes de la administración del tratamiento (tiempo cero). La sobrecarga de glucosa se administró 30 minutos después del

tratamiento y posteriormente se determinaron la glucosa sérica y la insulina plasmática a los 15, 30, 60 y 180 minutos.

La medición de la insulina plasmática se realizó mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Todas las concentraciones de insulina se estimaron mediante medidas colorimétricas a 450 nm con un lector de placas ELISA (Organon Teknika, Roseland, EE. UU.) Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados de insulina plasmática se expresaron como $\mu\text{IU}/\text{ml}$.

Aislamiento de los islotes pancreáticos de rata

El páncreas de las ratas se extrajo cuidadosamente y se mantuvo en una placa de Petri con medio KRb-HEPES. A continuación, el tejido pancreático se cortó en trozos pequeños (2x2 mm) y se incubó en tubos de plástico con medio KRb-HEPES suplementado con colagenasa. Finalizada la incubación, la mezcla se transfirió a un tubo cónico, luego se resuspendió en 10 ml de medio libre de colagenasa y se centrifugó a temperatura ambiente durante 3 minutos en una centrífuga Excelsa Baby (modelo 206). El sobrenadante fue descartado y el sedimento se resuspendió en un medio KRb-HEPES nuevo. Este procedimiento de lavado se repitió cinco veces y durante los dos últimos lavados se dejó que los islotes sedimentaran sin centrifugación. Se transfirieron alícuotas del sedimento final con los islotes aislados a tubos Eppendorf con el medio de incubación KRb-HEPES.

Medición de la insulina basal

Los estudios de secreción de insulina *in vitro* se llevaron a cabo con islotes pancreáticos aislados de ratas euglicémicas. Los islotes se preincubaron durante 60 minutos y se incubaron (tiempo de tratamiento) a 37 °C en KRb pH 7,4. La incubación se realizó en ausencia o presencia de 100 μM de astragalina. Al final de la incubación se tomó una alícuota para realizar la cuantificación de insulina mediante ELISA. Las cantidades totales de proteína en el medio de incubación y los islotes se determinaron mediante el método de Lowry. Los resultados se expresan como μIU de insulina/ μg de proteína.

Determinación del influjo de calcio

Como primer paso los islotes pancreáticos de rata aislados fueron preincubados con KRb- HEPES buffer a 37 °C durante 10 minutos. En algunos experimentos se agregaron los bloqueadores de canales o inhibidores de quinasas durante los últimos 15 minutos del periodo de preincubación y se mantuvieron durante todo el período de incubación (esta información se especifica en las leyendas de las figuras). Los fármacos utilizados en este ensayo fueron: diazóxido (250 μM), glibenclamida (20 μM), nifedipina (1 μM), BAPTA-AM (50 μM), RO

31-8240 (20 μM), H89 (10 μM), taspigargina (1 μM) y dantroleno (50 μM). Adicionalmente se añadió cloruro de lantano (10 mM) a 2 °C a las muestras para inhibir el flujo de calcio. A continuación, los tubos se centrifugaron durante 1 minuto a 1500 g conservando el sobrenadante, y posteriormente se realizó un lavado de los islotes con una solución fría de cloruro de lantano. Luego los islotes se homogeneizaron con 300 μl de solución de NaOH 0,5 M y se hirvieron a 100 °C durante 5 minutos. Se tomaron alícuotas de 50 μl de cada muestra para medir la radioactividad en líquido de centelleo utilizando un espectrómetro de centelleo líquido beta de rack LKB (modelo LS 6500; Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, EE. UU.) Se utilizaron alícuotas de 5 μl para la cuantificación de proteínas.

Después de 60 min de incubación con $^{45}\text{Ca}^{2+}$ se produce el equilibrio en los depósitos intracelulares de calcio y calcio extracelular, lo cual significa que la cantidad de calcio es equivalente en los medios intra- y extracelular. Después de 60 minutos, con la adición de sustancias exógenas (fármacos, solutos, inhibidores) se puede modificar el medio de incubación, estrategia experimental para estudiar el mecanismo de afluencia de calcio en células aisladas, fragmentos de tejido o cultivo celular, lo cual se tuvo en cuenta para realizar los estudios sobre la entrada de calcio.

Resultados y discusión

Evaluación del efecto hipoglicemiante del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* y de sus fracciones

El ensayo de tolerancia a la glucosa *in vivo* se utilizó como un punto de partida o *screening* que permitió identificar las fracciones más promisorias del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*. Como se observa en la figura 1, el extracto de hojas de *P. ligularis* y su fracción etanólica mostraron una reducción de la glicemia de 23 % y 25 %, respectivamente, en comparación con el grupo hiperglicémico a los 120 minutos de ensayo, mientras que la glibenclamida utilizada como control positivo produjo una disminución de la glicemia del 27 %. Por otro lado, la fracción acuosa no tuvo diferencia significativa con respecto al grupo hiperglicémico durante el periodo de tiempo evaluado; esto permitió concluir que los compuestos del extracto acuoso con menor polaridad podrían estar involucrados en la disminución de la glucosa sérica para mejorar la tolerancia a la glucosa.

De acuerdo con los resultados, la fracción etanólica presentó la mayor reducción de la glicemia, por lo que se procedió a realizar un experimento de dosis-respuesta con el fin de elegir la dosis con mejores resultados.

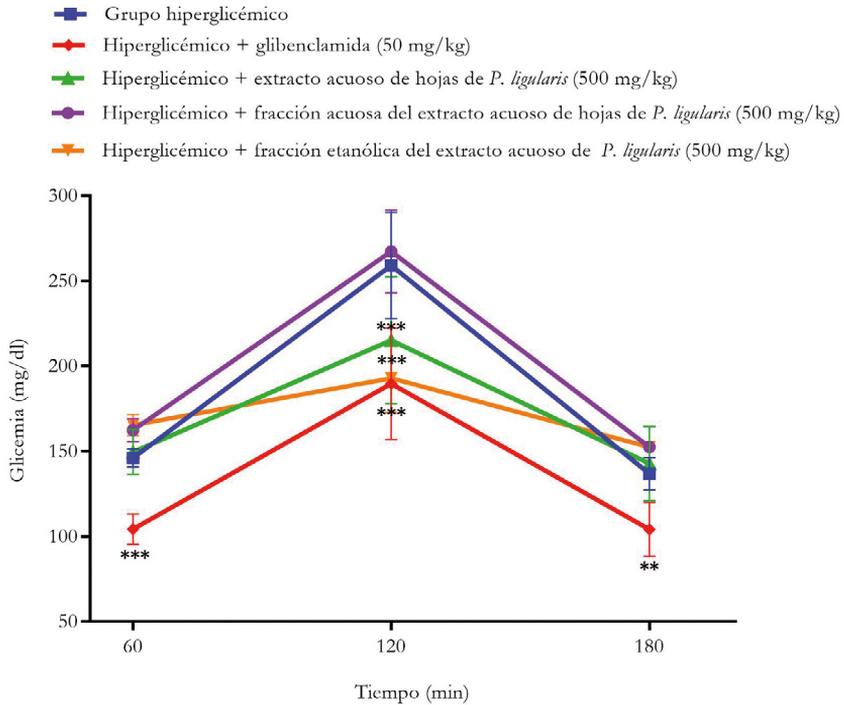


Figura 1. Efecto del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* y de sus fracciones en ratas hiperglicémicas.

Nota: los valores se expresan como media \pm SEM ($n = 6$). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$, en comparación con el grupo de control hiperglicémico respectivo.

Como se observa en la figura 2, la dosis de 125 mg/kg de la fracción etanólica redujo la glucosa sérica en aproximadamente 17 % a los 180 minutos; la dosis de 250 mg/kg redujo la glucosa sérica alrededor de 30 % y 60 % a los 60 y 180 minutos, respectivamente; mientras que la dosis de 500 mg/kg logró reducir 15 %, 20 %, 35 % y 50 % a los 15, 30, 60 y 180 minutos, respectivamente. De acuerdo con esto, la reducción de la glicemia posterior a la administración de la fracción etanólica se presentó de forma dosis-dependiente.

Posteriormente, se realizó una curva dosis-respuesta con el fin de evaluar el efecto de la fracción etanólica del extracto acuoso de *P. ligularis* después de la sobrecarga oral de glucosa sobre el músculo sóleo y el contenido de glucógeno hepático (figura 3). La fracción etanólica de 500 mg/kg aumentó significativamente el contenido de glucógeno tanto muscular como hepático en casi un 40 % y 65 %, respectivamente, en comparación con el grupo hiperglicémico; mientras que la fracción etanólica en dosis de 250 mg/kg aumentó significativamente solo el contenido de glucógeno hepático en casi un 35 %

en comparación con el grupo hiperglicémico. Por otro lado, la fracción a 125 mg/kg no presentó ningún aumento significativo comparado con el grupo hiperglicémico.

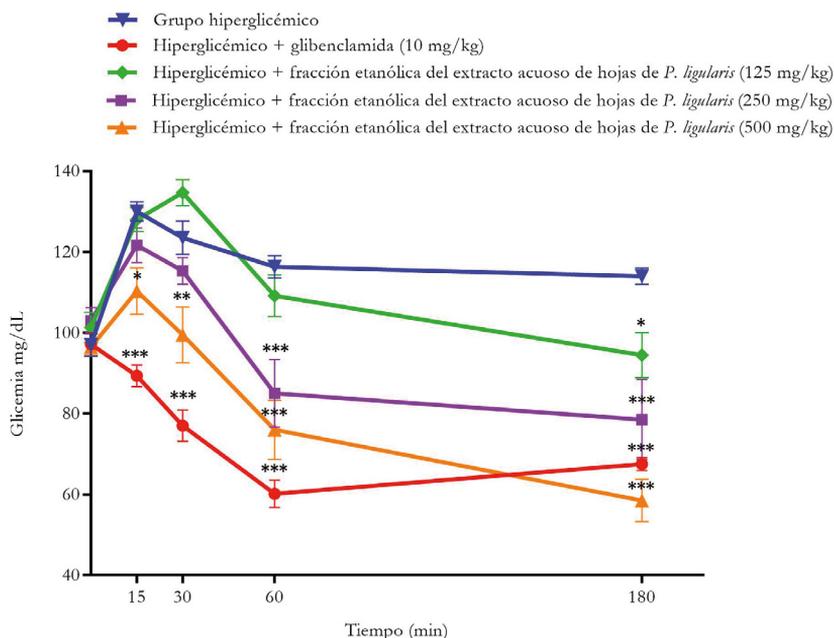


Figura 2. Curva dosis-respuesta de la fracción etanólica del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* sobre glucosa sérica.

Nota: los valores se expresan como media \pm SEM, ($n = 6$). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$, en comparación con el grupo de control hiperglicémico respectivo.

De acuerdo con la literatura, varios extractos vegetales aumentan la glucogénesis debido al aumento del contenido de glucógeno hepático y muscular; por lo tanto, este efecto se considera un buen marcador de actividad hipoglicémica¹¹.

Tanto el extracto acuoso de hojas *P. ligularis* como su fracción etanólica aumentaron el contenido de glucógeno hepático y muscular de forma dosis-dependiente, que se atribuye a un posible efecto secretagogo y mimético de la insulina, lo cual se demuestra por la reducción de la glicemia y la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético y en el hígado. Sin embargo, la dosis de 500 mg/kg de la fracción etanólica disminuyó la glicemia a aproximadamente 60 mg/dl a los 180 minutos, lo cual se considera hipoglicemia y no es beneficioso. Por lo tanto, para futuros estudios se recomienda utilizar dosis bajas de la fracción etanólica, como 250 mg/kg.

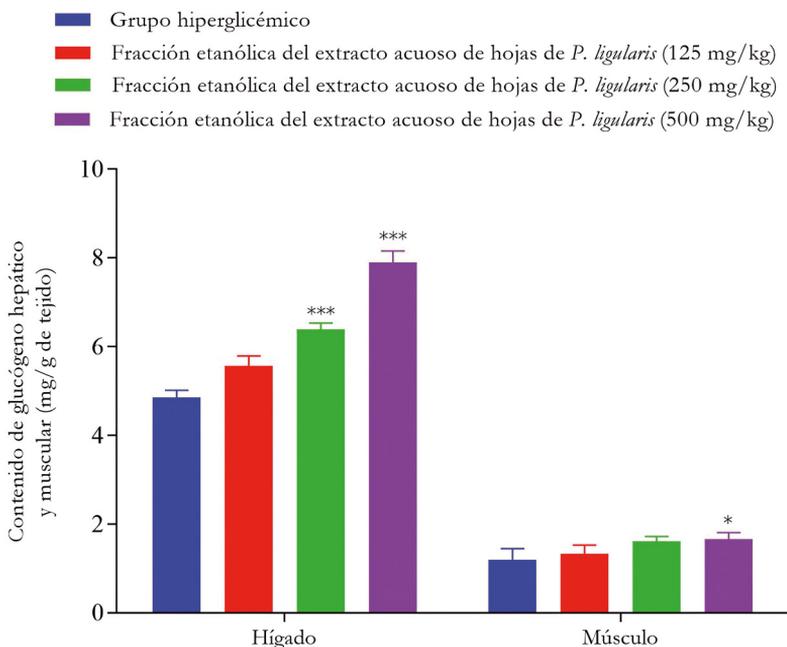


Figura 3. Efecto de las fracciones etanólicas del extracto acuoso de las hojas de *P. ligularis* sobre el contenido de glucógeno en el músculo sóleo y en el hígado.

Nota: los valores se expresan como media \pm SEM ($n = 6$). * $p \leq 0,05$ y *** $p \leq 0,001$, en comparación con el grupo de control hiperglicémico respectivo.

Con el fin de identificar los metabolitos del extracto de hojas de *P. ligularis* responsables de actuar como agentes antihiperglicémicos, se realizó un perfil cromatográfico del extracto de hojas de *P. ligularis* y de su fracción etanólica (figura 4).

De acuerdo con el perfil cromatográfico, tanto en el extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* (α) como en su fracción etanólica (β) uno de sus compuestos mayoritarios es el flavonoide quercetina-3-*O*- β -D-glucopiranosido (isoquercetina), cuya estructura también se presenta en la figura 4. Estudios previos han reportado el efecto antihiperglicémico de este flavonoide en un modelo en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina¹².

Con base en estos resultados, el siguiente paso fue realizar ensayos *in vitro* con el fin de esclarecer el efecto de la isoquercetina en la captación de glucosa por el músculo sóleo, así como indagar su mecanismo de acción.

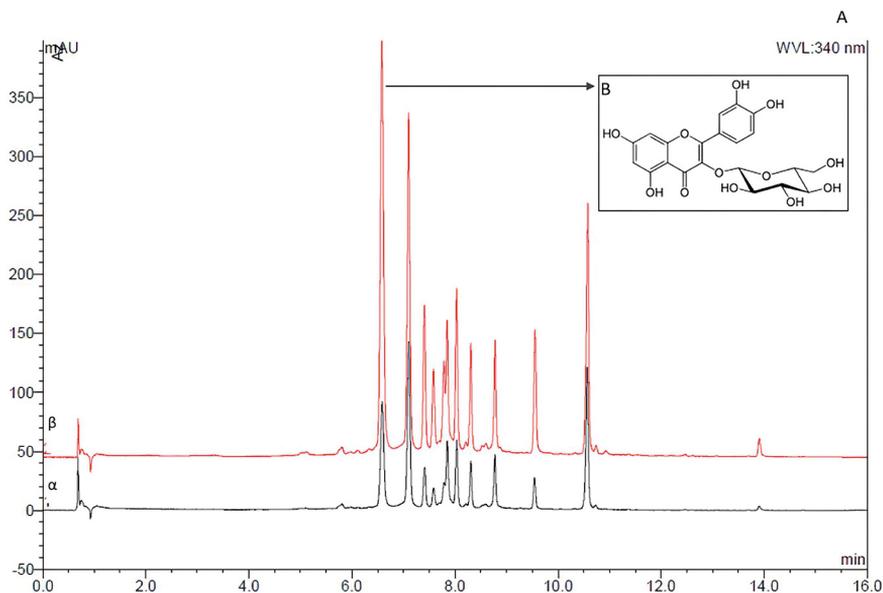


Figura 4. Perfil cromatográfico del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* (α) y de su fracción etanólica (β) a 340 nm (A), y estructura de la quercetina-3-O- β -D-glucopiranosido (isoquercetina) (B).

Evaluación del efecto de la isoquercetina sobre la captación de glucosa en el músculo sóleo

El efecto de la isoquercetina sobre la captación de glucosa en el músculo sóleo de rata se evaluó *ex vivo* luego de 60 minutos de incubación. Como se observa en la figura 5, el efecto estimulante de la isoquercetina sobre la captación de glucosa fue de 67 %, 92 %, 93 % y 129 % a 10, 25, 50 y 150 μM respectivamente, mientras que en el grupo de control positivo la insulina estimuló al 123 % la captación de glucosa; estos porcentajes se expresan con respecto a la captación de glucosa del control.

Aunque el tratamiento agudo con isoquercetina mostró un porcentaje de captación de glucosa similar a de la insulina esto fue solo a una concentración 103 veces mayor en comparación con la insulina. De acuerdo con los resultados, se seleccionó isoquercetina a 50 μM para investigar los mecanismos de acción de este flavonol.

El siguiente paso fue investigar el posible mecanismo de acción por el cual la isoquercetina induce la captación de glucosa. La activación del receptor de insulina y de señalización PI3-K es esencial para el proceso de translocación de las vesículas que contienen GLUT4⁵. Con el fin de evaluar si la vía de señalización de la insulina se activa mediante la isoquercetina produciendo

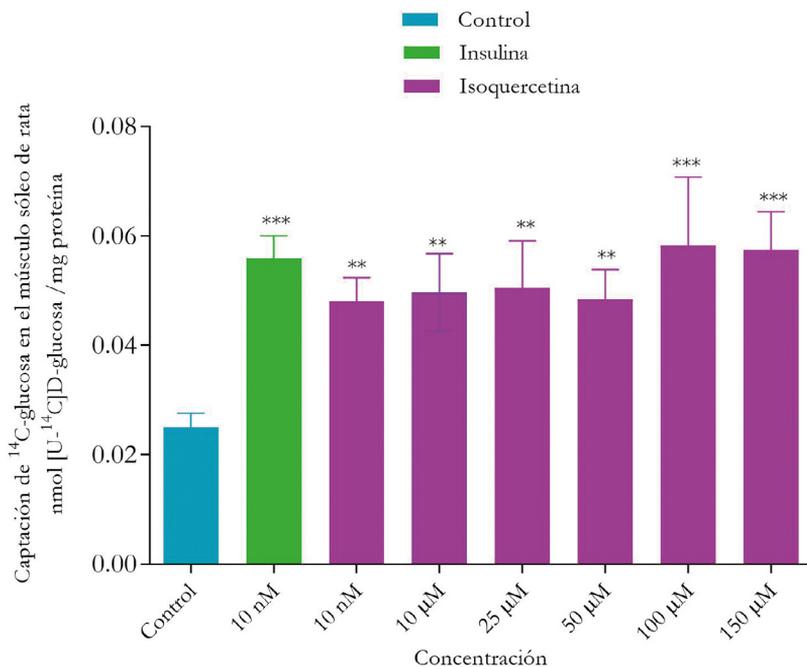


Figura 5. Efecto de la isoquercetina sobre la captación de glucosa en el músculo sóleo.

Nota: tiempo de preincubación = 30 min; tiempo de incubación = 60 min. Los valores se expresan como la media \pm SEM con $n = 4$. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$, en comparación con el grupo de control respectivo.

el efecto estimulante sobre la captación de glucosa, se utilizaron 100 μM de HNMPA-(AM)₃, un inhibidor de la actividad del receptor de insulina (figura 6) y wortmanina, 100 nM (figura 7).

El efecto estimulante de isoquercetina sobre la captación de glucosa no se alteró por la presencia de HNMPA-(AM)₃, lo cual sugiere que el efecto inductor de la isoquercetina no implica la actividad del receptor de insulina. Sin embargo, el efecto estimulante de isoquercetina sobre la captación de glucosa fue inhibido por wortmanina en un 30 %, lo cual indica la posible utilización de esta vía de señalización. Wortmanina es un inhibidor de la serina/treonina quinasa PI3K, la cual activa Akt realizando un paso fundamental en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática¹³; de esta forma, la PI3K es parte de la transducción de señales aguas abajo de la isoquercetina para la captación de glucosa. De acuerdo con estudios previos, el flavonoide kaempferol-3-neohesperidósido también mostró un efecto estimulante sobre la síntesis de glucógeno a través de PI3K, ya que su efecto fue inhibido por wortmanina¹⁴.

Posteriormente, se estudió el rol de los microtúbulos, los cuales son cruciales en el movimiento de las vesículas que contienen GLUT4 hacia la membrana plasmática¹⁵. Para esto se realizó el ensayo de captación de glucosa utilizando 1 μ M de colchicina, un agente que altera la integridad de los microtúbulos. Como se observa en la figura 7, el efecto estimulante de la isoquercetina sobre la captación de glucosa se redujo en aproximadamente un 30 % en comparación con el grupo de control, lo que indica que se requiere la integridad del citoesqueleto para que la isoquercetina ejerza su efecto estimulante completo.

El proceso de translocación y fusión de GLUT4 ocurre a través de SNARE (receptores solubles de proteínas de unión al factor sensible a N-etilmaleimida), microtúbulos y filamentos de actina, los cuales dirigen el movimiento de las vesículas desde la región perinuclear a la membrana en respuesta a la insulina¹⁶. Para evaluar la influencia de la isoquercetina en el proceso de acoplamiento y fusión de las vesículas en la membrana plasmática se utilizó N-etilmaleimida

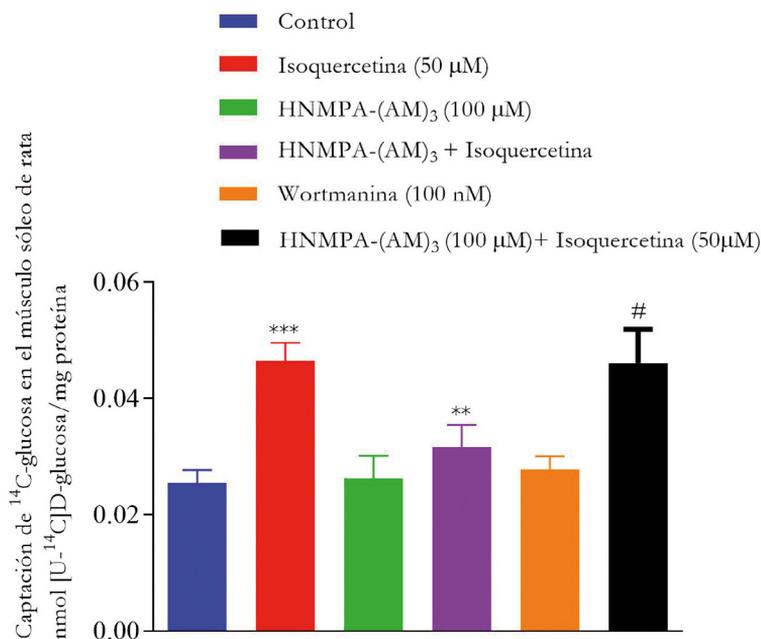


Figura 6. Efecto de HNMPA-(AM)₃ sobre la acción estimulante de isoquercetina en la captación de ¹⁴C-glucosa en el músculo sóleo de rata.

Nota: los inhibidores estuvieron presentes en el período de preincubación y durante el período de incubación. Tiempo de preincubación = 30 min; tiempo de incubación = 60 min. Los valores se expresan como media \pm SEM con $n = 4$. ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$, en comparación con el grupo de control respectivo; # $p \leq 0,05$, en comparación con el grupo de isoquercetina respectivo.

(1 mM), un agente alquilante que inhibe el tráfico vesicular y los eventos de fusión en la membrana plasmática¹⁷. Adicionalmente, para evaluar los microdominios lipídicos durante el efecto estimulador de la isoquercetina sobre la absorción de glucosa se utilizó metil- β -ciclodextrina con/sin el flavonoide; este compuesto agota el colesterol de la membrana plasmática y altera la captación de glucosa¹⁸ (figura 8).

Como se observa en la figura 8, se presentó una diferencia significativa entre los grupos evaluados con isoquercetina en comparación con los de isoquercetina más metil- β -ciclodextrina o N-etilmaleimida, lo cual permitió concluir que el efecto inductor de la isoquercetina sobre la captación de glucosa no se ve alterado por la presencia de estos dos inhibidores.

Con el fin de evaluar el rol de la isoquercetina en la activación de GLUT4 en el músculo sóleo, se empleó SB239063, un inhibidor de la vía p38 MAPK de segunda generación, específicamente de los subtipos α y β de p38¹⁹, el cual se incubó con/sin isoquercetina (figura 9).

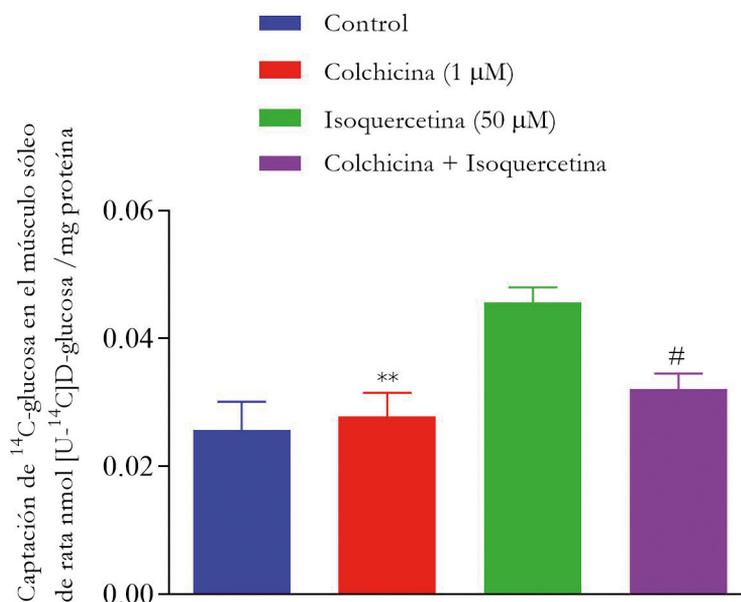


Figura 7. Efecto de colchicina sobre la acción estimulante de isoquercetina en la captación de ¹⁴C-glucosa en el músculo sóleo de rata.

Nota: los inhibidores estuvieron presentes en el período de preincubación y durante el período de incubación. Tiempo de preincubación = 30 min; tiempo de incubación = 60 min. Los valores se expresan como la media \pm SEM con $n = 4$. ** $p \leq 0,01$, en comparación con el grupo de control respectivo; # $p \leq 0,05$, en comparación con el grupo de isoquercetina respectivo.

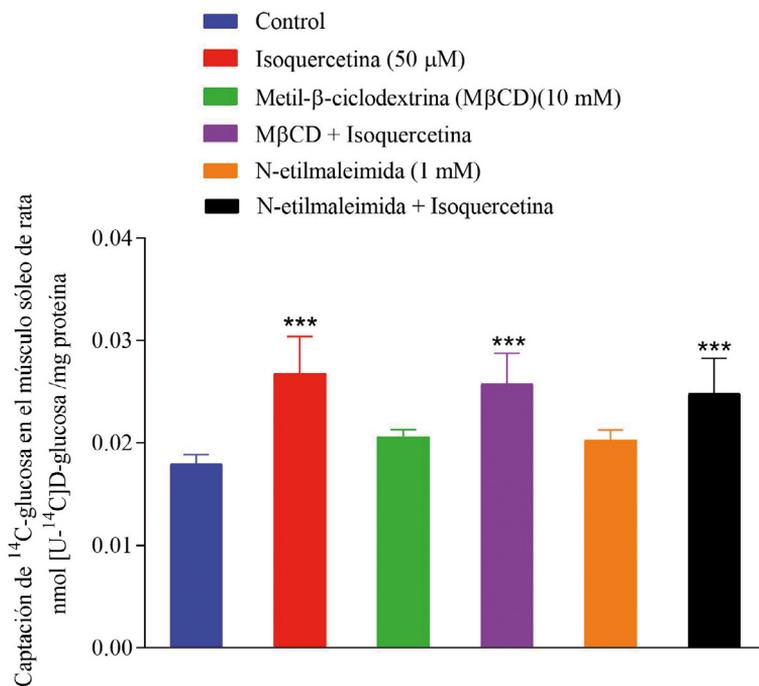


Figura 8. Efecto de metil-β-ciclodextrina y de N-etilmaleimida sobre la acción estimulante de la isoquercetina en la captación de ¹⁴C-glucosa en el músculo sóleo.

Nota: los inhibidores estuvieron presentes en el período de preincubación e incubación. Tiempo de preincubación = 30 min; tiempo de incubación = 60 min. Los valores se expresan como media ± SEM con $n = 4$. *** $p < 0,001$, en comparación con el grupo de control respectivo.

Para continuar evaluando la posible actividad de la isoquercetina en la etapa de traducción de proteínas a través de la ruta MAPK/ERK, se utilizó el inhibidor PD98059, el cual se une a las formas inactivas de MEK1 y previene la activación por otros activadores de vías como c-Raf, evita la fosforilación de ERK y, en consecuencia, previene la activación de la cascada de MAP quinasa p38²⁰ (figura 9).

Como se observa en la figura 9, el efecto estimulante de la isoquercetina sobre la captación de glucosa mostró una reducción significativa en presencia de PD98059 y SB239063, lo que indica la presencia de eventos de regulación nuclear por este flavonoide.

Posteriormente, se evaluó el efecto de la isoquercetina en la transcripción del ADN y la traducción del ARNm en presencia/ausencia de este flavonoide, con el fin de establecer la influencia sobre su efecto estimulante en la captación de glucosa en el músculo sóleo (figura 10).

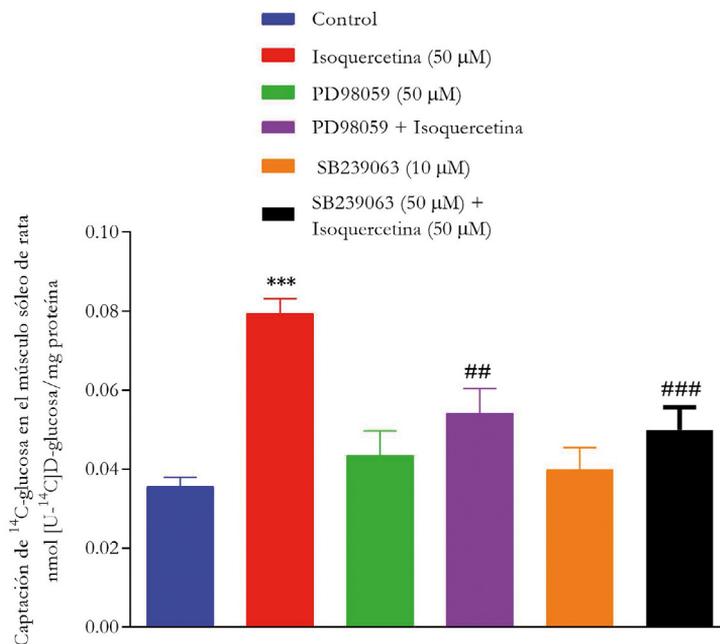


Figura 9. Efecto de SB239063 y PD98059 sobre la acción estimulante de la isoquercetina en la captación de ^{14}C -glucosa en el músculo sóleo de rata.

Nota: los inhibidores estuvieron presentes en el período de preincubación y durante el período de incubación. Tiempo de preincubación = 30 min; tiempo de incubación = 60 min. Los valores se expresan como media \pm SEM con $n = 4$. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, en comparación con el valor respectivo del grupo control. ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, en comparación con el grupo de isoquercetina respectivo.

Como se observa en la figura 10, la presencia de actinomicina D, un inhibidor de la transcripción del ADN, no afectó la captación de glucosa estimulada por isoquercetina. Sin embargo, la incubación de isoquercetina y cicloheximida, un inhibidor de la traducción del ARNm, redujo significativamente el efecto de este flavonoide sobre la absorción de glucosa, lo que permite concluir que la isoquercetina mejora la captación de glucosa al aumentar la traducción del ARNm de GLUT4.

De acuerdo con estudios previos, algunos flavonoides estimulan la captación de glucosa en el músculo esquelético por GLUT4, ya sea a través de la vía MEK/ERK, como es el caso de apigenina-6-C-(2''-O- α -L-ramnopiranosilo)- β -L-fucopiranosido²¹, rutina²² y kaempferol-3-neohesperidósido¹⁴, o por medio de la vía MAPK p38, como ha sido reportado para baicalina, e incluso por ambas vías en el caso de kaempferitina²³.

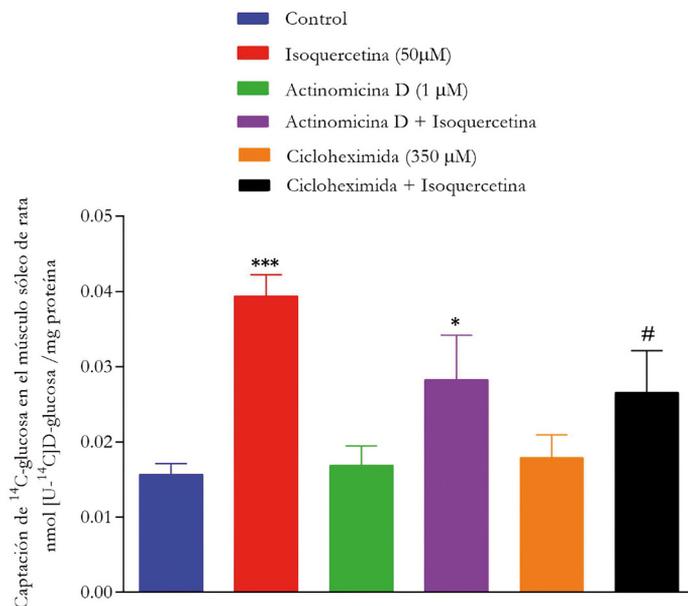


Figura 10. Efecto de actinomicina D y cicloheximida sobre el efecto estimulante de isoquercetina en la captación de ^{14}C -glucosa en el músculo sóleo de rata.

Nota: los inhibidores estuvieron presentes en la preincubación y durante el período de incubación. Tiempo de preincubación = 30 min; tiempo de incubación = 60 min. Los valores se expresan como la media \pm SEM con $n = 4$. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, en comparación con el grupo de control respectivo; # $p < 0,05$, en comparación con el grupo de isoquercetina respectivo.

De forma similar a la isoquercetina, tres homoisoflavonoides de *Portulaca oleracea* L. aumentaron la captación de glucosa mediante la inducción de la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática por la activación de las vías PI3K/Akt y AMPK en los adipocitos 3T3-L1²⁴.

La isoquercetina cumple un papel fundamental en el efecto estimulante sobre la captación de glucosa del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* y de su fracción etanólica. Con el fin de identificar la influencia de otros metabolitos presentes en este extracto sobre la homeostasis de la glucosa, se llevaron a cabo estudios *in vivo* con el flavonoide kaempferol-3-*O*- β -glucósido (astragalina), que de acuerdo con estudios previos también se ha identificado en el extracto de hojas de *P. ligularis*.

Evaluación del efecto de la astragalina sobre la glicemia y la secreción de insulina

El kaempferol-3-O- β -glucósido (astragalina) es un flavonoide al cual se le han atribuido diversas actividades terapéuticas tales como: antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria, antioxidante, neuro- y cardioprotectora, antiulcerosa, antitumoral y antidiabética, entre otras²⁵. También se ha reportado que la astragalina es uno de los metabolitos responsables de la actividad antidiabética de algunos extractos vegetales²⁶⁻²⁷. Adicionalmente, se ha demostrado que la astragalina reduce la retinopatía diabética e inhibe la actividad de la alfa-glucosidasa y la alfa-amilasa intestinal²⁸⁻²⁹. Este estudio tuvo como objetivo evaluar los efectos agudos *in vivo* de la astragalina sobre la glicemia y la secreción de insulina; además, se estudió el papel de la entrada de calcio y de la secreción de insulina en el mecanismo de acción de la astragalina en islotes pancreáticos aislados de ratas.

Como primer paso se realizó el ensayo *in vivo* de tolerancia a la glucosa y mediciones de insulina plasmática. En la figura 11 se observa que la glucosa sérica se redujo significativamente, después del tratamiento oral con 10 mg/kg de astragalina, en ratas durante el período evaluado. Esta dosis de astragalina disminuye la glicemia en un 30 %, 33 %, 32 % y 31 %, respecto al control, a los 15, 30, 60 y 180 minutos, respectivamente.

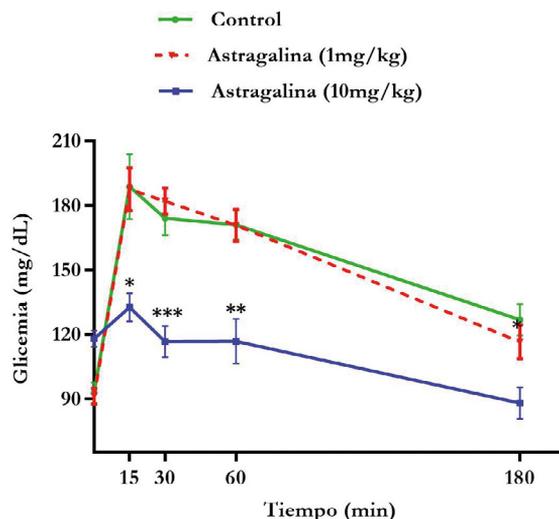


Figura 11. Efecto de la astragalina (1 mg/kg y 10 mg/kg) sobre la curva de tolerancia oral a la glucosa en ratas.

Nota: los valores se expresan como la media \pm SEM, $n = 6$. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$, cuando se compara con el valor respectivo en el grupo de control hiperglicémico y usando ANOVA de una vía seguido de la prueba Bonferroni para cada uno de los tiempos en los que se tomaron las muestras.

En este mismo experimento se determinó el nivel de insulina plasmática en ratas en estado de ayuno a los 15, 30, 60 y 180 minutos después de la carga oral de glucosa (4 g/kg), como se observa en la figura 12. Se detectó un efecto significativo y potente de la astragalina sobre la secreción de insulina durante el período estudiado, con aumentos de aproximadamente 220 %, 95 %, 98 % y 183 %, en los momentos de muestreo, con respecto al grupo de control hiperglicémico. Los resultados demostraron claramente que la astragalina potencia la primera (entre 4-10 minutos) y la segunda fase (mantenimiento gradual del aumento y durabilidad extendida) de la secreción de insulina.

Las señales de calcio regulan tanto la primera como la segunda fase de la secreción de insulina, y el calcio actúa como un segundo mensajero en esta secreción en las células β pancreáticas. Por lo tanto, a continuación se evaluó el efecto de la astragalina (100 μ M) sobre la entrada de calcio en los islotes pancreáticos aislados de rata a los 1, 5 y 10 minutos. De acuerdo con la figura 13, la astragalina aumentó significativamente la entrada de calcio (1,4 veces) en comparación con el grupo de control a los 10 minutos.

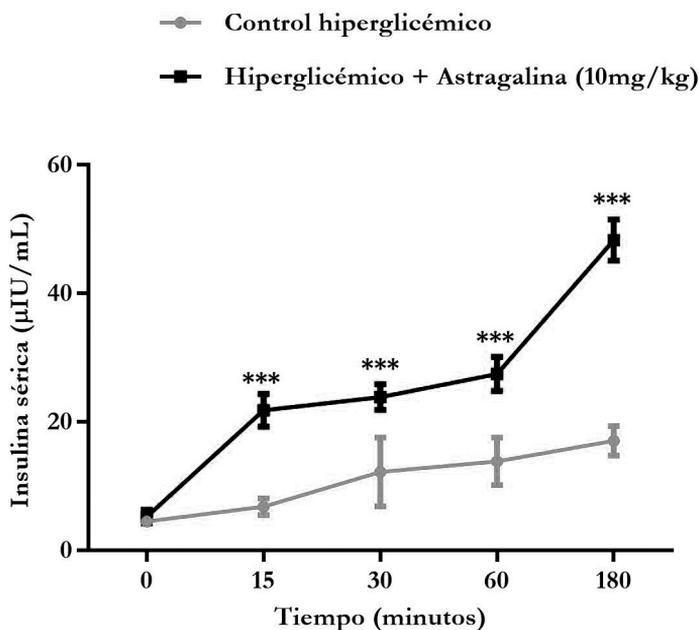


Figura 12. Efecto de la astragalina sobre la secreción de insulina plasmática en ratas hiperglicémicas.

Nota: los valores se expresan como la media \pm SEM, $n = 4$. ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado con el valor respectivo del grupo de control hiperglicémico, y utilizando la prueba t de Student para cada uno de los momentos en que se tomaron las muestras.

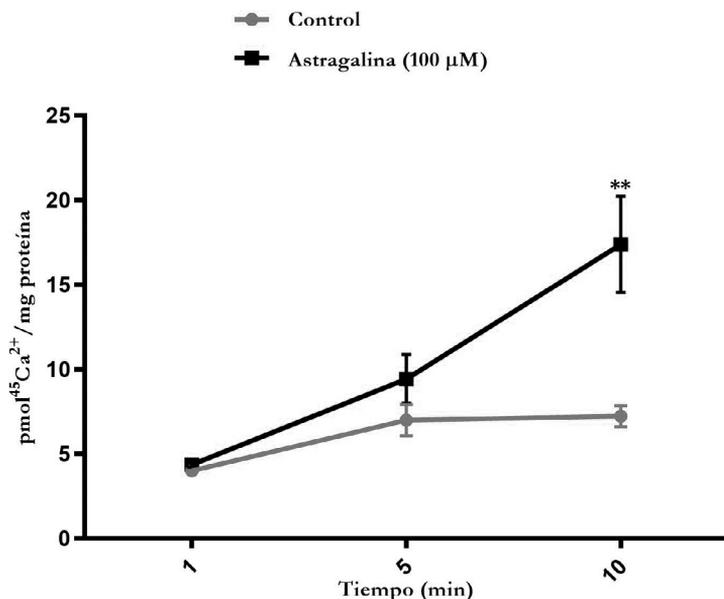


Figura 13. Evolución en el tiempo del efecto de la astragalina sobre el influjo de ⁴⁵Ca²⁺ en islotes pancreáticos aislados de rata.

Nota: los islotes pancreáticos se preincubaron durante 60 minutos con 0,1 μCi/ml de ⁴⁵Ca²⁺. Luego se incubaron con/sin 100 μM de astragalina durante 1, 5 y 10 minutos. Los valores se expresan como la media ± SEM, n = 5. ** p ≤ 0,01 cuando se compara con el grupo de control y se usa la prueba t de Student para cada uno de los momentos en que se tomaron las muestras.

A continuación, se estudió el efecto de diferentes concentraciones de astragalina sobre el influjo de calcio. Como se observa en la figura 14, la astragalina (25 μM) no afectó significativamente la entrada de calcio; sin embargo, se observaron aumentos en el influjo de calcio de 77 %, 89 % y 88 % para las concentraciones de astragalina de 50 μM, 100 μM y 150 μM, respectivamente. Por lo tanto, para los ensayos posteriores se utilizó una concentración de astragalina de 100 μM con 10 minutos de incubación.

De acuerdo con los resultados, la astragalina, al igual que otros flavonoides como la quercetina y la rutina, libera insulina y aumenta la entrada de calcio en los islotes pancreáticos aislados de ratas²². Cabe señalar que las concentraciones de astragalina utilizadas en estos ensayos ya habían sido previamente reportadas por otros autores en ensayos *in vitro*, y así habían demostrado el rango de concentraciones con actividad biológica³⁰.

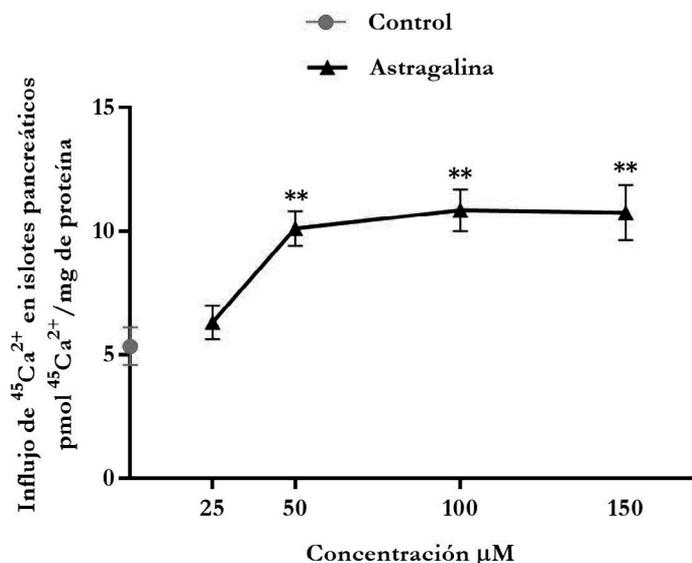


Figura 14. Curva dosis-respuesta del efecto de la astragalina sobre el influjo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en los islotes pancreáticos de ratas de 50 días de edad.

Nota: tiempo de preincubación = 60 min; incubación = 10 min. Los valores se expresan como las medias \pm SEM, $n = 5$. ** $p \leq 0,01$, comparado con el grupo control y usando la prueba t de Student para cada una de las concentraciones.

Con el fin de investigar si el aumento en el influjo de calcio inducido por la astragalina se produce a través de los canales de K^+_{ATP} , se utilizó glibenclamida (200 μM) y diazóxido (250 μM). La glibenclamida, al igual que otras sulfonilúreas, es un bloqueador del canal K^+_{ATP} ; por lo tanto, el objetivo de su uso en este ensayo fue bloquear estos canales para provocar la despolarización que es esencial para la secreción de insulina³¹. Por otro lado, el diazóxido ejerce el efecto contrario, uniéndose con el dominio SUR1 de los canales de K^+_{ATP} y permitiendo su activación, lo cual evita la despolarización de la membrana³².

Como se observa en la figura 15, cuando se utilizó glibenclamida en presencia de astragalina el influjo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ aumentó 2,3 veces en comparación con el control. Sin embargo, cuando se utilizó astragalina junto con glibenclamida no se observó ningún efecto estimulante adicional. Como se esperaba, el diazóxido disminuyó significativamente la afluencia de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, y en presencia de este compuesto el efecto estimulante de la astragalina disminuyó en un 47,5 %. Aunque la presencia de glibenclamida y astragalina no cambió el efecto estimulante del compuesto sobre el influjo de calcio, este estudio sugiere que el efecto de la astragalina sobre el influjo de calcio en los islotes pancreáticos

depende de los canales de K^+_{ATP} de la membrana plasmática; esta hipótesis se deriva del hecho de que la presencia de astragalina ejerció un efecto similar al de la glibenclamida sobre los canales de potasio. La despolarización mediada por los canales de K^+_{ATP} se produce durante la primera fase de secreción de la insulina y está mediada por vesículas de fácil liberación, lo que explica el efecto de la astragalina durante la primera fase de liberación de insulina de las células β pancreáticas.

De acuerdo con estudios previos, otros flavonoides, como miricetina, kaempferol y quercetina, también aumentaron la despolarización y la secreción de insulina³³⁻³⁵.

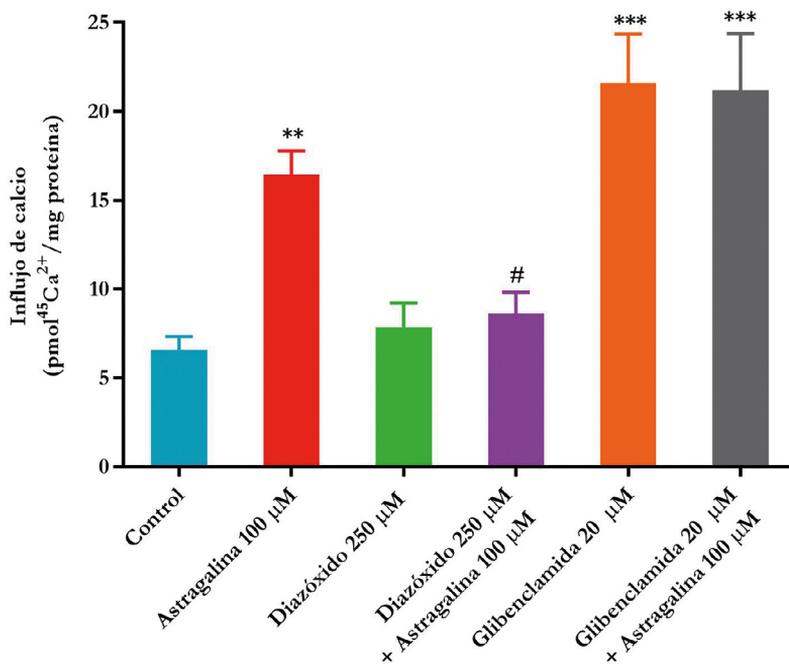


Figura 15. Participación de los canales de potasio en el efecto estimulante de la astragalina sobre el influjo de $^{45}Ca^{2+}$ en los islotes pancreáticos.

Nota: los islotes se incubaron con glibenclamida (20 μ M) o diazóxido (250 μ M) durante los últimos 15 min de la preincubación y durante la incubación. Tiempo de preincubación = 60 min; incubación = 10 min. Los valores se expresan como la media \pm SEM, $n = 5$. ** $p < 0,01$, *** $p \leq 0,001$, en comparación con el grupo de control; # $p < 0,05$, en comparación con el grupo de astragalina y utilizando ANOVA de una vía, seguido de la prueba Bonferroni.

El metabolismo de la glucosa en las células β pancreáticas activa varias vías intracelulares, incluida la señalización intracelular de Ca^{2+} a través de proteínas como L-VDCC³⁶. El metabolismo de la glucosa conduce al cierre de los canales de K^+_{ATP} , la despolarización de la membrana plasmática y la entrada de Ca^{2+} a través de L-VDCC, seguidos de la exocitosis de gránulos de insulina. Se han observado L-VDCC disfuncionales en las células β en pacientes diabéticos y también en modelos de animales diabéticos³⁷. Por lo tanto, el siguiente paso en esta investigación fue evaluar el papel de los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L (L-VDCC) y calcio intracelular en el efecto estimulante de la astragalina sobre el flujo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

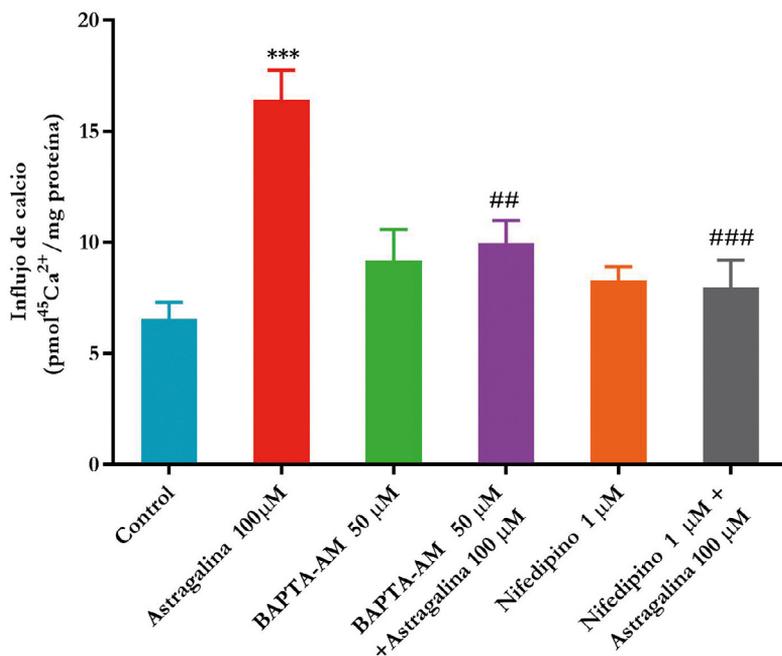


Figura 16. Participación de los canales de calcio dependientes del voltaje y de las reservas de calcio intracelular en el efecto de la astragalina sobre el flujo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en los islotes pancreáticos.

Nota: nifedipino (1 μM) y BAPTA-AM (50 μM) estuvieron presentes durante los últimos 15 minutos de preincubación y durante la incubación. Preincubación = 60 min; incubación = 10 min. Los valores se expresan como la media \pm SEM, $n = 5$. *** $p \leq 0,001$, en comparación con el grupo de control; ## $p \leq 0,01$ y ### $p \leq 0,001$, en comparación con el grupo de astragalina y utilizando ANOVA de una vía, seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni.

El aumento abrupto del calcio intracelular tanto del medio extracelular como de las reservas internas del retículo endoplasmático, es determinante para la secreción de insulina por las células β . En este estudio se utilizó BAPTA-AM como quelante del calcio intracelular. Como se observa en la figura 16, en presencia de los inhibidores nifedipino (bloqueador de L-VDCC) y BAPTA-AM la entrada de calcio no aumentó, mientras que el efecto estimulante de la astragalina disminuyó en un 52 % y 39 %, respectivamente. Algunos estudios han demostrado que otros flavonoides, como rutina, quercetina y kaempferol, exhiben vías de señalización intracelular similares^{22, 38-39}.

La activación de las proteínas PKC y PKA, implicadas en varias vías de transducción de señales, puede conducir a un ligero aumento de la afluencia de Ca^{2+} .⁴⁰ Por lo tanto, se estudió la implicación de estas quinasas en el efecto estimulante de la astragalina sobre la entrada de calcio en células pancreáticas aisladas. Para esto, los islotes se incubaron con dos inhibidores: RO31-0432, un inhibidor de PKC, y H89, un inhibidor de la proteína PKA AMP-cíclico dependiente. Cuando se incubó astragalina en presencia de estos inhibidores se observaron disminuciones significativas, del 56 % y 43 % respectivamente, en el efecto estimulante de la astragalina sobre el influjo de calcio, lo que indica que dicha estimulación está mediada por la acción de estas proteínas quinasas (figura 17).

Estudios previos han demostrado que la activación de la PKC modula la secreción de L-VDCC e insulina en las células β ⁴¹. Otros flavonoides que activan la PKC y PKA también influyen en la homeostasis de la glucosa.

Con el fin de determinar la implicación de las reservas de calcio en el efecto estimulante de la astragalina sobre la entrada de calcio en los islotes pancreáticos, estos se incubaron en presencia de tapsigargina (1 μM) y dantroleno (50 mM). La tapsigargina es un inhibidor no competitivo de SERCA y de una bomba de calcio ATPasa dependiente ubicada en la membrana del retículo endoplasmático, el cual es responsable de la recaptación de calcio en el retículo endoplasmático cuando la concentración dentro de este es baja; la inhibición de esta bomba conduce a una disminución de los niveles de calcio en el retículo endoplasmático y a un aumento del calcio citosólico manteniendo la captación de calcio extracelular basal.

El papel de los receptores de rianodina (RyR) también fue evaluado; estos receptores son activados por pequeñas elevaciones en la concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), causando el efecto conocido como “liberación de calcio mediada por calcio”. Este efecto amplifica la señal de calcio producida por otros mecanismos, como la apertura de los canales de calcio presentes en la membrana plasmática, o mediante la inhibición de la bomba SERCA. Para estudiar el RyR se utilizó dantroleno, un bloqueador de RyR.

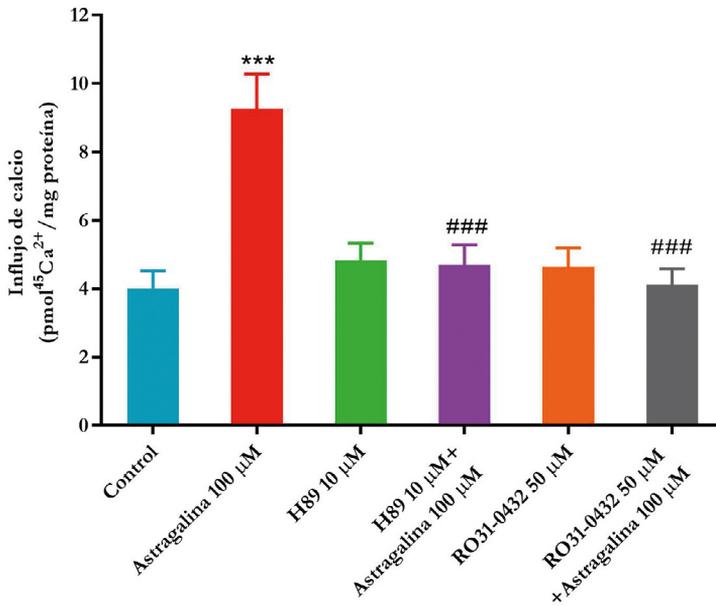


Figura 17. Influencia de las proteínas quinasas (PKC y PKA) sobre el efecto estimulante de la astragalina en el influjo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en los islotes pancreáticos. RO310432 (50 μM) y H89 (10 μM) estuvieron presentes durante los últimos 15 minutos de preincubación y durante la incubación. Preincubación = 60 min; incubación = 10 min. Los valores se expresan como media \pm SEM, $n = 5$. *** $p \leq 0,001$, en comparación con el grupo control. ### $p \leq 0,001$, en comparación con el grupo de astragalina y utilizando ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Bonferroni.

Como se observa en la figura 18, solo en presencia de taspigargina el efecto estimulante de la astragalina se redujo significativamente en un 37 %.

Finalmente, se investigó otro parámetro de la homeostasis de la glucosa después del tratamiento *ex vivo* con astragalina de los islotes pancreáticos aislados. La figura 19 muestra el efecto de la astragalina sobre la secreción basal de insulina de los islotes. El efecto estimulante de la astragalina (100 μM) sobre la liberación de insulina fue aproximadamente 12 veces mayor que el observado en el grupo de control después de 10 minutos de incubación.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, la astragalina puede aumentar la liberación de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) así como estimular la entrada de calcio extracelular a través de L-VDCC. El aumento de la entrada de calcio también puede estimular la liberación de calcio del retículo endoplasmático y, en consecuencia, aumentar la secreción de insulina en las células β pancreáticas. Teniendo en cuenta que la inhibición de SERCA aumenta la magnitud de la entrada de Ca^{2+} desencadenada por la despolarización y la

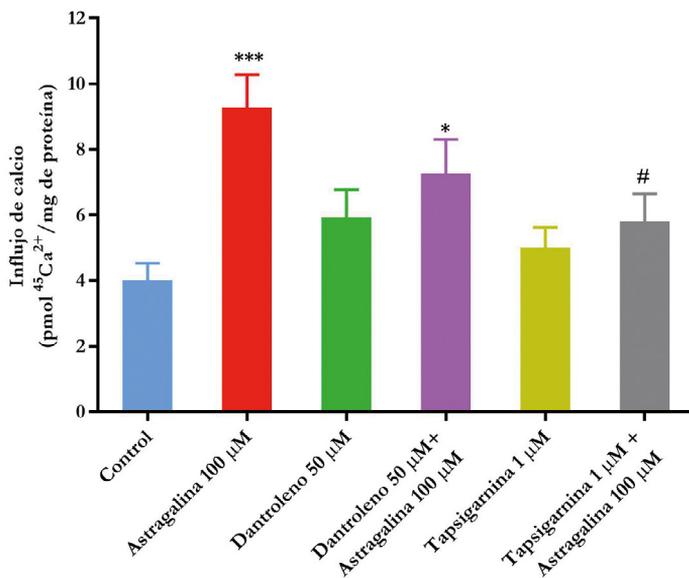


Figura 18. Participación de la movilización de calcio intracelular en el efecto estimulante de la astragalina sobre el influjio de ⁴⁵Ca²⁺ en los islotes pancreáticos.

Nota: tapsigargina (1 μM) y dantroleno (50 μM) estuvieron presentes durante los últimos 15 minutos de preincubación y durante la incubación. Preincubación = 60 min; incubación = 10 min. Los valores se expresan como la media ± SEM, n = 5. * p ≤ 0,05 y *** p ≤ 0,001, en comparación con el grupo de control; # p ≤ 0,05, en comparación con el grupo de astragalina.

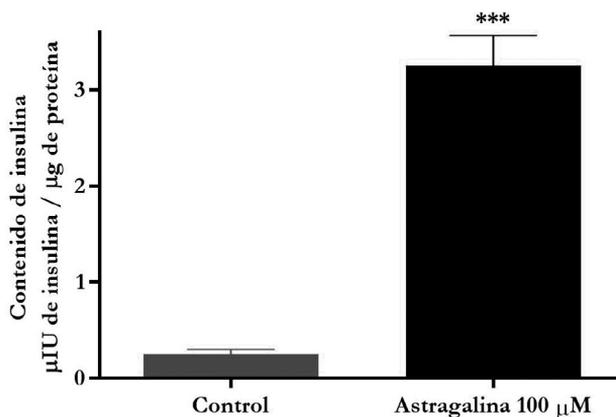


Figura 19. Efecto de la astragalina sobre la secreción de insulina basal en islotes pancreáticos de rata.

Nota: los valores se expresan como la media ± SEM, n = 5. *** p ≤ 0,001, cuando se compara con el grupo de control y se usa la prueba t de Student para cada una de las concentraciones.

subsiguiente exocitosis de insulina en las células β pancreáticas de rata⁴². Un posible mecanismo por el cual la astragalina aumenta el calcio intracelular puede ser mediante la inhibición de SERCA, lo cual demostraría que la astragalina aumenta la secreción de insulina con un mecanismo mediado por diferentes dianas intracelulares, y esto lleva a una disminución de la glicemia *in vivo*⁴³.

Conclusiones

El extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* y sus respectivas fracciones etanólicas mostraron efecto hipoglicemiante en el ensayo *in vivo*, siendo mayor en el caso de la fracción etanólica, la cual aumentó el glucógeno hepático y muscular, y esto indica un efecto mimético o secretagogo de insulina. El perfil cromatográfico del extracto y de su fracción etanólica permitió identificar la isoquercetina como uno de los principales metabolitos de las hojas de *P. ligularis*; este flavonoide media el efecto estimulante sobre la captación de glucosa en el músculo sóleo activando las vías PI3K, MAPK y MEK/ERK, así como la síntesis proteica de *novo* del transportador GLUT4. Los resultados mostraron una clara evidencia del papel mimético de la insulina por parte de la isoquercetina en la homeostasis de la glucosa, principalmente a través de la translocación de GLUT4.

Adicionalmente, el estudio evaluó el efecto de la astragalina, otro flavonoide presente en el extracto de hojas de *P. ligularis*, sobre la homeostasis de la glucosa, y se demostró que la astragalina aumenta la secreción de insulina por medio de un mecanismo mediado por diferentes dianas intracelulares, lo que lleva a una disminución de la glicemia *in vivo*.

Estos resultados permiten sugerir que el extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* y sus principales metabolitos, isoquercetina y astragalina, pueden tener gran potencial en la industria farmacéutica y nutracéutica para la prevención o el tratamiento de la diabetes.

Referencias

1. Ghorbani A. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. *Biomed Pharmacother.* 2017; 96: 305-312.
2. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N *et al.* Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019; 157: 107843.

3. Saad AH, Bushra HM. Flavonoids as alternatives in treatment of type 2 diabetes mellitus. *Acad J Med Plants*. 2013; 1(2): 31-36.
4. Hussain T, Tan B, Murtaza G, Liu G, Rahu N, Saleem Kalhor M *et al*. Flavonoids and type 2 diabetes: Evidence of efficacy in clinical and animal studies and delivery strategies to enhance their therapeutic efficacy. *Pharmacol Res*. 2020; 152: 104629.
5. Cazarolli LH, Pereira DF, Kappel VD, Folador P, Figueiredo M dos S, Pizzolatti MG *et al*. Insulin signaling: A potential signaling pathway for the stimulatory effect of kaempferitrin on glucose uptake in skeletal muscle. *Eur J Pharmacol*. 2013; 712(1-3): 1-7.
6. Kappel VD, Zanatta L, Postal BG, Silva FR. Rutin potentiates calcium uptake via voltage-dependent calcium channel associated with stimulation of glucose uptake in skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys*. 2013; 532(2): 55-60.
7. Kappel VD, Pereira DF, Cazarolli LH, Guesses SM, da Silva CH, Schenkel EP. Short and long-term effects of *Baccharis articulata* on glucose homeostasis. *Molecules*. 2012; 17(6): 6754-68.
8. Rey D, Fernandes TA, Sulis PM, Gonçalves R, Sepúlveda M, Silva Frederico MJ *et al*. Cellular target of isoquercetin from *Passiflora ligularis* Juss. for glucose uptake in rat soleus muscle. *Chem Biol Interact*. 2020; 330: 109198.
9. Mohan S, Nandhakumar L. Role of various flavonoids: Hypotheses on novel approach to treat diabetes. *J Med Hypotheses Ideas*. 2014; 8(1): 1-6.
10. Cazarolli LH, Zanatta L, Alberton EH, Figueiredo MS, Folador P, Damazio RG. Flavonoids: cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis. *Mini Rev Med Chem*. 2008; 8(10): 1032-8.
11. Patel DK, Prasad SK, Kumar R, Hemalatha S. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pac J Trop. Biomed*. 2012; 2(4): 320-30.
12. Jayachandran M, Zhang T, Ganesan K, Xu B, Chung SSM. Isoquercetin ameliorates hyperglycemia and regulates key enzymes of glucose metabolism via insulin signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 2018; 829: 112-20.
13. Belfiore A, Malaguarnera R, Vella V, Lawrence MC, Sciacca L, Frasca F *et al*. Insulin receptor isoforms in physiology and disease: An updated view. *Endocr Rev*. 2017; 38(5): 379-431.
14. Cazarolli LH, Folador P, Pizzolatti MG, Silva FR. Signaling pathways of kaempferol-3-neohesperidoside in glycogen synthesis in rat soleus muscle. *Biochimie*. 2009; 91(7): 843-9.
15. Du Y, Wei T. Inputs and outputs of insulin receptor. *Protein Cell*. 2014; 5(3): 203-13.

16. Tunduguru R, Thurmond DC. promoting glucose transporter-4 vesicle trafficking along cytoskeletal tracks: PAK-ing them out. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017; 8: 329.
17. Frederico MJS, Castro AJG, Pinto VAM, Ramos CDF, Monteiro FBF, Mascarello A *et al*. Mechanism of action of camphoryl-benzene sulfonamide derivative on glucose uptake in adipose tissue. *J Cell Biochem*. 2018; 119(6): 4408-19.
18. Llanos P, Contreras-Ferrat A, Georgiev T, Osorio-Fuentealba C, Espinosa A, Hidalgo J *et al*. The cholesterol-lowering agent methyl- β -cyclodextrin promotes glucose uptake via GLUT4 in adult muscle fibers and reduces insulin resistance in obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015; 308(4): E294-E305.
19. Sweeney G, Somwar R, Ramlal T, Volchuk A, Ueyama A, Klip A. An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. *J Biol Chem*. 1999; 274(15): 10071-8.
20. Tremblay F, Dubois M-J, Marette A. Regulation of GLUT4 traffic and function by insulin and contraction in skeletal muscle. *Front Biosci*, 2003; 8(12): 1072-84.
21. Cazarolli LH, Folador P, Moresco HH, Brighente IM, Pizzolatti MG, Silva FR. Mechanism of action of the stimulatory effect of apigenin-6-C-(2''-O- α -l-rhamnopyranosyl)- β -L-fucopyranoside on 14C-glucose uptake. *Chem Biol Interact*. 2009; 179(2-3): 407-12.
22. Kappel VD, Frederico MJS, Postal BG, Mendes CP, Cazarolli LH, Silva FR. The role of calcium in intracellular pathways of rutin in rat pancreatic islets: Potential insulin secretagogue effect. *Eur J Pharmacol*. 2013; 702(1-3): 264-8.
23. Fang P, Yu M, Min W, Wan D, Han S, Shan Y *et al*. Effect of baicalin on GLUT4 expression and glucose uptake in myotubes of rats. *Life Sci*. 2018; 196: 156-61.
24. Park JE, Park JY, Seo Y, Han JS. A new chromanone isolated from *Portulaca oleracea* L. increases glucose uptake by stimulating GLUT4 translocation to the plasma membrane in 3T3-L1 adipocytes. *Int J Biol Macromol*. 2019; 123: 26-34.
25. Riaz A, Rasul A, Hussain G, Zahoor MK, Jabeen F, Subhani Z *et al*. Astragalins: A bioactive phytochemical with potential therapeutic activities. *Adv Pharmacol Sci*. 2018; 2018: 9794625.
26. Agyemang K, Han L, Liu E, Zhang Y, Wang T, Gao X. Recent advances in *Astragalus membranaceus* anti-diabetic research: Pharmacological effects of its phytochemical constituents. *Evid Based Complement Altern Med*. 2013; 2013: 654643.
27. Choi J, Kang HJ, Kim SZ, Kwon TO, Jeong SI, Jang SI. Antioxidant effect of astragalins isolated from the leaves of *Morus alba* L. against free

- radical-induced oxidative hemolysis of human red blood cells. Arch Pharm Res. 2013; 36(7): 912-7.
28. Ke M, Hu XQ, Ouyang J, Dai B, Xu Y. The effect of astragalín on the VEGF production of cultured Müller cells under high glucose conditions. Biomed Mater Eng. 2012; 22(1-3): 113-9.
29. Hong HC, Li SL, Zhang XQ, Ye WC, Zhang QW. Flavonoids with α -glucosidase inhibitory activities and their contents in the leaves of *Morus atropurpurea*. Chin Med. 2013; 8(1): 19.
30. Kim MS, Kim SH. Inhibitory effect of astragalín on expression of lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators through NF- κ B in macrophages. Arch Pharm Res. 2011; 34(12): 2101-7.
31. Mendes CP, Postal BG, Oliveira GTC, Castro AJG, Frederico MJS, Moraes ALL *et al.* Insulin stimulus-secretion coupling is triggered by a novel thiazolidinedione/sulfonylurea hybrid in rat pancreatic islets. J Cell Physiol. 2018; 234(1): 509-20.
32. Gomes Castro AJ, Cazarolli LH, Bretanha LC, Sulis PM, Rey Padilla DP, Aragón Novoa DM. The potent insulin secretagogue effect of betulínic acid is mediated by potassium and chloride channels. Arch Biochem Biophys. 2018; 648: 20-6.
33. Zhang Y, Liu D. Flavonol kaempferol improves chronic hyperglycemia-impaired pancreatic beta-cell viability and insulin secretory function. Eur J Pharmacol. 2011; 670(1): 325-32.
34. Kittl M, Beyreis M, Tumorxhuu M, Fürst J, Helm K, Pitschmann A *et al.* Quercetin stimulates insulin secretion and reduces the viability of rat INS-1 beta-cells. Cell Physiol Biochem. 2016; 39(1): 278-93.
35. Hagenacker T, Hillebrand I, Büsselberg D, Schäfers M. Myricetin reduces voltage activated potassium channel currents in DRG neurons by a P38 dependent mechanism. Brain Res Bull. 2010; 83(5): 292-6.
36. Schuit FC, Huypens P, Heimberg H, Pipeleers DG. Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. Diabetes. 2001; 50(1): 1-11.
37. Yang SN, Berggren PO. The Role of voltage-gated calcium channels in pancreatic β -cell physiology and pathophysiology. Endocr Rev. 2006; 27(6): 621-76.
38. Bardy G, Virsolvy A, Quignard JF, Ravier MA, Bertrand G, Dalle S *et al.* Quercetin induces insulin secretion by direct activation of L-Type calcium channels in pancreatic beta cells. Br J Pharmacol. 2013; 169(5): 1102-13.
39. Xu YC, Leung SW, Leung GP, Man RY. Kaempferol enhances endothelium-dependent relaxation in the porcine coronary artery through activation of large-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels. Br J Pharmacol. 2015; 172(12): 3003-14.

40. Rorsman P, Braun M, Zhang Q. Regulation of calcium in pancreatic α - and β -cells in health and disease. *Cell Calcium*. 2012; 51(3-4): 300-8.
41. Arkhammar P, Juntti-Berggren L, Larsson O, Welsh M, Nånberg E, Sjöholm A *et al.* Protein kinase C modulates the insulin secretory process by maintaining a proper function of the beta-cell voltage-activated Ca^{2+} channels. *J Biol Chem*. 1994; 269(4): 2743-9.
42. Hughes E, Lee AK, Tse A. Dominant role of sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase pump in Ca^{2+} homeostasis and exocytosis in rat pancreatic β -cells. *Endocrinology*. 2006; 147(3): 1396-407.
43. Rey D, Miranda Sulis P, Alves Fernandes T, Gonçalves R, Silva Frederico MJ, Costa GM. Astragalín augments Basal calcium influx and insulin secretion in rat pancreatic islets. *Cell Calcium*. 2019; 80: 56-62.

Capítulo 4
**Metodologías analíticas para
el estudio y cuantificación de
flavonoides en extractos de hojas
de *Passiflora ligularis* Juss.**

Paula Michelle Sepúlveda^a
Laura Gómez Devia^b
Diana Marcela Aragón Novoa^c
Geison Modesti Costa^d

- a.** Química farmacéutica. Universidad Nacional de Colombia. pmsepulvedar@unal.edu.co
- b.** Bióloga. Pontificia Universidad Javeriana. gomez-laurad@javeriana.edu.co
- c.** Química farmacéutica. *Ph. D.* Profesora titular, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. dmaragonn@unal.edu.co
- d.** Farmacéutico. *Ph. D.* Profesor asociado, Departamento de Química, Pontificia Universidad Javeriana. modesticosta.g@javeriana.edu.co

Introducción

El interés investigativo por las plantas medicinales y la demanda de la práctica de la medicina tradicional-complementaria han aumentado a nivel global¹⁻², así como los incidentes reportados por tratamientos a base de fuentes naturales. Esto debido principalmente a la falta de control de calidad tanto de las drogas empleadas (incorrecto uso de partes botánicas, contaminaciones con pesticidas, etc.) como del producto final (cambios en el contenido de los componentes activos e incluso transformación de estos en productos tóxicos)³. Por tal motivo, es de gran importancia avanzar en el área de control de calidad de este tipo de productos terapéuticos (denominados *fitoterapéuticos* en Colombia). Esto incluye la autenticación de las especies y drogas empleadas, la selección de marcadores de calidad (químicos, analíticos o terapéuticos), el desarrollo y validación de métodos analíticos, el análisis de suficientes lotes de muestras; finalmente, el establecimiento del contenido límite requerido de los marcadores seleccionados. Para ello se requiere el uso de técnicas sensibles, precisas y considerablemente sencillas³.

Dentro de las técnicas analíticas más populares y aplicadas en los últimos 10 años para el aislamiento, cuantificación y estandarización de productos naturales, se encuentran la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por *high performance liquid chromatography*) o la UHPLC (por *ultra high performance liquid chromatography*)⁴. El fundamento de estas técnicas se basa en la separación de los analitos o componentes de la muestra, según la afinidad selectiva que estos presenten, por medio de un soporte/fase estacionaria y una fase líquida con la cual eluye la muestra hacia el detector. Diferentes tipos de detectores pueden ser acoplados, pero el más empleado consta de un fotomultiplicador capaz de detectar un amplio rango de longitudes de onda de luz simultáneamente,

el detector de arreglo de diodos (DAD)¹. Estas son las técnicas preferidas gracias a su alta eficiencia de separación, buena reproducibilidad, sensibilidad, precisión, amplia gama de aplicaciones y el nivel poco especializado requerido por parte del operador^{1,3}.

Por otro lado, la electroforesis capilar (CE) es una técnica que combina el principio de la electroforesis en gel, la sílice fundida en un capilar de la cromatografía de gases y los detectores de alta sensibilidad de la HPLC⁵. Se compone principalmente de dos electrodos, un capilar, una solución de electrolitos (*buffer*), una fuente de alto voltaje (hasta 50 kV) y un detector; así, la separación de los analitos se da según su movilidad, al estar bajo un campo eléctrico dentro de un capilar con *buffer*⁵⁻⁶. Dicha migración está guiada por dos fuerzas: la movilidad electroforética (ME) y el flujo electroosmótico. En el interior del capilar se forma una doble capa eléctrica como parte del fenómeno de transporte: primero, la capa fija, resultante de las cargas negativas aportadas por los grupos silanol (SiOH) de la sílice fundida que constituye el capilar, y segundo, una capa difusa, generada por los iones cargados positivamente de la solución *buffer*. De este modo, en un análisis típico de CE los analitos, al ser introducidos por el ánodo, son detectados en dirección al cátodo en el siguiente orden: los cationes (de menor a mayor tamaño), que migran con mayor velocidad; los compuestos neutros, los cuales migran con la misma velocidad del flujo electroosmótico y difícilmente son separados y, finalmente, los aniones, de mayor a menor tamaño⁷. Aunque se reconoce que los parámetros involucrados en la optimización de la separación de compuestos por CE hacen que la técnica sea más compleja en comparación con la más popular HPLC, algunos autores reportan que la electroforesis capilar ofrece mayor versatilidad y eficiencia, menores tiempos de análisis, menor consumo de reactivos y menores costos (columnas más económicas)⁷⁻⁸.

Debido a todo lo anterior, se presenta en este capítulo el desarrollo y validación de dos metodologías analíticas mediante UHPLC-DAD y CE-DAD, útiles para el estudio de extractos polares obtenidos a partir de hojas de *P. ligularis*. Se enfocó el desarrollo de las metodologías en el análisis y cuantificación de los flavonoides, ya que, tal como se expone en los capítulos 1 y 3, estos han demostrado estar relacionados con el efecto antihiperlipémico/antidiabético de los extractos estudiados a partir de esta especie. De este modo, los flavonoides se consideran los marcadores terapéuticos mediante los cuales se puede llevar un control analítico durante el proceso de desarrollo de un producto fitoterapéutico a partir de hojas de granadilla y, consecuentemente, del control de calidad de este.

Metodología

Reactivos y equipos

El análisis por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UHPLC) se llevó a cabo en un cromatógrafo Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 equipado con un detector de arreglo de diodos (DAD) Dionex Ultimate 3000, bomba cuaternaria Dionex Ultimate 3000 RS, desgasificador en línea e inyector automático Dionex Ultimate 3000 RS. Los datos se procesaron utilizando el *software* Chromeleon Client, versión 6.80 SR15. Se utilizó acetonitrilo grado HPLC (Honeywell™), ácido fórmico (Carlo Erba) y agua purificada mediante un sistema Milli-Q Millipore®; todos fueron filtrados por membranas de tamaño de poro (0,22 µm) previamente a su uso.

La metodología por electroforesis capilar se desarrolló en un equipo Agilent 7100 CE equipado con detector DAD, con dispositivo de control de temperatura y automuestreador. Los datos fueron procesados en el *software* Agilent ChemStation®. Se utilizó metanol HPLC de Merck® y agua tipo I purificada por un sistema Milli-Q. Adicionalmente, se prepararon soluciones madre del electrolito tetraborato de sodio (TBS, de Mp Biomedicals) (100 mm). Las soluciones de hidróxido de sodio 1,0 y 0,1 M, y de ácido clorhídrico al 5 % se prepararon a partir de los reactivos adquiridos en PanReac y Merck, respectivamente. Todas las sales utilizadas eran de grado reactivo analítico. Todos los solventes y soluciones fueron filtrados por una membrana de 0,45 µm antes de ser usadas.

Los estándares analíticos utilizados en las dos metodologías fueron isoquercetina (quercetina-3-O-β-D-glucósido, ≥ 90 %); astragalina (kaempferol-3-β-D-glucopiranosido, ≥ 97 %) y crisina (97 %), todos de Sigma-Aldrich.

Material vegetal y extracción

Con el fin de estudiar el efecto de las condiciones evaluadas durante el desarrollo de los métodos analíticos para extractos polares de hojas de granadilla, se analizaron los cambios ejercidos en los perfiles cromatográficos de extractos acuosos obtenidos por infusión. El material vegetal fue colectado en junio de 2018 en el municipio de Anolaima, en Cundinamarca (latitud: 4°50,0172' N; longitud: 74°29,97' O; altitud: 1850 m s.n.m.), con el permiso de recolección de muestras otorgado por la ANLA y el Ministerio de Ambiente y Desarrollo: “Biosprospección de especies de Solanum, Passiflora, Physalis, Hypericum, Cecropia e Ilex”, código 38024 (Resolución 0699 de abril 26 de 2018, Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, Otrosí No. 7 al Contrato 121 del 22 de enero del 2016). Un ejemplar de la especie estudiada fue depositado en el Herbario Nacional Colombiano (COL 602878)⁹.

Las hojas se almacenaron en el laboratorio en condiciones de congelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior liofilización durante 48 horas. Las hojas liofilizadas se molieron y tamizaron; el material retenido en un tamiz malla 40 se seleccionó para su extracción por infusión. Esta se llevó a cabo con agua en ebullición durante 10 minutos, en proporción droga-solvente 1:10; se filtró por gravedad y se liofilizó el extracto obtenido⁹⁻¹⁰.

Metodología analítica por UHPLC-DAD

Para el desarrollo del método analítico por esta técnica, se realizaron diferentes modificaciones (método de elución, flujo y temperatura del horno de la columna) a una metodología previamente validada para la cuantificación de vitexina y crisina en extractos y productos comerciales de diferentes especies del género *Passiflora*¹¹. Todos los análisis se llevaron a cabo en una columna Phenomenex® Kinetex C18 (100 mm \times 2,1 mm, 2,6 μm) con un volumen de inyección de 10 μl .

Con el fin de cuantificar los flavonoides presentes en extractos polares de hojas de granadilla, se establecieron 3 curvas de calibración: una para la determinación del contenido de flavonoides totales (CFT), expresados como mg equivalentes de isoquercetina/g extracto seco, y otras dos para la cuantificación individual de isoquercetina y astragalina. La determinación del CFT se realizó mediante la suma de las señales cromatográficas que presentaron espectros de absorción característicos de flavonoides, es decir, dos bandas de absorción máximas entre 240-295 nm y 300-400 nm¹². Se presentan en la tabla 1 las soluciones preparadas en cada caso.

Tabla 1. Soluciones preparadas para la cuantificación de flavonoides en extractos polares de hojas de *P. ligularis* mediante UHPLC-DAD

Curva de calibración	Solución madre ($\mu\text{g/ml}$) ^a	Rango de concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) ^a	Longitud de onda de detección (nm)
Flavonoides totales	1170	0,059-292,7	350
Isoquercetina	1170	0,059-292,7	260
Astragalina	31,04	0,020-10,00	265

^a Se muestran los valores de concentración ajustados de acuerdo con el porcentaje de pureza de los estándares analíticos utilizados.

Las soluciones preparadas para las curvas de flavonoides totales e isoquercetina fueron las mismas. Sin embargo, en el primer caso se identificaron los valores de área bajo la curva a 350 nm, ya que se podía detectar con más especificidad los flavonoides en el cromatograma; por el contrario, 260 nm corresponde a la longitud de onda de máxima absorbancia de la isoquercetina,

y 265 nm a la de la astragalina. Todas las soluciones fueron preparadas por triplicado en metanol-agua (1:1) y filtradas por una membrana de 0,22 μm previo a su inyección en el cromatógrafo, donde el área promedio de pico fue medida.

Metodología analítica por electroforesis capilar CE-DAD

Para el desarrollo de un método adecuado para el análisis de flavonoides en el extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*, se evaluaron las siguientes condiciones electroforéticas:

- Voltaje, temperatura y composición del *buffer* de corrida (BGE)

Las diferentes condiciones estudiadas (presentadas en la tabla 2) se evaluaron en un capilar de sílica fundida de 48,5 cm (40 cm efectivos), 50 μm de diámetro interno. Para el primer uso, el capilar fue purgado con NaOH 1 M durante 30 min. A diario el capilar se acondicionó con NaOH 0,1 M (5 min), tiempo de espera (1 min), agua tipo I (5 min) y BGE (5 min). Entre corridas se inyectó durante 2 min la solución *buffer* de corrida o BGE (*background electrolyte*). Las muestras eran introducidas al sistema por inyección hidrodinámica (50 mbar/10 s).

El extracto fue evaluado en todos los análisis a una concentración de 2 mg/ml (agua tipo I) y se estableció 270 nm como longitud de onda para la detección de flavonoides.

Tabla 2. Condiciones de voltaje, temperatura y composición de BGE estudiadas

Análisis	Composición BGE			Voltaje (kV)	Temperatura (°C)
	TBS ^a (mm)	MeOH ^b (%)	SDS ^c (mm)		
1	50	5	-	20	20
2	50	20	-	25	25
3	75	5	-	20	35
4	75	20	-	25	35
5	20	-	40	15	17

^a TBS: tetraborato de sodio. ^b MeOH: metanol. ^c SDS: dodecil sulfato de sodio.

- Movilidad electroforética (ME)

A partir de los parámetros óptimos de voltaje, temperatura y BGE establecidos para la separación de los flavonoides presentes en el extracto, se decidió estudiar el cambio en la movilidad electroforética de isoquercetina,

astragalina, y crisina en función del pH del BGE. Los dos primeros flavonoides se analizaron debido al interés de cuantificarlo, y el último, por presentar diferencias en su estructura química respecto a isoquercetina y astragalina. Para ello, se ajustó el pH del BGE con NaOH 1 M, NaOH 0,1 M o HCl al 5 %, en los siguientes valores: 7,03, 8,32, 9,32, 10,33 y 11,08. A partir de esto se observó el cambio en los tiempos de migración de cada una de las soluciones estándar de los flavonoides de interés y se analizó la ME mediante la siguiente ecuación:

$$v = \mu_e \cdot E$$

Donde v es la velocidad del ión, μ_e la movilidad electroforética y E el campo eléctrico aplicado¹³. Los análisis se realizaron en un capilar de sílica fundida de 64 cm (55,5 cm efectivos), 50 μ l de diámetro interno, con ventana expandida. Posteriormente, se analizó bajo las mismas condiciones el extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* a una concentración de 2 mg/ml (agua tipo I), y se observó cómo los diferentes valores de pH del BGE también afectaban la movilidad de este.

Una vez establecidas todas las condiciones electroforéticas, se prepararon las curvas de calibración descritas en la tabla 3 para la cuantificación individual de isoquercetina y astragalina. Todas las soluciones estándares se prepararon en metanol, por triplicado, y se midió el promedio del área. Los análisis se realizaron en un capilar de sílica fundida de 64 cm (55,5 cm efectivos), 50 μ l de diámetro interno, con ventana expandida.

Tabla 3. Soluciones preparadas para la cuantificación de isoquercetina y astragalina en extractos polares de hojas de *P. ligularis* mediante CE-DAD

Curva de calibración	Solución madre (μ g/ml)	Rango de concentraciones (μ g/ml)
Isoquercetina	841	0,380-280,3
Astragalina	500	0,229-166,6

Validación de las metodologías analíticas

Los parámetros de validación analizados en ambas metodologías analíticas se evaluaron de acuerdo con las pautas de la guía ICH (International Conference Harmonization)¹⁴. Los parámetros validados fueron:

Linealidad: definida como la proporcionalidad directa entre la respuesta evaluada, en este caso área bajo la curva, y la concentración del analito en la muestra. Para su determinación dentro del rango de concentraciones estudiado, se utilizó el coeficiente de correlación o la prueba estadística *t*-Student.

Precisión: la precisión del procedimiento analítico se evaluó en dos niveles: repetibilidad (precisión intraensayo) y precisión intermedia (precisión interdiaria). En el primer caso, se analizaron 3 niveles de concentración (baja, media y alta) de las soluciones estándar por triplicado en un día; en el segundo caso, se analizaron las soluciones triplicadas del nivel de concentración intermedio de cada curva de calibración, en tres días consecutivos. Ambos resultados se expresaron en términos de desviación estándar relativa (DER).

Exactitud: la exactitud se expresó como el porcentaje de recuperación obtenido después de adicionar cantidades conocidas de la solución estándar a una solución de extracto; se calculó siguiendo la ecuación: recuperación (%) = (contenido teórico*100) / contenido experimental.

Siendo el contenido teórico el área obtenida en el análisis de coinyección del extracto con la solución estándar de la respectiva concentración analizada; y contenido experimental, la suma del área del pico del flavonoide analizado en el extracto/2 + el área del pico del flavonoide en la solución estándar analizada/2.

Límite de detección (LDD) y límite de cuantificación (LDC): determinados mediante diluciones sucesivas hasta observar una relación señal-ruido de 3:1 para el LDD y 10:1 junto con un %CV < 5 para el LDC.

Se utilizó el *software* Microsoft Excel para el análisis estadístico de los parámetros mencionados anteriormente.

Resultados y discusión

Desarrollo de la metodología analítica por UHPLC-DAD

Como se mencionó anteriormente, se realizaron modificaciones al método cromatográfico desarrollado por Sepúlveda *et al.*¹¹ para el estudio de extractos y productos comerciales de diferentes especies del género *Passiflora*. Esto debido a que, como se observa en la figura 1, la complejidad del extracto y la similitud en la polaridad media a alta de todos los flavonoides presentes en la matriz dificultaba la resolución de los picos. A continuación, se detallan los cambios observados y analizados al realizar variaciones en las fases móviles, flujo y temperatura del método reportado (denominado método A).

Inicialmente, se extendió el tiempo de la rampa entre el 20-35 % de acetonitrilo (método B, figura 2), ya que en estos valores se presentó coelución de la mayoría de los metabolitos en el método A. Sin embargo, solo se observó como resultado la separación de los picos de menor polaridad. Por tal motivo, se iniciaron

las rampas desde un menor porcentaje de ACN, y se evaluó el efecto del aumento de temperatura de 35 a 40 °C (método C). Al comparar el método C con el método D (figura 2) se ve que en este último la combinación de varias rampas cortas con cambios leves en la proporción de los solventes facilitaba más la separación de los metabolitos de mayor polaridad, y que, a su vez, en el método C, el cambio de la temperatura de 35 a 40 °C generó disminución del tiempo muerto. Esto se debe a que aumentos en la temperatura conducen a la disminución de la viscosidad de la fase móvil y, por ende, a menor resistencia al flujo en la columna, de modo que disminuye la retención y la presión del sistema, lo cual permite utilizar flujos más altos¹⁵. Finalmente, se decidió combinar el incremento de la temperatura del horno de la columna (del método C), con la implementación de 5 rampas que aumentarían el poder de elución lentamente desde el 5 al 40 % de acetonitrilo (como en el método D), gradiente que a pesar de prolongarse por un tiempo considerable para una corrida cromatográfica UHPLC permitió obtener mayor resolución de todos los picos, tal como se observa en la figura 2, método E.

A partir de estos resultados, finalmente se plantea el siguiente sistema cromatográfico para la cuantificación de flavonoides en extractos polares de hojas de granadilla (perfil correspondiente al método E en la figura 2):

- Fase estacionaria: Phenomenex® Kinetex C18 (100 × 2,1 mm; 2,6 µm).
- Temperatura del horno: 40 °C.
- Flujo constante: 0,5 ml/min.
- Volumen de inyección: 10 µl.
- Fase móvil: ácido fórmico 1,0 % en agua (fase A) y acetonitrilo (fase B), comenzando desde 5-10 %B (0-10 min), 10-13 %B (10-20 min), 13-18 %B (20-25 min), 18-25 %B (25-32 min), 25-40 %B (32-38 min), 40-5 %B (38-40 min).

La mayoría de las metodologías analíticas por HPLC/UHPLC encontradas en la literatura para el estudio de especies del género *Passiflora* tenían como objetivo el análisis cualitativo de las matrices vegetales; y de requerirse la cuantificación del contenido de flavonoides, muchos estudios reportan el uso de técnicas colorimétricas como por ejemplo la de cloruro de aluminio¹⁶. En caso de desarrollar una metodología por HPLC, se enfocaban usualmente en la cuantificación de uno o pocos flavonoides específicos, principalmente vitexina, isovitexina, orientina, e isorientina¹⁷, mediante condiciones relativamente sencillas, como mezclas de la fase acuosa acidificada (A) y acetonitrilo como fase orgánica (B), en un gradiente lineal de 5-20 % de B en A durante 30 minutos¹⁶, lo cual se asemeja al método C evaluado para el extracto de hojas de *P. ligularis*, pero que no otorgó suficiente resolución entre los dos primeros picos del perfil ni a los que coelúan entre el minuto 16-17.

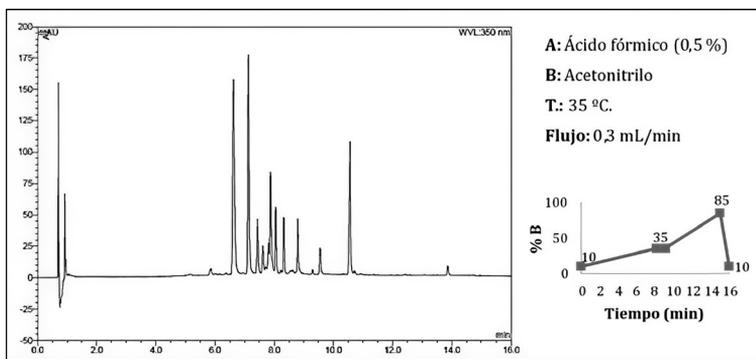


Figura 1. Perfil cromatográfico de *P. ligularis* obtenido bajo condiciones del método A¹¹.

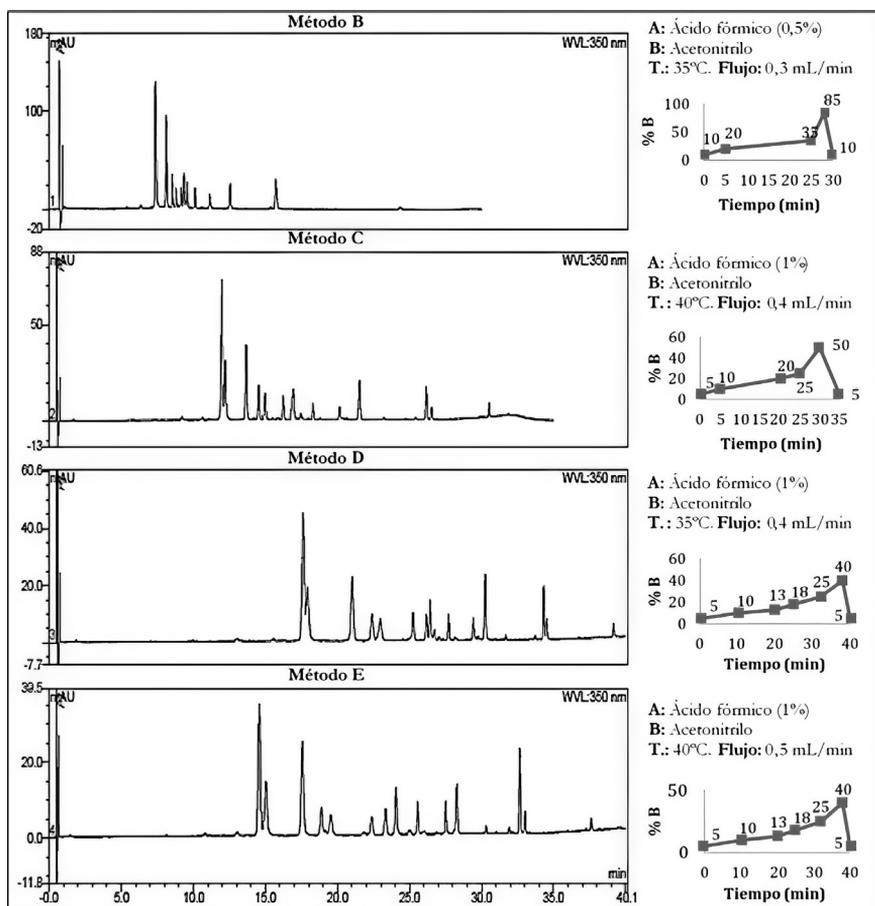


Figura 2. Perfiles cromatográficos obtenidos tras realizar diferentes modificaciones al método A.

Se encontraron algunos métodos reportados para el estudio de *P. ligularis* mediante HPLC considerablemente diferentes al desarrollado en este trabajo. Por un lado, porque se llevaba a cabo el análisis de extractos del fruto, donde se utilizaban como fases móviles (A) ácido fórmico al 0,1 % y (B) metanol en un gradiente que alcanzaba condiciones mucho más apolares, desde 10-70 %B (0-4 min), 70-100 %B (4-7 min), 100-10 %B (7-8 min)¹⁸; o, por otro lado, porque el método desarrollado estaba basado en condiciones previamente reportadas para el análisis de flavonoides C-glicosilados, principales metabolitos identificados en otras especies de *Passiflora*. En este último, el método se diferencia especialmente en la composición de la fase móvil en modo isocrático: solvente A (tetrahidrofurano:isopropanol:acetonitrilo, 10:2:3, v/v/v) y solvente B (H₃PO₄, 0,5 %) (12 % A en B) a un flujo de 1 ml/min. Sin embargo, en dicho reporte no se presenta el cromatograma de las hojas de granadilla ya que no se identificaron en su extracto los compuestos C-glicosilados¹⁹.

Desarrollo de la metodología analítica por CE-DAD

Las diferentes condiciones electroforéticas descritas en la tabla 2 fueron evaluadas con el fin de obtener la mejor detección y resolución posible de todos los picos. Sin embargo, en la mayoría de casos esto no se logró, independientemente de las variaciones de voltaje y temperatura; atribuyéndose así las complicaciones a las diferentes composiciones de BGE empleadas.

En los análisis 2 (25 minutos de duración) y 4 (20 minutos), ambos con 20 % de MeOH, se observó un aumento en el tiempo de análisis (a pesar de haber usado valores de voltaje y temperatura más altos), además de una sobreposición de los picos, reduciendo su resolución. Esto pudo deberse a que los modificadores orgánicos hacen que el flujo electroosmótico (movimiento unilateral de iones y demás moléculas en la solución *buffer*) sea más lento, aumentando los tiempos de migración de los compuestos^{13,20-21}. En este caso, un aumento en el porcentaje de metanol en el BGE influyó negativamente en la separación de flavonoides, pero en otros estudios se observa lo contrario. Marchart *et al.*²² lograron la separación de flavonoides en *P. incarnata* usando un BGE con 20 % de MeOH; y Jiang *et al.*²⁰ lograron la separación de flavonoides en *Saussurea mongolica* usando un BGE con 40 % de MeOH. Esto demuestra que el porcentaje de solvente orgánico en el BGE debe ser revisado de forma individual para cada extracto.

Al evaluar los perfiles de las pruebas con mayor concentración de TBS (75 mm), análisis 3 y 4, se observó disminución en el número de picos detectados; y aunque diferentes estudios mencionan que la resolución aumenta directamente con la concentración de tetraborato de sodio, Wu *et al.*²³ resaltan que al exceder concentraciones de 60 mm hay un efecto negativo en el límite de detección, además de un aumento en el efecto de Joule y su componente de calentamiento. Esto es visible en otros estudios donde el TBS no excede una

concentración de 50 mm para la óptima separación de flavonoides (25 mm, Marchart *et al.*²²; 30 mm, Jiang *et al.*²⁰; 50 mm, Xu *et al.*²⁴; 50 mm, Costa *et al.*²⁵).

Por otro lado, bajo las condiciones del análisis 5 (BGE: 20 mM TBS, 40 mM SDS; voltaje: 15 kV; temp.: 17 °C) se evaluó el efecto del dodecil sulfato de sodio como componente del BGE. Al usar un surfactante micelar, la separación de los compuestos ya no solo depende de la carga, sino también de las interacciones hidrofóbicas de las moléculas con este²⁶. El uso de un surfactante logra extender la técnica de EC a la separación de compuestos neutros. Luego, la ventaja de esta técnica es la carga que brinda el surfactante a la molécula, que puede ser negativa o positiva dependiendo de la naturaleza del mismo¹³, en este caso, aniónico (SDS). El surfactante genera una fase pseudoestacionaria al englobar las moléculas; la cabeza polar del surfactante constituye la superficie externa y la parte apolar hidrofóbica de la molécula constituye el núcleo lipofílico²⁶. Sin embargo, al comparar el electroferograma de dicho análisis con el obtenido bajo las condiciones del ensayo 1 (50 mM TBS con 5 % MeOH como BGE; voltaje: 20 kV; temp.: 20 °C), se seleccionó este último debido a la mejor resolución obtenida en el menor tiempo de análisis (11 minutos) (figura 3).

A partir de las condiciones seleccionadas, se evaluó el efecto del pH del BGE en la movilidad electroforética (migración de los analitos en un campo eléctrico) de tres flavonoides presentes en los extractos polares de *P. ligularis*: isoquercetina, astragalina y crisina. Se observó que al aumentar el pH aumentaba el tiempo de migración de los estándares (figura 4) y consecuentemente disminuía su ME (figura 5). Esto sucede por el carácter ácido débil de los flavonoides²⁰. A medida que aumenta el pH mayor es la disociación de los grupos hidroxilo (aumenta la carga negativa de las moléculas); y por ende, se evidencia que la carga neta de los analitos puede ser manipulada mediante el valor de pH del BGE²⁶.

Es necesario tener en cuenta que factores como el tamaño, la estructura de la molécula y la disociación de los grupos OH con respecto a sus valores de pK_a , influyen en la movilidad electroforética de los flavonoides. Se presentan en

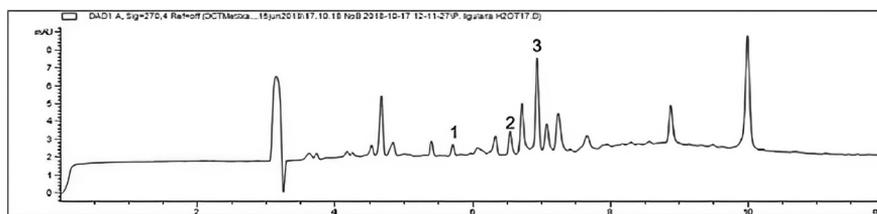


Figura 3. Electroferograma de extracto de hojas de *P. ligularis*. 1: crisina; 2: astragalina y 3: isoquercetina.

Nota: condiciones electroforéticas: voltaje: 20 kV; temperatura: 20 °C; BGE: TBS 50 mM; 5 % MeOH; pH (9-10); detección: UV 270 nm.

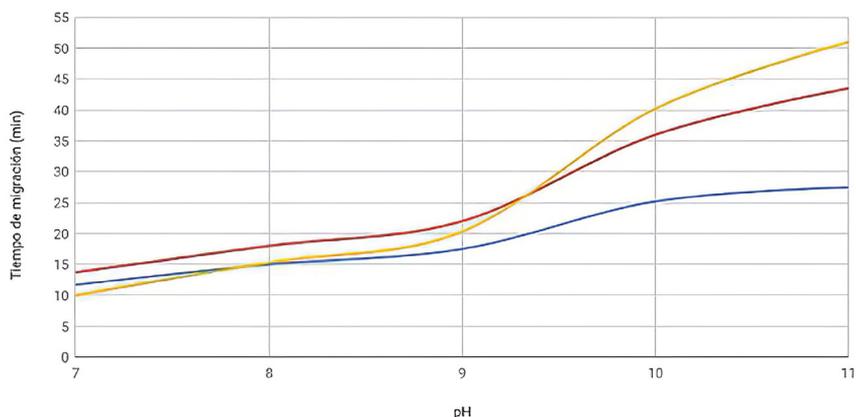


Figura 4. Variación en los tiempos de migración de los estándares de crisina (azul), isoquercetina (rojo) y astragalina (amarillo) en función del pH del BGE.

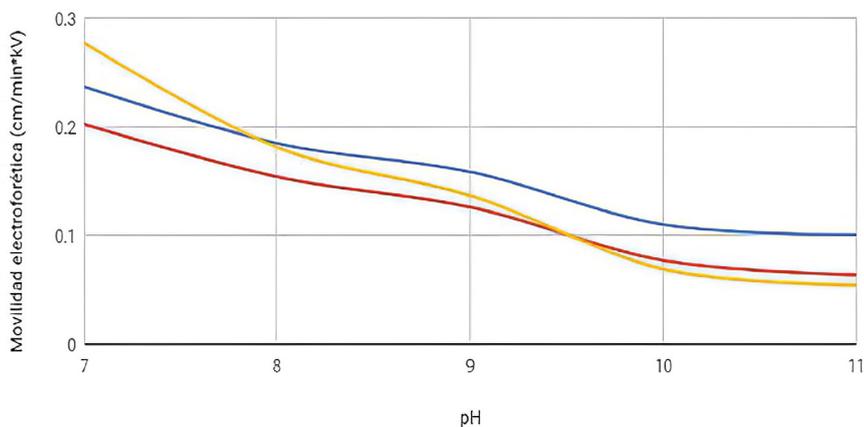


Figura 5. Variación de la movilidad electroforética de crisina (azul), isoquercetina (rojo) y astragalina (amarillo) en función del pH del BGE.

Nota: valores de movilidad electroforética calculados mediante la ecuación: $v = \mu \cdot E$.

la figura 6 algunos de los valores de pK_a reportados en la literatura para los flavonoides de interés. En algunos casos se encuentran discrepancias relativamente altas, pero esto aún no ha sido explicado²⁷. No obstante, según los resultados obtenidos, se puede hallar mayor concordancia con ciertos valores reportados.

El primer punto de inflexión de los tres flavonoides se observa entre pH 7,8 y 8,3, esto refleja la disociación del grupo hidroxilo en posición 7, el cual es reconocido por ser el más ácido²⁸. Posteriormente, a $pH \approx 9,5$, la astragalina

muestra otro punto de inflexión, lo cual es congruente con el valor de pK_a de su grupo hidroxilo en posición 4'; es en este punto donde disminuye su ME con respecto a la isoquercetina. Esto es coherente con los resultados obtenidos por McGuie y Markham²⁹, donde la isoquercetina presenta mayores tiempos de migración a pH 9,5, y en Johnson y Lunte²¹ a pH 9,3, con respecto a la astragalina.

En el caso de la isoquercetina, es necesario tener en cuenta que mediante los grupos hidroxilo vecinales en posiciones 3' y 4', puede formar complejos con el anión borato del TBS presente en el BGE^{21, 29-30}. El efecto en la movilidad electroforética de los flavonoides varía dependiendo de la ubicación en donde se forme el complejo. Si la formación del complejo ocurre en un grupo *cis*-1,2, diol del azúcar, esta adquiere una carga negativa, aumentando su carga neta y por ende su tiempo de migración³⁰. Por otro lado, si el complejo se forma en el esqueleto del flavonoide, ocurre una pérdida de la carga negativa, ya que el grupo catecol, dos veces desprotonado, es reemplazado por uno grupo catecol-borato mono-aniónico³⁰.

La formación del complejo se pudo haber visto favorecida a pH neutro, lo cual explicaría la menor movilidad electroforética observada en la isoquercetina respecto a los otros dos flavonoides a pH inferiores a 9; ya que, en este rango, la isoquercetina contaría con 3 cargas negativas, la de la posición 7, la del complejo catecol-borato y la de la posición 5; mientras que la astragalina y la crisina presentarían solamente una carga negativa alrededor del mismo punto de inflexión en pH cercano a 8. Sin embargo, a pH mayores a 9, la formación del complejo en la isoquercetina permite que esta no disminuya su ME respecto a la astragalina, debido al aumento en su tamaño, el cual le brinda menor densidad de carga.

Por ende, los resultados obtenidos son coherentes con la teoría en cuanto a la disminución de la movilidad electroforética de los flavonoides a medida que aumenta el pH del BGE, y los factores que en esta influyen: el tamaño, la estructura de la molécula y la disociación de los grupos OH según sus valores de pK_a respectivos. Astragalina es la que presenta menor ME a pH 11 y presenta dos cargas negativas; isoquercetina es la siguiente con menor ME y también presenta dos cargas negativas, pero su mayor tamaño le brinda una menor densidad de carga. Crisina presenta la mayor ME al tener solo una carga negativa. No obstante, en la literatura no hay suficiente información para explicar dos fenómenos que se presentan en los resultados. Primero, el hecho de que la astragalina presente una mayor ME con respecto a la crisina a pH 7, a pesar de ser más grande y, por otro lado, el punto de inflexión a pH \approx 9,5 de crisina e isoquercetina. Aunque en los resultados de Jiang *et al.*²⁰ se observa este mismo punto de inflexión en quercetina-3-O-glucósido.

Al hacer el análisis de la variación del pH del BGE con el extracto acuoso de *P. ligularis*, se observa que los tiempos de migración también aumentan con el aumento en el pH (figura 8). Esto refleja que para una muestra compleja,

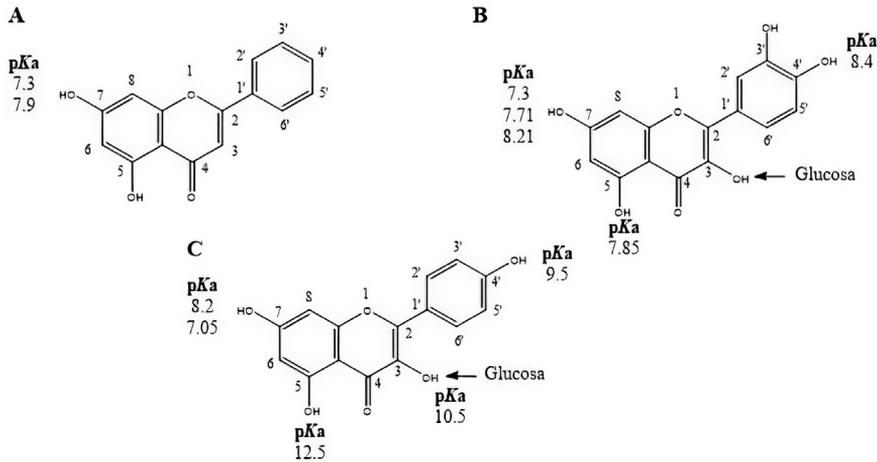


Figura 6. Agliconas de los flavonoides evaluados en el estudio de movilidad electroforética.
Nota: A. Crisina. B. Quercetina. C. Kaempferol. Se muestran diferentes valores de pK_a reportados en la literatura para algunos de los grupos hidroxilo^{27-29, 31}. Se indica con una flecha la posición de la glicosilación para la formación de astragalina e isoquercetina.

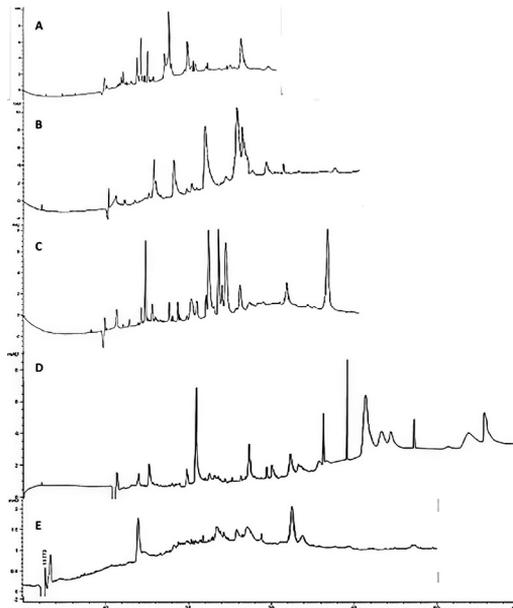


Figura 7. Electroferogramas del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*.

Nota: condiciones de separación: voltaje: 20 kV; temperatura: 20 °C; BGE: 50 mM TBS; 5 % MeOH a diferentes valores de pH. A. pH 7,03, tiempo de análisis: 30 min. B. pH 8,32, tiempo de análisis: 40 min. C. pH 9,32, tiempo de análisis: 40 min. D. pH 10,33, tiempo de análisis: 60 min. E. pH 11,08, tiempo de análisis: 50 min.

la variación del pH en el BGE tiene una influencia similar en los tiempos de migración de los flavonoides. A pH 7 y 8 (figura 7 - A y B, respectivamente) hay mayor solapamiento de los picos, posiblemente por la alta disminución en los tiempos de migración, lo cual es coherente con los resultados de Wu *et al.*²³ naringin, hesperedin, narigenin and rutin, quienes exponen que la resolución de los picos es muy baja a pH menores a 9,0. A pH 11 (figura 7 - E) el tiempo de análisis es menor que a pH 10 (figura 7 - D); no obstante, esto se debe a la completa deformación de los picos que impide realmente mostrar un perfil del extracto. Por otro lado, se observó que los tiempos de migración de los flavonoides eran diferentes al ser analizados de forma individual y al ser analizados en el extracto, fenómeno que también se puede observar en los resultados obtenidos por Jiang *et al.*²⁰. Esto pudo deberse a que, al haber un mayor número de compuestos en la solución, tanto la influencia en la carga neta de los analitos por el BGE, como la formación de complejos analito-borato, se viera disminuida.

Validación de las metodologías analíticas desarrolladas y cuantificación de flavonoides en el extracto acuoso de *P. ligularis*

A continuación, se presentan los resultados de los parámetros de validación evaluados para las dos metodologías, por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UHPLC) y electroforesis capilar (CE).

Linealidad

El grado de correlación entre el área bajo la curva y la concentración de las muestras se determinó inicialmente mediante el coeficiente de correlación, el cual fue superior a 0,995 en todas las curvas de calibración. De igual modo, se observan en la tabla 4 los rangos de concentraciones que en cada curva cumplieron con las pruebas de hipótesis realizadas mediante el estadístico *t*; es decir, que teniendo como criterio el rechazo de la hipótesis nula con un *t* calculado mayor al *t* tabulado, ninguna de las curvas presentó sesgo en la pendiente (esto es, se rechazó que la pendiente fuese igual a cero), ni en el intercepto (se aceptó punto de corte en 0). En cada caso, los datos se ajustaron con un 95 % de confianza al modelo de regresión lineal, cumpliendo así con el parámetro de linealidad.

Tabla 4. Datos de linealidad para las curvas de calibración de flavonoides evaluadas en cada técnica analítica

Técnica analítica	Análito	Rango de linealidad (µg/ml)	Ecuación de calibración	(r ²) ^a	Parámetro Ho ^b	t calculado	t tabulado ^c	Criterio	
UHPLC-DAD	Isoquercetina (F1) (350 nm)	5,841-292,7	y = 0,4393x - 0,2855	0,9991	Pendiente	t _b = 137,1	2,119	Rechazar H ₀	
					Intercepto	a = 0	t _a = -0,677	2,119	Aceptar H ₀
					Regresión	No hay correlación entre X y Y	t _r = 133,3	2,119	Rechazar H ₀
UHPLC-DAD	Isoquercetina (260 nm)	5,841-117,1	y = 0,5621x - 1,5005	0,998	Pendiente	t _b = 12,43	2,178	Rechazar H ₀	
					Intercepto	a = 0	t _a = -0,551	2,178	Aceptar H ₀
					Regresión	No hay correlación entre X y Y	t _r = 82,64	2,178	Rechazar H ₀
UHPLC-DAD	Astragalina (265 nm)	0,155-7,760	y = 0,4426x - 0,0494	0,999	Pendiente	t _b = 50,65	2,119	Rechazar H ₀	
					Intercepto	a = 0	t _a = -1,564	2,119	Aceptar H ₀
					Regresión	No hay correlación entre X y Y	t _r = 126,4	2,119	Rechazar H ₀
UHPLC-DAD	Isoquercetina (270 nm)	3,46-280,33	y = 5,9387x - 20,217	0,999	Pendiente	t _b = 66,88	3,1824	Rechazar H ₀	
					Intercepto	a = 0	t _a = -1,7122	3,1824	Aceptar H ₀
					Regresión	No hay correlación entre X y Y	t _r = 65,44	3,1824	Rechazar H ₀
UHPLC-DAD	Astragalina (270 nm)	2,06-166,66	y = 6,9336x - 14,019	0,997	Pendiente	t _b = 30,66	3,1824	Rechazar H ₀	
					Intercepto	a = 0	t _a = -0,7843	3,1824	Aceptar H ₀
					Regresión	No hay correlación entre X y Y	t _r = 30,57	3,1824	Rechazar H ₀

^a Coeficiente de correlación. ^b Hipótesis nula. ^c Valor de t de dos colas; n-2 g. l.; α = 0,05.

Precisión y exactitud

Como se ha mencionado, la precisión se evaluó como repetibilidad y precisión intermedia. Se observa en la tabla 5 que se cumplió con dicho parámetro en ambos métodos desarrollados, ya que tanto las 3 concentraciones analizadas para cada curva en un día, como el nivel intermedio evaluado en tres días consecutivos, presentaron valores de coeficiente de variación inferiores al 5 %, límite recomendado por la ICH. Adicionalmente, se observa en la tabla 6 que la exactitud, expresada como el porcentaje de recuperación, se encuentra entre el 102-107 %, con coeficientes de variación aceptables entre 1-4 %.

Tabla 5. Datos de precisión de las curvas de calibración de flavonoides evaluadas en cada técnica analítica

Técnica analítica	Curva de calibración	Repetibilidad (1 día)		Precisión intermedia (3 días)	
		Concentración (µg/ml)	%CV (n=3)	Concentración (µg/ml)	%CV (n=3)
UHPLC-DAD	Flavonoides totales (isoquercetina, 350 nm)	5,841	3,404	58,55	4,077
		58,55	2,888		
		117,1	1,014		
	Isoquercetina (260 nm)	5,841	1,082	58,55	3,223
		58,55	2,585		
		117,1	1,812		
Astragalina (265 nm)	0,155	0,457	3,880	1,531	
	3,880	2,678			
	7,760	2,569			
CE-DAD	Isoquercetina (270 nm)	280,33	2,57	93,44	2,99
		93,44	0,90		
		10,38	2,70		
	Astragalina (270 nm)	166,66	2,18	6,17	4,19
		55,55	1,60		
		2,06	3,19		

Tabla 6. Datos de exactitud de las curvas de calibración de flavonoides evaluadas en cada técnica analítica

Técnica analítica	Curva de calibración	Concentración (µg/ml)	Exactitud
			%Recuperación X ± %CV (n=3)
UHPLC-DAD	Flavonoides totales (isoquercetina, 350 nm)	5,841	102,2 ± 2,307
	Isoquercetina (260 nm)	5,841	106,5 ± 3,292
	Astragalina (265 nm)	0,155	103,1 ± 1,141
CE-DAD	Isoquercetina (270 nm)	10,38	103,4 ± 2,52
	Astragalina (270 nm)	2,06	106,7 ± 1,82

Límite de detección y límite de cuantificación

Para el método analítico por UHPLC-DAD se determinaron como límites de detección y cuantificación: 0,059 y 0,293 µg/ml para las curvas de FT e isoquercetina; y los puntos de concentración 0,02 y 0,1 µg/ml para la curva de calibración de astragalina. Valores superiores fueron determinados para el método desarrollado por electroforesis capilar; para el caso de astragalina, el límite de detección correspondió a 0,229 µg/ml y el de cuantificación a 0,686 µg/ml; mientras que en isoquercetina, el LDD establecido fue 1,15 µg/ml y el límite de cuantificación, 1,73 µg/ml.

Cuantificación de flavonoides en el extracto acuoso de *P. ligularis*

Al comparar los resultados de las dos técnicas analíticas empleadas para el análisis de flavonoides en hojas de granadilla, se observan algunas diferencias. Por un lado, que debido al fundamento de la técnica, la electroforesis capilar requiere de mayores consideraciones a evaluar para estudiar el complejo comportamiento de los analitos, especialmente en matrices complejas como extractos vegetales. Sin embargo, aunque en ambos métodos se empleó el mismo detector DAD, variaciones en algunos parámetros electroforéticos, permitirían aumentar la respuesta de detección UV-Vis para aumentar la posibilidad de análisis de metabolitos con muy baja absorción como las saponinas, también identificadas en extractos de *P. ligularis*. Cambios como el uso de BGE con TBS (para la formación de complejos)³², establecer valores bajos de pH y el uso de surfactantes para aportar cargas a este tipo de metabolitos³³, podrían tenerse en cuenta. Por el contrario, el desarrollo de la metodología por UHPLC, requirió de menos cambios a evaluar en las condiciones cromatográficas debido principalmente a

que se contaba con un método de partida para el análisis de especies de *Passiflora*. Aunque en ambos casos se cumplió con todos los parámetros de validación, el método por UHPLC-DAD demostró ser más sensible, al presentar límites de detección y cuantificación inferiores a los obtenidos por CE-DAD.

Una vez desarrollados y validados los métodos respectivos, se procedió a la cuantificación de los flavonoides de interés en el extracto acuoso. Se observa en la tabla 7 que el contenido de isoquercetina y astragalina obtenido, fue bastante similar entre las dos metodologías empleadas.

Tabla 7. Contenido de flavonoides de interés en el extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*

Flavonoide	Cuantificación por CE-DAD (µg/ ml)	Cuantificación por UHPLC-DAD (µg/ ml)
Isoquercetina	8,59 ± 2,61	9,021 ± 0,376
Astragalina	2,19 ± 0,95	1,762 ± 0,110

Nota: todos los valores son expresados como promedio ± DE ($n = 3$).

Adicionalmente, el contenido de flavonoides totales cuantificado mediante UHPLC-DAD en el extracto acuoso correspondió a: 40,22 ± 0,95 mg equivalentes de isoquercetina/g extracto seco. Valor que se buscó maximizar mediante el proceso de extracción optimizado descrito en el capítulo 5.

Conclusiones

Se desarrollaron dos métodos analíticos para el análisis y cuantificación de flavonoides en extractos polares de *Passiflora ligularis* mediante dos técnicas analíticas útiles en el estudio de productos naturales. Las condiciones más favorables para la resolución de los picos por cromatografía líquida UHPLC-DAD consistieron en una fase móvil que mezclara ácido fórmico (1,0 %)-acetonitrilo, en diferentes proporciones (desde 5 % hasta 40 % acetonitrilo) en varias rampas, a un flujo de 0,5 ml/min y 40 °C en el horno para una columna C-18. El método óptimo, desarrollado por electroforesis capilar, se obtuvo utilizando un capilar de sílica fundida de 40 cm efectivos, 50 µm de diámetro interno, TBS 50 mm, con 5 % de metanol como BGE (pH 9,3), manteniendo un voltaje de 20 kV y temperatura de 20 °C. Ambos métodos analíticos cumplieron con los parámetros de validación establecidos en la guía ICH 2005, y permitieron la cuantificación de los flavonoides seleccionados como marcadores terapéuticos de extractos de las hojas de *P. ligularis*. De este modo, se obtuvieron dos metodologías analíticas útiles para el control analítico requerido durante la etapa de desarrollo de un producto fitoterapéutico a partir de esta matriz vegetal.

Referencias

1. Fitzgerald M, Heinrich M, Booker A. Medicinal plant analysis: A historical and regional discussion of emergent complex techniques. *Front Pharmacol*. 2020; 10: 1480.
2. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2013. pp 1-72.
3. Leong F, Hua X, Wang M, Chen T, Song Y, Tu P *et al*. Quality standard of traditional Chinese medicines: Comparison between European Pharmacopoeia and Chinese Pharmacopoeia and recent advances. *Chin Med*. 2020; 15: 76.
4. Singla R, Jaitak V. Recent advances in plant metabolites analysis, isolation, and characterization. En: Yadav SK, Kumar V, Singh SP, editores. *Recent trends and techniques in plant metabolic engineering*. Singapur: Springer Nature Singapur; 2018. pp. 75-115.
5. Suntornsuk L. Capillary electrophoresis for pharmaceutical analysis: A survey on recent applications. *J Chromatogr Sci*. 2007; 45(9): 559-77.
6. Schuur B, de Haan AB, Kaspereit M, Leeman M. Chiral separations. En: Moo-Young M, editor. *Comprehensive biotechnology*. 2.^a ed. Burlington: Elsevier-Academic Press; 2018. Vol. 2, pp. 737-51.
7. Suntornsuk L. Capillary electrophoresis of phytochemical substances. *J Pharm Biomed Anal*. 2002; 27(5): 679-98.
8. Wu T, Yu C, Li R, Li J. Minireview: Recent advances in the determination of flavonoids by capillary electrophoresis. *Instrum. Sci. Technol*. 2018; 46(4): 364-86.
9. Sepúlveda P, Echeverry S, Costa G, Aragón-Novoa M. *Passiflora ligularis* leaf ultrasound-assisted extraction in the optimization of flavonoid content and enhancement of hypoglycemic activity. *J Appl Pharm Sci*. 2020; 10(8): 86-94.
10. Costa GM, Gazola AC, Madógllo FA, Zucolotto SM, Reginatto FH, Castellanos L *et al*. Vitexin derivatives as chemical markers in the differentiation of the closely related species *Passiflora alata* Curtis and *Passiflora quadrangularis* Linn. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 2013; 36: 1697-707.
11. Sepúlveda P, Costa GM, Aragón-Novoa D, Ramos F, Castellanos L. Analysis of vitexin in aqueous extracts and commercial products of Andean *Passiflora* species by UHPLC-DAD. *J Appl Pharm Sci*. 2018; 8(9): 081-6.
12. Tsimogiannis D, Samiotaki M, Panayotou G, Oreopoulou V. Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules*. 2007; 12(3): 593-606.
13. Watson DG. *Pharmaceutical analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*. 3.^a ed. Edimburgo: Elsevier; 2012. 12. High-performance capillary electrophoresis; pp. 301-57.

14. ICH. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Ginebra. 2005.
15. Vanhoenacker G, Sandra, P. High temperature and temperature programmed HPLC: Possibilities and limitations. *Anal Bioanal Chem.* 2008; 390(1): 245-8.
16. Gomes SVF, Portugal LA, dos Anjos JP, de Jesus ON, de Oliveira EJ, David JP *et al.* Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species. *Microchem J.* 2017; 132: 28-35.
17. Wosch L, dos Santos KC, Imig DC, Santos CAM. Comparative study of *Passiflora* taxa leaves: II. A chromatographic profile. *Rev Bras Farmacogn.* 2017; 27(1): 40-9.
18. Rotta EM, Rodrigues CA, Jardim IC, Maldaner L, Visentainer JV. Determination of phenolic compounds and antioxidant activity in passion fruit pulp (*Passiflora* spp.) using a modified QuEChERS method and UHPLC-MS/MS. *LWT.* 2019, 100: 397-403.
19. Zucolotto SM, Fagundes C, Reginatto FH, Ramos FA, Castellanos L, Duque C *et al.* Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochem Anal.* 2012; 23(3): 232-9.
20. Jiang TF, Li Y, Shi YP. Determination of six major flavonoid glycosides in *Saussurea mongolica* by capillary electrophoresis. *Planta Med.* 2004; 70(3): 284-7.
21. Johnson RT, Lunte CE. A capillary electrophoresis electrospray ionization-mass spectrometry method using a borate background electrolyte for the fingerprinting analysis of flavonoids in *Ginkgo biloba* herbal supplements. *Anal Methods.* 2016; 16(8): 3325-32.
22. Marchart E, Krenn L, Kopp B. Quantification of the flavonoid glycosides in *Passiflora incarnata* by capillary electrophoresis. *Planta Med.* 2003; 69(5): 452-6.
23. Wu T, Guan Y, Ye J. Determination of flavonoids and ascorbic acid in grapefruit peel and juice by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chem.* 2007; 100(4): 1573-9.
24. Xu X, Yu L, Chen G. Determination of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2006; 41(2): 493-499.
25. Costa GM, Gazola AC, Zucolotto SM, Castellanos L, Ramos FA, Reginatto FH *et al.* Chemical profiles of traditional preparations of four South American *Passiflora* species by chromatographic and capillary electrophoretic techniques. *Rev Bras Farmacogn.* 2016; 26(4): 451-8.
26. Unger M. Capillary electrophoresis of natural products: Current applications and recent advances. *Planta Med.* 2009; 75(7), 735-45.

27. Álvarez-Diduk R, Ramírez-Silva MT, Galano A, Merkoçi A. Deprotonation mechanism and acidity constants in aqueous solution of flavonols: A combined experimental and theoretical study. *J Phys Chem B*. 2013; 117(41): 12347-59.
28. Musialik M, Kuzmicz R, Pawlowski TS, Litwinienko G. Acidity of hydroxyl groups: An overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. *J Org Chem*. 2009; 74(7): 2699-709.
29. McGhie TK, Markham KR. Separation of flavonols by capillary electrophoresis: The effect of structure on electrophoretic mobility. *Phytochem Anal*. 1994; 5(3): 121-6.
30. Voirin B, Sportouch M, Raymond O, Jay M, Bayet, C, Dangles, O *et al*. Separation of flavone C-glycosides and qualitative analysis of *Passiflora incarnata* L. by capillary zone electrophoresis. *Phytochem Anal*. 2000; 11(2): 90-8.
31. Peng S, Zou L, Zhou W, Liu W, Liu C, McClements DJ. Encapsulation of lipophilic polyphenols into nanoliposomes using pH-driven method: Advantages and disadvantages. *J Agric Food Chem*. 2019; 67(26): 7506-11.
32. Emara S, Mohamed KM, Masujima T, Yamasaki K. Separation of naturally occurring triterpenoidal saponins by capillary zone electrophoresis. *Biomed Chromatogr*. 2001; 15(4): 252-6.
33. Wang S, Ye S, Cheng Y. Separation and on-line concentration of saponins from *Panax notoginseng* by micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr A*. 2006; 1109(2): 279-84.

Capítulo 5
**Estandarización del extracto
de hojas de *Passiflora
ligularis* Juss. (granadilla)**

Paula Michelle Sepúlveda Ramos^a
Sandra Milena Echeverry González^b
Geison Modesti Costa^c
Diana Marcela Aragón Novoa^d

- a.** Química farmacéutica. Universidad Nacional de Colombia. pmsepulvedar@unal.edu.co
- b.** Licenciada en Química. *M. Sc.*, *c. Ph. D.* Universidad Nacional de Colombia. smecheverryg@unal.edu.co
- c.** Farmacéutico. *Ph. D.* Profesor asociado, Departamento de Química, Pontificia Universidad Javeriana. modesticosta.g@javeriana.edu.co
- d.** Química farmacéutica. *Ph. D.* Profesora titular, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. dmaragonn@unal.edu.co

Introducción

En los últimos años, el uso y comercialización de fitoterapéuticos y preparaciones herbales (extractos, tinturas, aceites fijos o esenciales, decocciones, infusiones frías o calientes) se ha incrementado a nivel mundial¹. Sin embargo, a diferencia de los medicamentos cuyo ingrediente farmacéutico activo está completamente caracterizado, el desarrollo de productos farmacéuticos a base de plantas medicinales presenta diversos desafíos. Uno de ellos es la alta complejidad de las matrices vegetales que son empleadas como materias primas para su elaboración. Factores asociados a la edad fenológica de la planta o su genética, condiciones de cultivo (clima o propiedades del suelo), o acciones llevadas a cabo durante el periodo de poscosecha (tiempo de recolecta, almacenamiento o tipo de secado), pueden modificar la composición química de dicha matriz vegetal y, por ende, afectar las características del producto final².

Con el objetivo de disminuir esta variabilidad y garantizar la reproducibilidad, calidad, eficacia y seguridad de los productos farmacéuticos a base de plantas resulta necesario realizar procesos de estandarización de las preparaciones herbales. Este proceso consiste principalmente en identificar y establecer las características inherentes, parámetros constantes y valores cuantitativos finales de dichas preparaciones³⁻⁴. Para la estandarización de las preparaciones herbales como los extractos, es fundamental minimizar la variabilidad de factores asociados a su manufactura, es decir, deben controlarse aspectos de los procesos de extracción como: el estado de división de la droga, agitación, temperatura, condiciones de pH, naturaleza química de los solventes de extracción o tiempo durante el cual se realiza el procedimiento, con el fin de garantizar una concentración final fija del principio o los principios bioactivos⁵⁻⁶.

De acuerdo con las regulaciones de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), los extractos estandarizados se caracterizan por que sus constituyentes son los únicos agentes responsables de la actividad farmacológica y se encuentran dentro de un rango de concentración constante. Así mismo, la EMA diferencia una segunda clasificación denominada extractos cuantificados, en la cual estos presentan constituyentes químicamente definidos (marcadores bioactivos) que contribuyen al efecto terapéutico; sin embargo, no existe evidencia que indique que estos compuestos son los únicos responsables de la eficacia clínica. Finalmente, en un tercer grupo se encuentran aquellos extractos caracterizados con respecto a sus marcadores químicos, los cuales son compuestos que no están en relación con la actividad farmacológica, pero que son usados dentro del proceso de control de calidad con el fin de identificar adulteraciones⁷.

En el caso concreto del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*, la actividad hipoglucemiante ha sido atribuida a los flavonoides *O*-glicosilados. Los resultados mostrados hasta el momento en diferentes modelos de experimentación corroboran que la isoquercetina (quercetin-3-*O*-glucósido) y la astragalina (kaempferol-3-*O*-glucósido) son inhibidores de α -amilasa y α -glucosidasa. Así mismo, se demostró el efecto secretagogo de insulina del kaempferol-3-*O*-glucósido, y el efecto estimulante sobre la captación de glucosa del quercetin-3-*O*-glucósido mediante la activación de las rutas MAPK y MEK/ERK⁸⁻¹⁰.

Aunque la eficacia del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* ya ha sido demostrada, aún no puede considerarse como un extracto estandarizado. Por este motivo, con el objetivo de garantizar su calidad, eficacia y reproducibilidad se plantea optimizar el extracto de hojas de *P. ligularis* con respecto a su contenido de principios activos empleando el método de extracción asistida por ultrasonido, así como la evaluación de la estabilidad de los flavonoides bajo condiciones de estrés y la corroboración de la actividad hipoglucemiante en un modelo *in vivo* de tolerancia a la glucosa.

Metodología

Reactivos y equipos

El material vegetal se colectó en el municipio de Anolaima, Cundinamarca (latitud: 4°50,0172' N; longitud: 74°29,97' O; altitud: 1850 m s. n. m.), con el permiso de recolección de muestras otorgado por la ANLA y el Ministerio de Ambiente y Desarrollo: Biosprospección de especies de *Solanum*, *Passiflora*, *Physalis*, *Hypericum*, *Cecropia* e *Ilex*, código 38024 (Resolución 0699 de abril 26 de 2018, Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, Otrosí No. 7 al

Contrato 121 del 22 de enero del 2016). La especie colectada fue identificada por el Herbario Nacional Colombiano como *Passiflora ligularis* y se le asignó el número de colección COL 602878. Para la obtención del extracto, el material vegetal fue secado por liofilización empleando un equipo Labconco® Modelo LyphLock 6 y pulverizado en un molino de cuchillas.

Para la optimización del extracto de hojas de *P. ligularis* se seleccionó el método de extracción asistida por ultrasonido (EAU). Este procedimiento se llevó a cabo en un baño de ultrasonido digital Ultrasonic Cleaner (PS-30A; Shenzhen Huatai Ultrasonic Cleaning Machine Co. Ltd) con una potencia de 180W y una frecuencia de 40 KHz. Como solvente de extracción se utilizaron mezclas de etanol-agua destilada en diferentes proporciones (v/v) (etanol, 99,5 %, PanReac AppliChem). El diseño experimental se planteó y analizó usando el *software* estadístico Minitab® (versión 17, State College, EE.UU.). Para obtener los extractos secos se requirió el uso de un evaporador giratorio (Heidolph®, Alemania). La cuantificación de flavonoides totales se realizó acorde a lo descrito en el capítulo 4.

Para las diferentes pruebas de estabilidad bajo condiciones de estrés se emplearon los reactivos de NaOH, HCl y H₂O₂, los cuales fueron adquiridos de Scharlau, J.T. Baker y Panreac, respectivamente.

En la evaluación de la capacidad antiglicante se utilizaron como reactivos la fracción V de albúmina sérica bovina (Roche) y D(-)-Ribosa extra pura (Scharlau). El flavonoide quercetina (≥ 95 %) (HPLC, Sigma-Aldrich®) fue usado como control positivo, y al igual que las muestras del extracto optimizado se disolvió en dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich®, $> 99,9$ %). Como medio de reacción se usó una solución de *buffer* fosfato a pH 7,4 (50 mM), acidificada con NaN₃ al 0,02 % (Sigma-Aldrich®, $\geq 99,5$ %). La incubación de las muestras se realizó en un equipo Heidolph® Polymax 1040-Inkubator 1000, y la cuantificación de los productos finales de la glicación avanzada se llevó a cabo en un equipo TECAN GENios FL (λ_{exc} 360 nm; λ_{em} 465 nm).

Para el ensayo de actividad hipoglicemiante, los animales de experimentación fueron suministrados por bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Los reactivos de glucosa y glibenclamida fueron de la marca Sigma-Aldrich®. Finalmente, este bioensayo contó con el aval del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias, sede Bogotá (Acta 09 de 2018).

Optimización del extracto de hojas de *P. ligularis* en cuanto a su contenido de flavonoides totales

Con el objetivo de determinar qué variables del proceso de extracción tienen influencia sobre el contenido de los principios bioactivos del extracto de hoja de *P. ligularis*, se empleó la metodología de superficie de respuesta partiendo de un diseño experimental Box-Behnken con tres puntos centrales. Como

variables dependientes o factores del proceso de EAU se analizaron el tiempo de extracción, la temperatura y el solvente de extracción, específicamente mezclas etanol-agua en diferentes proporciones. Cada uno de los factores se evaluó en tres niveles: bajo (-1), medio (0) y alto (+1) (tabla 1). Finalmente, los extractos fueron caracterizados de acuerdo con su contenido de flavonoides totales y su capacidad antiglicante (tabla 6). Sin embargo, solo se optimizó el proceso EAU con respecto a la variable de CFT.

Tabla 1. Factores, niveles y variables respuesta considerados en el diseño experimental Box-Behnken

Factor	Unidad	Nivel		
		-1	0	+1
X ₁ Tiempo	min	20	40	60
X ₂ Temperatura	°C	30	50	70
X ₃ Solvente de extracción	% etanol	60	80	100
Variable respuesta				
Y ₁ Contenido de flavonoides totales (CFT)	mg equivalentes de isoquercetina/g extracto seco			
Y ₂ Capacidad antiglicante	% inhibición de formación de AGE			

Las variables correspondientes al tamaño de partícula y relación droga-solvente se establecieron como variables fijas dentro del proceso de extracción. El material vegetal empleado fue pulverizado y tamizado, seleccionándose para la extracción únicamente el colectado en el tamiz 40 (luz de malla: 1,213 mm), el cual es considerado de acuerdo con la guía de Métodos de Control de Calidad para Materiales de Plantas Medicinales de la OMS como un material fino debido a que presenta a un tamaño de partícula inferior a 2,0 mm¹¹. Por otra parte, la relación droga-solvente se trabajó 1:20, debido a que es una proporción aceptada para trabajar en escala de laboratorio, además de ser una condición óptima de extracción de este tipo de compuestos en el método de extracción por ultrasonido¹²⁻¹⁴.

Elaboración del extracto optimizado empleando el método de extracción asistida por ultrasonido (EAU)

Un gramo del material vegetal pulverizado se colocó en contacto con 20 ml del solvente de extracción (solución etanol-agua). La muestra se colocó dentro de un baño de ultrasonido por un periodo de tiempo y bajo condiciones de temperatura de acuerdo con las establecidas en el diseño experimental Box-Behnken (tabla 6). Los extractos fluidos obtenidos fueron filtrados por gravedad,

el etanol se eliminó por presión reducida, mientras que el agua remanente fue retirada por liofilización. Finalmente, los extractos secos fueron almacenados bajo condiciones de refrigeración (4 ± 2 °C) hasta la cuantificación del contenido de flavonoides totales y los análisis posteriores.

Modelo Rib-ABS para determinación de la capacidad antiglicante

Como evaluación preliminar de la actividad biológica de los extractos, se determinó la capacidad antiglicante o inhibitoria de la formación de productos de glicación avanzada (AGE, por *advanced glycation end-products*). Para la realización de este ensayo *in vitro* se siguió la metodología propuesta por Derbré *et al.*, con algunas modificaciones¹⁵⁻¹⁶. La albúmina, la ribosa y las muestras (incluyendo el control quercetina) se incorporaron en la solución de *buffer* fosfato, en las proporciones que se muestran en la tabla 2. Las soluciones *stock* de los extractos se prepararon a una concentración de 12,5 mg/ml en DMSO, y luego se tomó una alícuota de 80 μ l y se llevó a un volumen de 100 μ l con el *buffer* fosfato. En el caso de quercetina, se partió de una solución de 2 mg/ml en DMSO para llegar a una solución *stock* de 1,4 mg/ml llevada a volumen con *buffer* fosfato.

La reacción se llevó a cabo directamente en microplacas de 96 pozos, las cuales fueron incubadas por 24 horas a 37 °C y agitación constante (50 rpm) antes de la cuantificación de los productos de glicación avanzada por fluorescencia. Las lecturas se realizaron en un espectrofluorómetro TECAN GENios FL equipado con un filtro de excitación de 360 nm y un filtro de emisión de 465 nm. El porcentaje de inhibición de la formación de los productos de glicación avanzada (AGE) se calculó usando la ecuación 1:

Ecuación 1

$$\% \text{ de inhibición de AGE} = \left[1 - \left(\frac{F_I - F_{BI}}{F_{100\%} - F_{B100\%}} \right) \right] \times 100$$

Donde:

F_I = fluorescencia de la solución del inhibidor

F_{BI} = fluorescencia de la solución blanco del inhibidor

$F_{100\%}$ = fluorescencia de la solución control 100 %

$F_{B100\%}$ = fluorescencia de la solución blanco del control 100 %

Tabla 2. Soluciones de reacción evaluadas en el ensayo de capacidad antiglicante

Solución inicial	Concentración stock	Inhibidor	Blanco del inhibidor	100 %	Blanco del 100 %	Concentración final en placa
Albúmina	14,3 mg/ml	70 µl	70 µl	70 µl	70 µl	10 mg/ml
D-Ribosa	5 M	10 µl	---	10 µl	---	0,5 M
Muestra (extracto)	10 mg/ml	5 µl	5 µl	---	---	500 µg/ml
Control (quercetina)	1,4 mg/ml	5 µl	5 µl	---	---	70 µg/ml
Buffer fosfato	50 mm	15 µl	25 µl	20 µl	30 µl	---

Actividad hipoglicemiante

En este bioensayo se emplearon como biomodelo ratones Swiss ICR (hembras de 47-52 semanas), los cuales se mantuvieron bajo condiciones de temperatura controlada, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y consumo de alimento y agua *ad libitum*. Previo a la realización de la prueba, los animales tuvieron un período de ayuno de 6 horas. Los tratamientos fueron administrados vía intragástrica empleando una cánula, y treinta minutos después se realizó la administración de la sobrecarga de glucosa (2000 mg glucosa/kg) (tabla 3). Los niveles de glucosa en sangre (NGS) se monitorearon 30, 60 y 120 minutos después de la sobrecarga utilizando un equipo Accu-Chek Performa®. Las muestras de sangre se colectaron a través de un único corte en vena lateral de la cola del roedor.

Tabla 3. Grupos evaluados en el bioensayo de actividad antihiperглиcemiante

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg)
I	Vehículo (agua destilada)	---
II	Glibenclamida como control positivo	(200 mg/kg)
III	Extracto acuoso ^a	(250 mg/kg)
IV	Extracto optimizado ^b	(250 mg/kg)

Nota: cada uno de los grupos contó con un $n = 6$.

^a Extracto obtenido mediante el método de infusión.

^b Extracto obtenido mediante el método EAU.

Estabilidad bajo condiciones de estrés o degradación forzada

Para la evaluación de estabilidad del extracto optimizado en las condiciones de hidrólisis neutra, ácida y alcalina, oxidación y fotólisis se siguió la metodología planteada por Singh y Bakshi¹⁷ (figura 1, tablas 4-5). Dependiendo de las condiciones a las cuales se alcanzó el porcentaje significativo de degradación del CFT (20-80 %), el extracto se clasificó dentro de alguna de las siguientes categorías: prácticamente estable, muy estable, estable, lábil, muy lábil o extremadamente lábil, en lo que respecta a las condiciones de hidrólisis y oxidación; o como fotolábil o fotoestable para el caso particular de fotólisis¹⁷.

Tabla 4. Condiciones y sistema de clasificación en la evaluación de estabilidad bajo condiciones de estrés

Condición	Medio	Conc.	T (h)	Temp. (°C)	Degradación (%)	Categoría
Hidrólisis neutra	H ₂ O	---	120	Reflujo	< 20	Prácticamente estable
		---	48	Reflujo	20-80	Muy estable
		---	24	Reflujo	20-80	Estable
		---	12	Reflujo	20-80	Lábil
		---	8	40	20-80	Muy lábil
		---	2	25	20-80	Extremadamente lábil
Hidrólisis ácida	HCl	5 N	48	Reflujo	< 20	Prácticamente estable
		2 N	24	Reflujo	20-80	Muy estable
		1 N	12	Reflujo	20-80	Estable
		0,1 N	8	Reflujo	20-80	Lábil
		0,01 N	8	40	20-80	Muy lábil
		0,01 N	2	25	20-80	Extremadamente lábil
Hidrólisis alcalina	NaOH	5 N	48	Reflujo	< 20	Prácticamente estable
		2 N	24	Reflujo	20-80	Muy estable
		1 N	12	Reflujo	20-80	Estable
		0,1 N	8	Reflujo	20-80	Lábil
		0,01 N	8	40	20-80	Muy lábil
		0,01 N	2	25	20-80	Extremadamente lábil

Oxidación	1	30 %	48	Temp. amb.	< 20	Prácticamente estable
	2	10 %	24	Temp. amb.	20-80	Muy estable
	3	3 %	24	Temp. amb.	20-80	Estable
	4	3 %	6	Temp. amb.	20-80	Lábil
	5	1 %	3	Temp. amb.	20-80	Muy lábil
	6	1 %	0,5	Temp. amb.	20-80	Extremadamente lábil

Tabla 5. Condiciones y sistema de clasificación en la evaluación de estabilidad bajo condiciones de estrés fotolítico

Exposición	Temperatura	% de degradación	Categoría
1,2 * 10 ⁶ lux·h	Temp. amb.	20-80	Fotoestable
6,0 * 10 ⁶ lux·h	Temp. amb.	< 20	Fotolábil

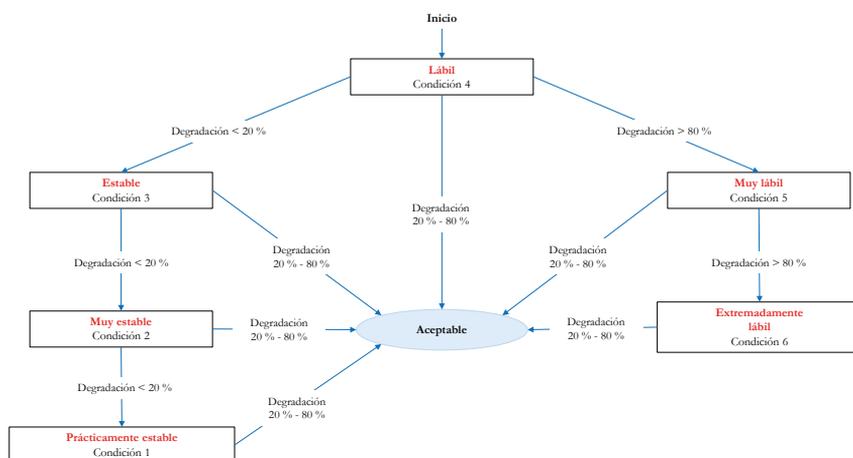


Figura 1. Diagrama de decisión para el desarrollo de estudios de estabilidad bajo condiciones de hidrólisis neutra, hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina y oxidación.

Resultados y discusión

En este apartado se expondrán los principales resultados encontrados en el proceso de desarrollo y caracterización del extracto optimizado de hojas de *P. ligularis* con respecto al contenido de flavonoides totales. Primero se presenta el análisis del diseño experimental Box-Behnken, cuyo objetivo fue encontrar las condiciones óptimas de extracción de los compuestos activos presentes en

el material vegetal empleando el método de EUA. Posteriormente, se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de estabilidad del extracto optimizado frente a condiciones de estrés, específicamente, hidrólisis, hidrólisis ácida, hidrólisis básica, oxidación y fotólisis. Finalmente, con base en los resultados *in vitro* e *in vivo* se demuestra que el extracto optimizado presenta una mayor capacidad antiglicante y mayor actividad hipoglicemiante en comparación con el extracto acuoso obtenido por infusión.

Fundamentos del método de extracción asistida por ultrasonido (EAU)

La extracción asistida por ultrasonido (EAU) es un método de extracción no convencional que se basa principalmente en el fenómeno de cavitación acústica (figura 2). Cuando una onda del ultrasonido causa una presión negativa suficiente a través de un líquido, la distancia entre las moléculas de este excede la distancia mínima molecular requerida para mantener el líquido intacto, lo que genera la ruptura entre las fuerzas de cohesión y a su vez provoca la formación burbujas de cavitación¹⁸. Cuando las burbujas alcanzan un tamaño crítico colapsan liberando la presión e incrementando la temperatura. Esta implosión genera a su vez microburbujas que chocan sobre la superficie de las partículas del material vegetal causando una disrupción de la pared celular, facilitando la penetración del solvente a través de la matriz y, de esta manera, aumentando la difusión de los principios activos al exterior¹⁸⁻²⁰.

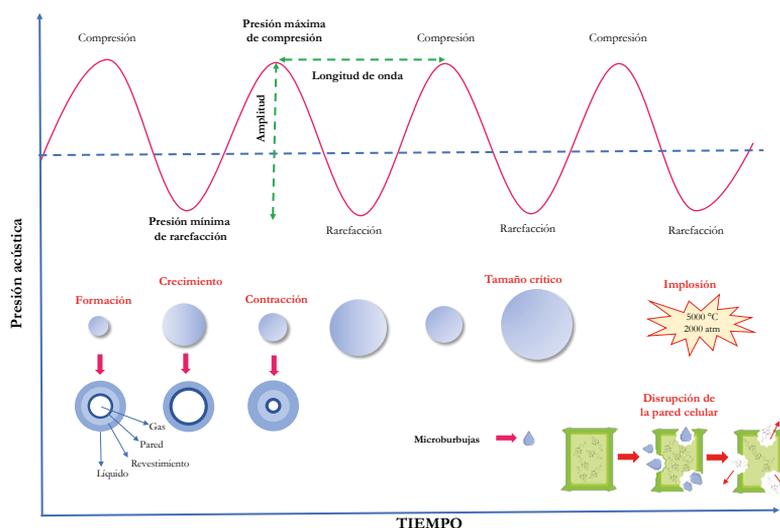


Figura 2. Esquematización del fenómeno de cavitación acústica durante el método de extracción asistida por ultrasonido.

Nota: gráfico tomado y modificado de Lavilla *et al.*²².

La EAU presenta grandes ventajas con respecto a otros métodos de extracción empleados en la investigación de productos naturales. En comparación con los métodos tradicionales (destilación y extracción por solventes), la EAU presenta una mayor eficiencia de extracción sólido-líquido de los principios bioactivos de diferentes matrices vegetales^{19,22-23}. Así mismo, también ha demostrado ser un método eficaz en la extracción de compuestos termolábiles, como algunos compuestos fenólicos²². La EAU es un método más sencillo, reproducible y económico que otras técnicas de extracción no convencionales como la extracción con fluidos supercríticos o la extracción asistida por microondas, ya que requiere tiempos de extracción más cortos y menores volúmenes de solvente²⁴⁻²⁶. Además, es considerada como una tecnología segura, sustentable con el medio ambiente y factible para el escalamiento a nivel industrial²⁷.

Optimización del extracto de hojas de *P. ligularis* en cuanto a su contenido de flavonoides totales

Cuando se opta por un método de extracción se deben considerar todas las variables que pueden llegar a influenciar la eficiencia y el rendimiento del proceso. Para el método de EAU, se conoce que variables como la potencia, la frecuencia, el tiempo, la temperatura, el tamaño de partícula del material vegetal, el tipo de disolvente y su interacción con el material de extracción tienen influencia sobre el resultado final del extracto obtenido²⁸. Por ejemplo, altas temperaturas contribuyen a un mejor proceso de extracción, ya que incrementan el número de burbujas de cavitación presentes en el medio. Adicionalmente, aumenta el área de contacto entre el sólido-líquido y disminuye la viscosidad del solvente, lo cual facilita el proceso de difusión de los compuestos presentes en el material vegetal²⁹⁻³⁰. Por otra parte, las mezclas hidroetanólicas son ampliamente usadas en el método de EAU para la extracción de compuestos fenólicos debido a que son consideradas seguras y amigables con el medio ambiente^{15,31-33}.

Particularmente, para la obtención del extracto de hojas de *P. ligularis* las variables del método de EAU seleccionadas fueron: tiempo, temperatura y porcentaje de etanol requerido para la extracción. Como se mencionó anteriormente, para determinar las condiciones a las cuales cada una de estas variables o factores permiten extraer la mayor cantidad de flavonoides totales del material vegetal, se partió de un diseño experimental Box-Behnken con tres puntos centrales. Finalmente, se evaluaron y caracterizaron 15 extractos preparados de acuerdo con las condiciones que se muestran en la tabla 6.

Los datos obtenidos se analizaron mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR). El análisis de varianza (ANOVA) mostró que el modelo de regresión generado para la variable de contenido de flavonoides totales (CFT) fue altamente significativo ($p < 0,01$). Los valores de los parámetros de falta de ajuste y coeficiente de determinación (R^2) fueron de 0,296 y 0,9613,

respectivamente, lo cual indica que el modelo tiene la capacidad de explicar correctamente la variabilidad de la respuesta (tabla 7). Así mismo, se generó la ecuación polinómica de segundo orden que describe la función de la variable predicha (ecuación 2).

Ecuación 2

$$Y_1 = -14,2 - 0,366X_1 - 0,085X_2 + 2,347X_3 - 0,00433X_1^2 + 0,00277X_2^2 - 0,01878X_3^2 + 0,00319X_1X_2 + 0,00684X_1X_3 - 0,00312X_2X_3$$

Igualmente, el análisis estadístico mostró que el único factor significativo en el proceso de EAU fue el porcentaje de etanol empleado como solvente de extracción ($p < 0,05$). Con respecto a las interacciones entre factores, se encontró que ninguna fue significativa ($p > 0,05$), es decir, no tienen influencia sobre la variable respuesta de CFT.

Tabla 6. Contenidos de flavonoides totales y capacidad antiglicante de los tratamientos planteados mediante el diseño experimental Box-Behnken

Tto.	Factor			Variable	
	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2
1	-1	0	1	35,56 ± 1,02	43,09 ± 1,06
2	-1	0	-1	53,04 ± 0,91	52,79 ± 1,19
3	0	-1	1	25,97 ± 0,57	32,46 ± 1,68
4	1	1	0	53,26 ± 0,99	52,20 ± 1,13
5	0	0	0	47,68 ± 2,23	48,86 ± 1,85
6	-1	-1	0	48,49 ± 1,08	46,46 ± 1,15
7	1	0	-1	54,59 ± 0,14	54,84 ± 0,84
8	1	-1	0	52,54 ± 1,24	51,77 ± 0,66
9	0	0	0	51,03 ± 1,98	50,89 ± 0,69
10	0	1	-1	50,55 ± 1,17	49,54 ± 0,68
11	0	0	0	51,97 ± 2,28	50,89 ± 1,80
12	0	-1	-1	54,68 ± 1,13	56,77 ± 0,78
13	1	0	1	32,13 ± 0,98	39,97 ± 0,66
14	-1	1	0	44,12 ± 1,51	48,17 ± 2,8
15	0	1	1	32,78 ± 1,07	41,46 ± 0,55

Nota: Tto.: tratamiento; X_1 : tiempo de extracción (min); X_2 : temperatura (°C); X_3 : solvente de extracción (% de etanol); Y_1 : contenido de flavonoides totales (cft), expresado como mg eq. de isoquercetina/g extracto seco; Y_2 : capacidad antiglicante, expresada como % de inhibición de formación de AGEs. Los resultados se muestran como el valor promedio ± desviación estándar ($n = 3$).

Tabla 7. Análisis de varianza ANOVA para la variable respuesta de CFT

Fuente	G. l.	SC Ajust	MC Ajust	Valor F	Valor p*
Modelo	9	1219,68	135,520	13,80	0,005
Lineal	3	951,95	317,317	32,32	0,001
X ₁	1	0,12	0,120	0,01	0,916
X ₁	1	16,04	16,044	1,63	0,257
X ₃	1	935,79	935,787	95,32	0,000
Cuadrático	3	225,05	75,015	7,64	0,026
X ₁ ²	1	11,07	11,075	1,13	0,337
X ₁ ²	1	4,55	4,548	0,46	0,526
X ₃ ²	1	208,40	208,401	21,23	0,006
Producto cruzado	3	42,69	14,228	1,45	0,334
X ₁ X ₂	1	6,50	6,499	0,66	0,453
X ₁ X ₃	1	29,96	29,965	3,05	0,141
X ₂ X ₃	1	6,22	6,221	0,63	0,462
Error	5	49,09	9,818		
Falta de ajuste	3	38,86	12,954	2,53	0,296
Error puro	2	10,23	5,113		
Total	14	1268,77			

Nota: X₁: tiempo de extracción (min); X₂: temperatura (°C); X₃: solvente de extracción (% de etanol); G. l: grados de libertad; SC Ajust: suma ajustada de los cuadrados; MC ajust: cuadrados medios ajustados; * nivel de significancia $\alpha = 0,05$.

Las gráficas de superficie de respuesta son un elemento de gran importancia dentro del análisis puesto que representan de manera visual y tridimensional la ecuación polinómica de segundo orden que describe el comportamiento de la variable dependiente³⁴. En la figura 3b y 3c se puede apreciar con mayor claridad el efecto del porcentaje de etanol (X₃) sobre el CFT, el cual según el ANOVA fue el único factor significativo. Soluciones con un 60-70 % de alcohol permitieron extraer un mayor contenido de los compuestos fenólicos de la matriz vegetal (> 50 mg eq. de isoquercetina/g de extracto seco), mientras que valores superiores al 70 % llevaron a una disminución en la eficiencia de extracción de estos compuestos.

Este comportamiento puede ser explicado por la naturaleza de los solventes empleados en la extracción. El agua es un solvente de alta polaridad que penetra dentro de las células; estas se hinchan e incrementan el área de superficie de contacto con el solvente. Así mismo, disminuye la viscosidad de la mezcla³¹. Además, el etanol, al ser menos polar que el agua, contribuye a la

difusión al medio de los compuestos de alta y media polaridad como: flavonoides glicosilados, azúcares, aminoácidos, nucleótidos y polisacáridos^{22, 35-36}.

Por otra parte, aunque las variables de tiempo (X_1) y temperatura (X_2) no fueron significativas, se puede apreciar en la figura 3a que la variable respuesta (CFT) aumenta cuando se trabajan temperaturas de extracción superiores a los 60 °C durante un tiempo de alrededor de 40 minutos.

Como último paso del análisis estadístico se determinaron las condiciones a las cuales se logra extraer el mayor contenido de flavonoides de las hojas de *P. ligularis*. Empleando la opción Optimización del *software* Minitab® se encontró para los factores de tiempo, temperatura y porcentaje de etanol valores óptimos de extracción: 32,92 minutos, 70 °C y 62,82 %, respectivamente. Bajo estas condiciones el modelo estimó un valor predicho de la variable respuesta (CFT) de 57,77 mg eq. de isoquercetina/g de extracto seco.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de extracción, se procedió a hacer la validación experimental de las mismas. Para ello, los valores determinados para cada factor fueron aproximados de la siguiente manera: tiempo:

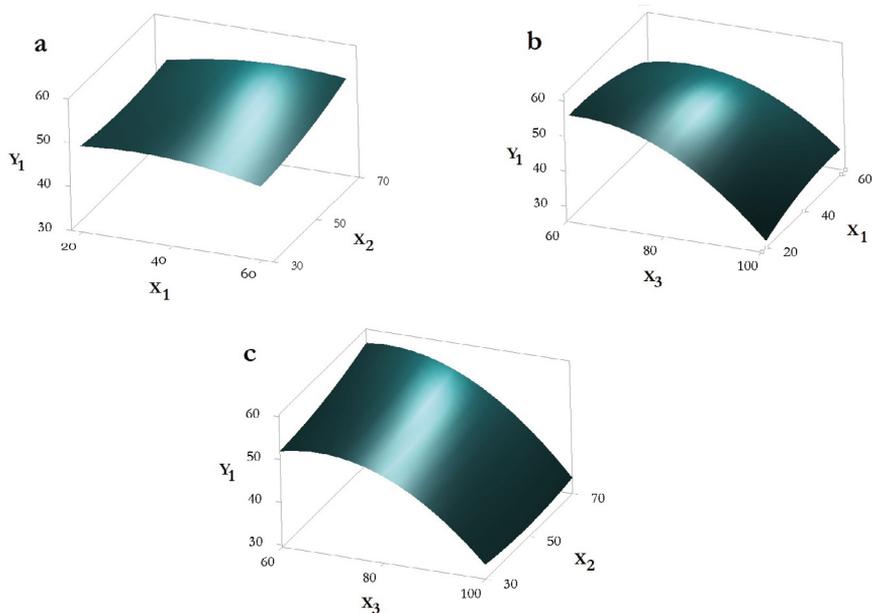


Figura 3. Gráficos de superficie de respuesta que muestran los efectos relativos de los factores del proceso de EAU sobre la variable contenido de flavonoides totales (CFT).

Nota: X_1 : tiempo de extracción (min); X_2 : temperatura (°C); X_3 : solvente de extracción (% de etanol); Y_1 : contenido de flavonoides totales (CFT). Valores fijos: $X_1 = 40$, $X_2 = 50$, $X_3 = 80$. Las áreas más claras representan la región donde se espera encontrar los valores más altos de la variable respuesta (CFT).

33 minutos, temperatura: 70 °C y porcentaje de etanol: 63 %. Se prepararon tres lotes independientes del extracto en días diferentes y cada uno por triplicado. El CFT fue hallado experimentalmente y comparado con el valor predicho por el modelo estadístico mediante la determinación del error porcentual medio absoluto (MAPE, por *mean absolute percentage error*) (ecuación 3).

Ecuación 3

$$MAPE = \frac{100}{n} \sum_{(i=1)}^n \frac{|C_{ei} - C_{ci}|}{C_{ci}}$$

Donde:

C_{ei} : CFT hallado experimentalmente.

C_{ci} : CFT predicho por el modelo de regresión.

n: número de datos experimentales.

El CFT para cada uno de los tres lotes elaborados fue $57,70 \pm 4,285$; $60,15 \pm 2,119$ y $61,44 \pm 0,547$ mg eq. de isoquercetina/g de extracto seco. Con base en estos valores se establece que el extracto de hojas de *P. ligularis* obtenido empleando el método de EAU bajo las condiciones óptimas de extracción presenta un valor promedio de flavonoides totales de 59,76 mg eq. de isoquercetina/g de extracto seco. Así mismo, al presentar un coeficiente de variación inferior al 5 % (3,18 %) se puede concluir que es un método reproducible. El valor MAPE calculado (3,35 %) fue inferior al 10 %, lo que indica que el modelo de regresión generado para la variable respuesta de CFT tiene alta capacidad predictiva, es decir que el valor predicho es cercano al valor experimental.

Por último, se realizó la comparación entre el extracto de hojas de *P. ligularis* obtenido por EAU bajo las condiciones óptimas y el extracto obtenido por infusión, el cual es el método de extracción más usado en la medicina tradicional. La comparación se centró en cuatro aspectos: perfil cromatográfico, contenido de flavonoides totales, contenido de isoquercetina y contenido de astragalina. En la figura 4 se observa que el perfil cromatográfico para ambos extractos presenta el mismo número de señales correspondientes a flavonoides. Sin embargo, la intensidad de estas es mayor en el perfil correspondiente al extracto optimizado. Este resultado es acorde a la cuantificación de flavonoides, ya que el método de EAU permitió incrementar en un 33 % el contenido de estos compuestos en comparación al extracto preparado por el método de infusión ($40,22 \pm 0,95$ mg equivalentes de isoquercetina/g de extracto seco).

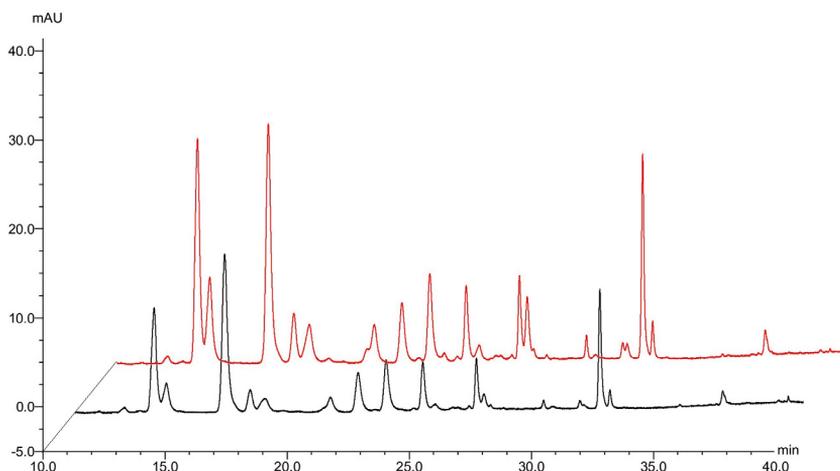


Figura 4. Perfil cromatográfico del extracto de hojas de *P. ligularis*.

Nota: rojo: extracto optimizado por EAU; negro: extracto obtenido por infusión. La cuantificación del CFT se realizó bajo las condiciones cromatográficas: fase estacionaria: Phenomenex® Kinetex C18 (100 × 2,1 mm; 2,6 μm). Fase móvil A: ácido fórmico (1 %); Fase móvil B: ACN. El gradiente inicia en 5-10 % B (0-10 min), 10-13 % B (10-20 min), 13-18 % B (20-25 min), 18-25 % B (25-32 min), 25-40 % B (32-38 min), 40-5 % B (38-40 min). Flujo de 0,5 ml/min. Temperatura: 40 °C. Volumen de inyección: 10 μl. Longitud de onda de cuantificación (λ): 350 nm.

Capacidad antiglicante y su relación con el contenido de flavonoides totales

La diabetes mellitus (DM) es considerada un síndrome metabólico que se produce por alteraciones en la secreción o acción de la hormona insulina, que generan un incremento en los niveles de glucosa en sangre y alteraciones en el metabolismo de lípidos y proteínas³⁷. En sus estados más crónicos, la DM está asociada con daño tisular irreversible debido en gran parte a la glicosilación no enzimática de las proteínas (figura 5). Este proceso ocurre mediante una serie de reacciones que inician con la generación de una base de Schiff debido a la interacción del grupo carbonilo de los monosacáridos y el grupo amino de las proteínas, aminoácidos, lípidos o ácidos nucleicos. Las bases de Schiff son especies químicas inestables y reversibles que sufren un reordenamiento de Amadori para formar cetoaminas estables, las cuales pueden sufrir reacciones de deshidratación, oxidación, transposición o fragmentación que conducen finalmente a la formación de AGE³⁸⁻³⁹.

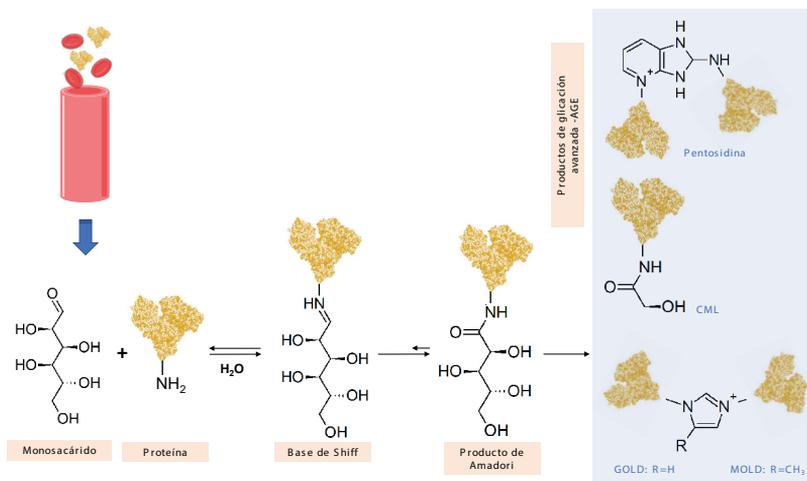


Figura 5. Proceso de glicosilación no enzimática.

Nota: CML: carboximetil lisina; GOLD: glioxal-lisina dimer; MOLD: metilglioxal-lisina dimer. Gráfico tomado y modificado de Kumar Pasupulati *et al.*⁴⁰.

Una vez formados los AGE, estos interactúan con los receptores celulares del tejido muscular liso, macrófagos, astrocitos y células endoteliales, generando alteraciones en diferentes rutas de señalización intracelular y en la expresión genética, lo cual desencadena procesos inflamatorios y de estrés oxidativo que conllevan daños a nivel tisular^{40, 42}. De esta manera, concentraciones elevadas de los productos de glicosilación avanzada constituyen uno de los factores más relevantes en el desarrollo y progresión de algunas de las complicaciones de la diabetes (aterosclerosis, retinopatía, nefropatía y neuropatía). Es por esta razón que el estudio de moléculas capaces de inhibir la glicosilación no enzimática de las proteínas es de gran importancia en la búsqueda de estrategias terapéuticas para el tratamiento de la DM.

Aunque los fármacos antidiabéticos son indirectamente inhibidores de la formación de AGE debido a que disminuyen los niveles de glucosa en sangre, algunos como la metformina forman directamente aductos con especies de carbonilo como el glioxal, el cual es producto de la autooxidación de la glucosa y la peroxidación lipídica⁴². Principios activos derivados de productos naturales también pueden actuar de manera directa como inhibidores de AGE. Específicamente, compuestos fenólicos como los flavonoides son capaces de intervenir en diferentes mecanismos del proceso de glicosilación avanzada. Debido a su potencial antioxidante, pueden retardar o prevenir la propagación de especies reactivas de oxígeno generadas en la etapa de glicosilación temprana,

cuando se establece el enlace covalente entre los grupos carbonilo y amino. Así mismo, pueden intervenir en reacciones post productos Amadori mediante el bloqueo de los grupos carbonilo de los monosacáridos o ejerciendo un efecto de atrapamiento sobre los grupos dicarbonilos de los productos precursores de los AGE⁴³⁻⁴⁴.

Extractos acuosos e hidroalcohólicos de diferentes especies vegetales caracterizadas por su alto contenido de compuestos fenólicos también han demostrado su poder inhibitorio frente a la glicación no enzimática de proteínas⁴⁵. Las *Passiflora* son reconocidas por presentar altos contenidos de flavonoides, característica que hace que extractos derivados de especies de este género sean prometedores como agentes inhibidores de AGE. Concretamente, extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Passiflora alata* y *Passiflora edulis* reportan porcentajes de capacidad antiglicante entre el 10-20 % en concentraciones inferiores a 10 µg/ml⁴⁶. Así mismo, se ha demostrado que el extracto de *Passiflora manicata* también disminuye la producción de AGE de manera altamente significativa⁴⁷.

Con base en los reportes previos encontrados para especies del mismo género de *P. ligularis*, se estableció mediante el método de coeficiente de correlación de Spearman (ρ) la asociación entre los valores del contenido de flavonoides totales de los tratamientos del diseño experimental Box-Behnken con su respectiva capacidad inhibitoria de productos de glicación no enzimática (figura 6). El análisis estadístico mostró una correlación altamente significativa entre ambas variables evaluadas ($\rho = 0,9821$; $p < 0,0001$), la cual fue de tipo monótonica, es decir, los tratamientos con las mayores concentraciones de estos compuestos fenólicos mostraron mayor capacidad antiglicante.

Una vez optimizado el extracto de hojas de *P. ligularis* con respecto al contenido de flavonoides totales se evaluó su capacidad antiglicante. El porcentaje de inhibición de AGE determinado para el extracto optimizado fue $58,79 \pm 0,51$ %, valor que al ser comparado con los porcentajes de inhibición de los tratamientos del diseño experimental Box-Behnken es superior.

Además, se determinó la concentración mínima inhibitoria de AGE (IC₅₀) del extracto optimizado, el extracto acuoso, algunos de los flavonoides mayoritarios presentes en ambos extractos (isoquercetina y astragalina) y el flavonoide quercetina, el cual fue usado como control en el ensayo *in vitro* de glicación. El IC₅₀ hallado para el extracto obtenido por EAU fue de 380,3 µg/ml, un valor muy inferior al determinado para el extracto acuoso (641,2 µg/ml), lo cual indica que el proceso de optimización con respecto al contenido de flavonoides contribuye efectivamente en el incremento de la capacidad antiglicante, ya que se requiere una menor concentración del extracto optimizado para inhibir el 50 % en el proceso de formación de productos finales de glicación avanzada.

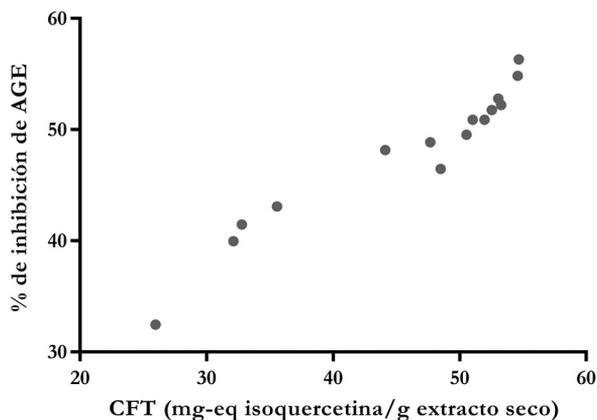


Figura 6. Representación gráfica de la correlación Spearman para las variables de CFT y capacidad antiglicante.

Con respecto a los flavonoides individuales, los valores de IC_{50} determinados para isoquercetina, astragalina y quercetina fueron: 78,03 $\mu\text{g/ml}$, 24,58 $\mu\text{g/ml}$ y 22,95 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Al contrastar estos valores con los reportados en la literatura se encuentran amplias variaciones, ya que estos dependen directamente del tipo de modelo de glicación *in vitro* empleado junto con las condiciones experimentales seleccionadas en el momento de realizar las mediciones de fluorescencia (longitud de onda de emisión y excitación)⁴⁸. No obstante, es de resaltar lo promisorios que pueden llegar a ser estos compuestos como inhibidores de la glicación no enzimática de proteínas. Específicamente, flavonoides de tipo flavonas, flavonoles y flavan-3-oles (como isoquercetina y astragalina) presentan mayor actividad que las flavonas e isoflavonas⁴⁹.

Actividad hipoglicemiante

Para la evaluación de la actividad farmacológica del extracto optimizado se llevó a cabo una prueba de tolerancia a la glucosa en ratones Swiss ICR normoglicémicos. Las curvas de glicemia obtenidas (figura 7) permitieron evidenciar que, 30 minutos después de la administración oral de la solución de glucosa (2000 mg/kg), los animales tratados con los extractos de *P. ligularis* mostraron NGS inferiores a los determinados en animales que no recibieron ningún tratamiento (grupo vehículo), mientras que en los minutos 60 y 120 postsobrecarga, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En el último punto de muestreo, los NGS de los animales tratados con extracto acuoso y el extracto optimizado retornaron a sus valores basales. Este comportamiento indica que los extractos evaluados son antihiperlipglicemiantes y no hipoglicemiantes, ya que animales tratados con fármacos o principios

activos pertenecientes a este último grupo (como la glibenclamida) alcanzan NGS por debajo de los valores iniciales anteriores a la sobrecarga una vez finalizado el bioensayo⁵⁰.

No obstante, aunque en la prueba de sobrecarga oral de glucosa solo se puede determinar un efecto agudo de los tratamientos mediante la inducción momentánea de hiperglicemia, no se descarta que los extractos de *P. ligularis* pueda ser considerados también como hipoglicemiantes, ya que se conoce que algunos tratamientos a base de preparaciones herbales se comportan de esta manera cuando son administrados en ensayos crónicos⁵¹.

Por otra parte, el análisis de área bajo la curva determinó que el efecto antihiperglicémico es mayor en el extracto optimizado, ya que este disminuye los NGS un 25,0 % frente al grupo vehículo, mientras que el extracto acuoso obtenido por infusión solo la reduce en un 20,8 %. Esto puede ser atribuido principalmente al contenido de flavonoides totales de cada uno de los tratamientos. Como se mencionó anteriormente, el extracto optimizado presenta una concentración mayor de estos compuestos, de los cuales se ha reportado ampliamente su impacto en el tratamiento de afecciones relacionadas con la diabetes, incluyendo el control de la hiperglicemia⁵²⁻⁵⁴.

Al contrastar los resultados obtenidos con los reportados en la literatura para otras especies del género *Passiflora*, se encuentra que extractos de hojas de *P. incarnata* y *P. suberosa* también muestran un efecto antihiperglicémico en ratones normoglicémicos expuestos a sobrecargas de glucosa y sacarosa, respectivamente⁵⁵⁻⁵⁶. Con respecto a *P. ligularis*, diferentes dosis del extracto acuoso de los frutos (200, 400 y 600 mg/kg) logran disminuir los niveles de glicemia en ratas diabéticas sometidas a una prueba de tolerancia a la glucosa⁵⁷.

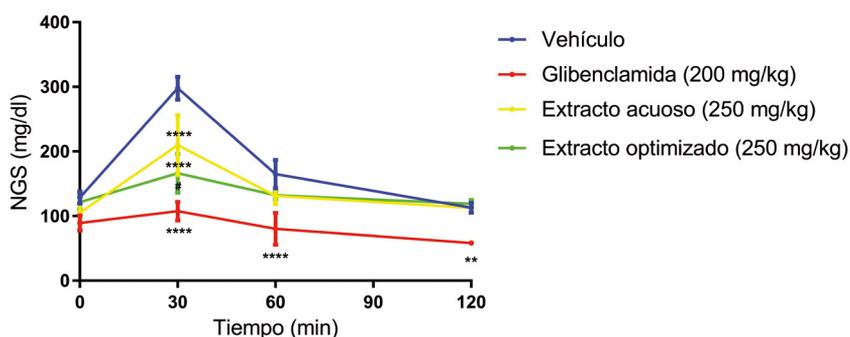


Figura 7. Efecto antihiperglicémico del extracto optimizado de hojas de *P. ligularis*.

Nota: NGS: niveles de glucosa en sangre. Los resultados se muestran como el valor promedio \pm desviación estándar ($n = 6$). ANOVA de dos vías, seguido de una prueba Tukey con un valor de $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y **** $p < 0,0001$ con respecto al grupo vehículo; # $p < 0,05$ respecto al extracto acuoso.

Finalmente, los resultados obtenidos mediante este modelo *in vivo* permiten corroborar que la magnitud de la actividad hipoglicemiante está asociada a la cantidad de los principios bioactivos presentes en el extracto de hojas de *P. ligularis*. Por ende, el extracto optimizado es un mejor candidato para el desarrollo de productos fitoterapéuticos indicados para el control de la hiperglicemia.

Estabilidad bajo condiciones de estrés del extracto optimizado

De acuerdo con las especificaciones de la guía Stability testing of new drug substances and products de la ICH (Q1A-R2)⁵⁸, las pruebas de estabilidad bajo condiciones de estrés tienen como objetivo identificar productos de degradación de ingredientes farmacéuticos activos y posibles rutas involucradas en dicho proceso. A nivel general, la guía se centra en establecer las condiciones requeridas para la evaluación de la estabilidad acelerada, intermedia y a largo plazo; sin embargo, no se establecen parámetros experimentales para la realización de pruebas de degradación forzada (pH, temperatura, oxidación, fotólisis e hidrólisis). Por este motivo, Singh y Bakshi plantean el documento Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs, en el que se proponen mapas de decisión para la evaluación de la degradación de un determinado fármaco bajo condiciones de hidrólisis neutra, ácida y alcalina, oxidación y fotólisis, así como un sistema de clasificación¹⁷.

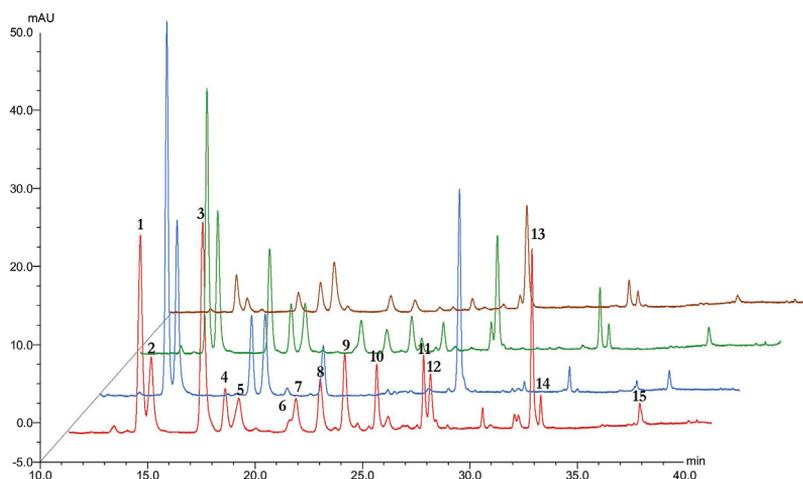


Figura 8. Variaciones del perfil cromatográfico del extracto optimizado de *P. ligularis* con respecto a condiciones de degradación forzada por hidrólisis.

Nota: rojo: extracto optimizado por EAU; azul: hidrólisis neutra; verde: hidrólisis ácida; café: hidrólisis alcalina.

Aunque la guía de Singh y Bakshi está diseñada para fármacos o compuestos puros, se adaptó para la evaluación de la estabilidad del extracto optimizado de hojas de *P. ligularis*. La determinación de la clasificación de estabilidad inherente para cada una de las condiciones se basó en la degradación significativa del contenido de flavonoides totales. Adicionalmente, se analizaron cambios en el perfil cromatográfico y cambios significativos en las cantidades relativas de algunos flavonoides de interés (figura 8).

Estabilidad bajo condiciones de hidrólisis neutra

De acuerdo con las especificaciones metodológicas mostradas en la tabla 4, la primera condición a la que fue sometido el extracto optimizado fue 12 horas en reflujo. La cuantificación de flavonoides totales, una vez finalizado el ensayo, mostró una disminución del 31,14 % con respecto al valor inicial. Este porcentaje es considerado como una degradación significativa (20-80 %); por ende, se clasifica el extracto como *labil* bajo condiciones de hidrólisis neutra.

Al comparar el perfil cromatográfico del extracto antes y después de ser sometido a condiciones de reflujo se encontraron 5 cambios relevantes (figura 8). Primero, se evidencia la disminución total de la señal cromatográfica 3 y el incremento en la intensidad de la señal 1, lo que indica la transformación del flavonoide quercetin-3-O-(6''-malonil)-glucósido en quercetin-3-O-glucósido. Segundo, el aumento de la señal 2 correspondiente a luteolin-7-O-glucósido debido a la degradación total del flavonoide luteolin-7-O-(6''-malonil)-glucósido (compuesto 9, tabla 6). Tercero, la desaparición de la señal 8 debido a la degradación total de kaempferol-3-O-(6''-malonil)-glucósido en kaempferol-3-O-glucósido (4). Cuarto, el incremento de la señal 7 correspondiente a isoramnetin-3-O-glucósido a causa de la degradación total de isoramnetin-3-O-(6''-malonil)-glucósido (10). Por último, la transformación completa de crisin-7-O-(6''-O-acetil)-glucósido (13) en crisin-7-O-glucósido (12).

De acuerdo con los resultados, los flavonoides glicosilados con sustitución en el azúcar sufren una hidrólisis total del enlace éster de la posición 6'' de la unidad glucosa bajo condiciones de reflujo por un tiempo prolongado. A manera de ejemplo, en la figura 9 se establece el posible mecanismo de degradación para los flavonoides O-glicosilados en la posición 3; sin embargo, es extrapolable para el comportamiento de los compuestos luteolin-7-O-(6''-malonil)-glucósido y crisin-7-O-(6''-O-acetil)-glucósido.

Finalmente, la degradación total de los flavonoides 9, 10 y 11 puede atribuirse a un efecto de la temperatura elevada a la cual fue sometido el extracto, ya que bajo condiciones de estrés por hidrólisis ácida y alcalina (figura 8) la intensidad de estas señales se ve disminuida parcialmente y no totalmente.

Estabilidad bajo condiciones de hidrólisis ácida

El extracto optimizado sometido durante 8 horas a reflujo en HCl (0,1 N) tuvo un porcentaje de degradación del CFT cercano al 90 %. Por tal motivo, se evaluó la estabilidad a condiciones más leves: HCl (0,01 N), por 8 horas y una temperatura de 40 °C. Aunque no se alcanzó una degradación significativa de los compuestos fenólicos bajo estas condiciones, se evidenciaron cambios relevantes en el perfil cromatográfico (figura 8). Específicamente, se presentaron las mismas 5 variaciones observadas en la hidrólisis neutra, es decir, se observó una disminución en las señales de los flavonoides quercetin-3-*O*-(6''-malonil)-glucósido (3), kaempferol-3-*O*-(6''-malonil)-glucósido (8), luteolin-7-*O*-(6''-malonil)-glucósido (9), isoramnetin-3-*O*-(6''-malonil)-glucósido (10) y crisin-7-*O*-(6''-*O*-acetil)-glucósido (13), pero a diferencia de la hidrólisis neutra, la degradación de estos flavonoides no fue total (figura 9). Con base en este comportamiento, se decide clasificar el extracto optimizado como *muuy lábil* bajo condiciones de hidrólisis ácida.

Estudios de estabilidad realizados en isoflavonas malonil-glucósidos de *Radix hedysari* han mostrado que estos compuestos se degradan hasta isoflavonas glicosiladas, es decir que al igual que los flavonoides *O*-glicosilados de *P. ligularis*, el proceso de degradación de los compuestos no involucra la ruptura del enlace hemiacetal (enlaces glucosídicos 3-*O*-C y 7-*O*-C) para dar origen a las respectivas agliconas⁵⁹⁻⁶⁰.

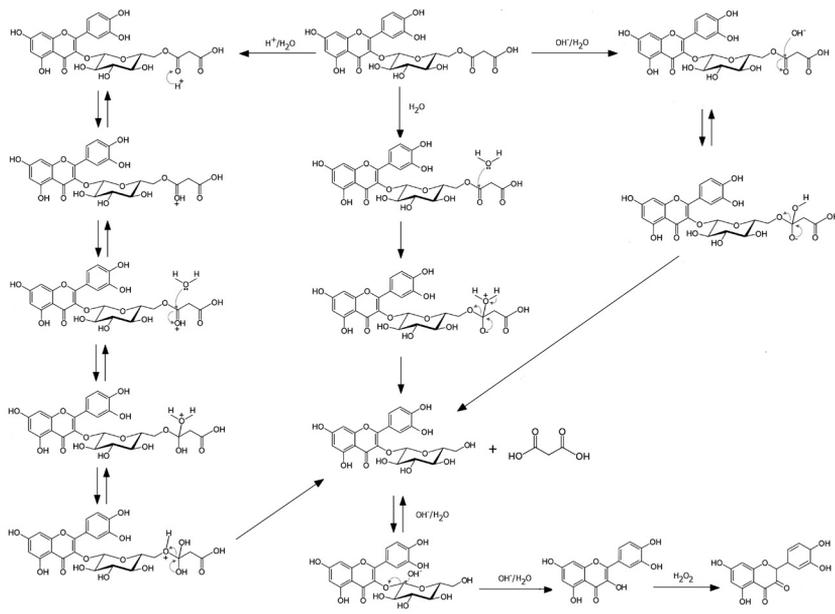


Figura 9. Mecanismo de degradación propuesto para el flavonoide quercetin-3-*O*-glicósido sometido a condiciones de estrés por hidrólisis neutra (H₂O), hidrólisis ácida (H⁺/H₂O) e hidrólisis alcalina (OH⁻/H₂O).

Estabilidad bajo condiciones de hidrólisis alcalina

El extracto optimizado alcanzó una disminución en el CFT del 65,67 % después de ser tratado con NaOH al 0,01 N durante 8 horas y temperatura de 40 °C. Este porcentaje de degradación, al ser significativo, permite clasificar el extracto como *muy lábil* bajo condiciones de estrés por hidrólisis alcalina.

Al igual que en la hidrólisis neutra y ácida, se evidencia una disminución en las señales de quercetin-3-O-(6'''-malonil)-glucósido (3), kaempferol-3-O-(6''-malonil)-glucósido (8), luteolin-7-O-(6''-malonil)-glucósido (9), isoramnetin-3-O-(6''-malonil)-glucósido (10) y crisin-7-O-(6''-O-acetil)-glucósido (13) debido a la hidrólisis de los sustituyentes malonil o acetil de la unidad de azúcar, reacción que a su vez lleva a la formación de los flavonoides O-glicosilados.

No obstante, una vez se forman estos compuestos, bajo condiciones de pH básico, se da un ataque nucleofílico del ion hidroxilo al carbono del enlace hemiacetal, lo cual causa la ruptura del enlace O-C entre el flavonoide y el monosacárido (figura 9). Por ende, hay una disminución en la intensidad de las señales de quercetin-3-O-glucósido (1), luteolin-7-O-glucósido (2), kaempferol-3-O-glucósido (4) e isoramnetin-3-O-glucósido (7), siendo menor la degradación de estos dos últimos flavonoides. Adicionalmente, no se evidencia una degradación aparente del compuesto crisina-7-O-glicósido (12) ni la aparición de nuevas señales cromatográficas que sugieran la presencia de las agliconas (figura 8).

La ausencia de señales cromatográficas correspondientes a las agliconas quercetina, luteolina, isoramnetina y kaempferol se puede deber principalmente a la inestabilidad de estos compuestos bajo condiciones de pH alto, ya que los grupos OH del núcleo estructural de los flavonoides se encuentran ionizados, haciéndolos más susceptibles a degradación por oxidación⁶¹⁻⁶².

Por último, los resultados obtenidos para los flavonoides del extracto optimizado de *P. ligularis* fueron similares a los reportados para flavonol-glicósidos y algunas agliconas (quercetina, isoramnetina y kaempferol) extraídos de *Ginkgo biloba*. Estos flavonoides, luego de ser evaluados en diferentes condiciones de degradación forzada, mostraron que las agliconas presentan mayores porcentajes de degradación en medios alcalinos, siendo la quercetina más inestable que la isoramnetina y el kaempferol⁶³.

Estabilidad bajo condiciones de estrés de oxidación con H₂O₂

Una vez evaluadas las condiciones 4, 3, 2, 1 presentadas en la tabla 4 para determinar la estabilidad de los flavonoides bajo condiciones de estrés por oxidación con H₂O₂, no se alcanzó un porcentaje de degradación significativa del CFT. Al analizar el perfil cromatográfico después de someter el extracto a la condición más drástica (H₂O₂ al 30 % por 24 horas y temperatura ambiente),

se encontró que este era similar al perfil obtenido bajo condiciones de hidrólisis neutra, es decir, que se presentaron incrementos en las señales correspondientes a los flavonoides monoglucosilados (1, 2, 4, 7 y 12) y degradación casi total de las señales 3, 8, 9, 10 y 13 debido a la hidrólisis de los sustituyentes malonil o acetil de la glucosa unida al núcleo flavonoide (figura 10).

La estabilidad de los flavonoides *O*-monoglucosilados frente a la oxidación por H_2O_2 puede explicarse desde las características propias de las estructuras de estos compuestos. Los flavonoides deben su gran poder antioxidante a la capacidad que tienen de ceder con gran facilidad átomos de H (generalmente del anillo A y B) para estabilizar especies reactivas de oxígeno (ERO), convirtiéndose de esta manera el flavonoide en un radical libre más estable debido a la deslocalización del electrón dentro de los anillos aromáticos y llevando finalmente a su oxidación (figura 9). Así mismo, la localización de los grupos OH en la estructura del flavonoide afecta la capacidad para ceder dichos protones, por ejemplo, la presencia de diferentes grupos hidroxilo ubicados en las posiciones 3'-, 4'- y 5'- (anillo B) o 3- y 5- (en los anillos A y C, respectivamente) mejora la capacidad antioxidante del flavonoide y por ende su estabilidad⁶⁴.

Sin embargo, es importante resaltar que la unión de azúcares al núcleo flavonoide en estas posiciones limita la capacidad de ceder protones al medio para la estabilización de ERO⁶⁵. Por ende, flavonoides glicosilados como quercetin-3-*O*-glucósido (1), luteolin-7-*O*-glucósido (2), kaempferol-3-*O*-glucósido (4), isoramnetin-3-*O*-glucósido (7) y crisina-7-*O*-glucósido (12) son menos susceptibles a degradación por presencia de agentes oxidantes como el H_2O_2 .

Finalmente, con base en los resultados se concluye que el extracto optimizado de hojas de *P. ligularis* es *prácticamente estable* bajo condiciones de estrés por oxidación.

Fotoestabilidad

Una vez sometido el extracto optimizado de *P. ligularis* a las condiciones más drásticas propuestas por Singh y Bakshi, los flavonoides no sufrieron una degradación significativa ni se evidenciaron cambios en el perfil cromatográfico que sugirieran la degradación de estos compuestos (figura 10). Por ende, se clasifica el extracto optimizado como *fotoestable*.

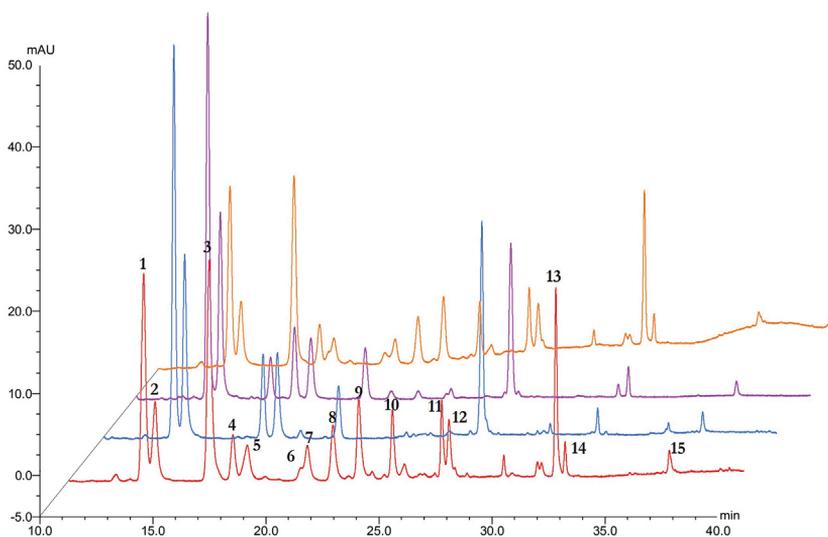


Figura 10. Variaciones en el perfil cromatográfico del extracto optimizado de *P. ligularis* con respecto a condiciones de degradación forzada por hidrólisis.

Nota: rojo: extracto optimizado por EAU; azul: hidrólisis neutra; morado: degradación por H₂O₂; naranja: fotoestabilidad.

Conclusiones

El uso de la metodología de superficie de respuesta permitió establecer las condiciones experimentales requeridas para extraer el mayor contenido de flavonoides totales de las hojas de *P. ligularis* mediante el método de extracción asistida por ultrasonido. Dichas condiciones correspondieron a: solvente de extracción: etanol al 63 %, tiempo de extracción: 33 minutos, temperatura: 70 °C y relación droga-solvente: 1:20. Como resultado, el extracto optimizado presentó CFT de 59,76 mg eq. de isoquercetina/g de extracto seco, valor que al ser comparado con el CFT del extracto acuoso obtenido por infusión es superior en un 33 %.

Como parte de la evaluación de la actividad, los ensayos de capacidad antiglicante y de toleración a la glucosa mostraron que el extracto optimizado, con respecto al CFT, tiene mejores resultados que el extracto acuoso frente a la inhibición de productos de glicación no enzimática de proteínas y disminución de los niveles de glucosa en sangre en ratones Swiss ICR expuestos a una sobrecarga oral de glucosa.

Finalmente, se estableció, mediante la cuantificación del CFT y el análisis de los perfiles cromatográficos, que los flavonoides malonil/acetil-glicosilados del extracto optimizado sufren un proceso de degradación por hidrólisis del grupo malonilo o acetilo de la unidad de glucosa, lo cual hace que el extracto optimizado sea clasificado como lábil bajo condiciones de hidrólisis neutra y muy lábil cuando es sometido a condiciones de hidrólisis ácida e hidrólisis alcalina. Por el contrario, se clasificó como estable bajo condiciones de estrés por presencia de un agente oxidante como el H₂O₂ y fotoestable.

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2018. Annex 1: Guidelines on Good Herbal Processing Practices for Herbal Medicines; pp. 81-152.
2. Sahoo N, Manchikanti P, Dey S. Herbal drugs: Standards and regulation. *Fitoterapia*. 2010; 81(6): 462-71.
3. Organización Mundial de la Salud. Guidelines for the assessment of herbal medicines. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 1996.
4. Organización Mundial de la Salud. Quality assurance of pharmaceuticals: A compendium of guidelines and related materials. Vol. 2. Good manufacturing practices and inspection. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 1996.
5. Sharapin N. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Bogotá: Convenio Andrés Bello; 2000.
6. Soares L, Farias M. Qualidade de insumos farmacêuticos ativos de origem natural. En: Simões CM *et al.* Farmacognosia: Do producto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed; 2017. pp 83-128.
7. Agencia Europea de Medicamentos. Points to consider on the biopharmaceutical characterisation of herbal medicinal products; 2003.
8. Monzón-Daza G, Meneses-Macías C, Forero AM, Rodríguez J, Aragón-Novoa M, Jiménez C *et al.* Identification of α -amylase and α -glucosidase inhibitors and ligularoside A, a new triterpenoid saponin from *Passiflora ligularis* Juss. (Sweet Granadilla) leaves, by a nuclear magnetic resonance-based metabolomic study. *J Agric Food Chem*. 2021; 69(9), 2919-31.
9. Rey D, Fernandes TA, Sulis PM, Gonçalves R, Sepúlveda M, Frederico MJ *et al.* Cellular target of isoquercetin from *Passiflora ligularis* Juss. for glucose uptake in rat soleus muscle. *Chem Biol Interact*. 2020; 330: 109198.
10. Rey D, Sulis P, Fernandes T, Gonçalves R, Frederico MJ, Costa GM. Astragalín augments basal calcium influx and insulin secretion in rat pancreatic islets. *Cell Calcium*. 2019; 80: 56-62.

11. Organización Mundial de la Salud. Quality control methods for herbal materials. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2011.
12. Safdar MN, Kausar T, Nadeem M. Comparison of ultrasound and maceration techniques for the extraction of polyphenols from the Mango peel. *J Food Process Preserv.* 2017; 41(4).
13. Wang X, Wu Q, Wu Y, Chen G, Yue W, Liang Q. Response surface optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Sparganii rhizoma* and evaluation of their *in vitro* antioxidant activities. *Molecules.* 2012; 17(4): 6769-83.
14. Pingret D, Fabiano-Tixier AS, Farid C. Ultrasound-Assisted Extraction. En: Rostagno M, Prado J, editores. *Natural product extraction: principles and applications.* Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2013; pp. 89-112.
15. Derbré S, Gatto J, Pelleray A, Coulon L, Séraphin D, Richomme P. Automating a 96-well microtiter plate assay for identification of AGEs inhibitors or inducers: Application to the screening of a small natural compounds library. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 398(4): 1747-58.
16. Sato N, Li W, Tsubaki M, Higai K, Takemoto M, Sasaki T *et al.* Flavonoid Glycosides from Japanese Camellia Oil Cakes and Their Inhibitory Activity against Advanced Glycation End-Products Formation. *J. Funct. Foods* 2017, 35, 159-165.
17. Singh S, Bakshi M. Guidance on Conduct of Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs. *Pharm Technol* 2000, 1-14.
18. Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS, Abert-Vian M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason Sonochem.* 2017; 34: 540-60.
19. Toma M, Vinatoru M, Mason TJ. Ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from plants and their constituents. En: Mason TJ, editor. *Advances in Sonochemistry.* Londres: JAI Press; 1999. Vol. 5, pp. 209-47.
20. Mason TJ, Riera E, Vercet A, Lopez-Buesa P. Application of ultrasound. En: Sun DW, editor. *Emerging technologies for food processing: An overview.* Londres: Elsevier; 2005. pp. 323-51.
21. Lavilla I, Bendicho C. Fundamentals of ultrasound-assisted extraction. En: Domínguez H, González M, editoras. *Water extraction of bioactive compounds: From plants to drug development.* Elsevier; 2017. pp. 291-316.
22. Yahya N, Attan N, Wahab R. An overview of cosmeceutically relevant plant extracts and strategies for extraction of plant-based bioactive compounds. *Food Bioprod Process.* 2018; 112: 69-85.
23. Gil-Chávez G, Villa JA, Ayala-Zavala JF, Basilio-Heredia J, Sepulveda D, Yahia EM *et al.* Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: An overview. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2013; 12 (1): 5-23.

24. Ajila CM, Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Godbout S, Valéro JR. extraction and analysis of polyphenols: Recent Trends. *Crit Rev Biotechnol*. 2011; 31(3): 227-49.
25. Lee MH, Lin CC. Comparison of techniques for extraction of isoflavones from the root of *Radix Puerariae*. Ultrasonic and pressurized solvent extractions. *Food Chem*. 2007; 105(1): 223-8.
26. Ong ES. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2004; 812: 23-33.
27. Vinatoru M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason Sonochem*. 2001; 8(3): 303-13.
28. Pereira MG, Hamerski F, Andrade EF, Scheer Ade P, Corazza ML. Assessment of subcritical propane, ultrasound-assisted and soxhlet extraction of oil from Sweet Passion Fruit (*Passiflora alata* Curtis) seeds. *J Supercrit Fluids*. 2017; 128: 338-48.
29. Tomaz I, Maslov L, Stupic D, Preiner D, Ašperger D, Karoglan Kotic J. Multi-response optimisation of ultrasound-assisted extraction for recovery of flavonoids from red grape skins using response surface methodology. *Phytochem Anal*. 2016; 27(1): 13-22.
30. Paini M, Casazza AA, Aliakbarian B, Perego P, Binello A, Cravotto G. Influence of ethanol/water ratio in ultrasound and high-pressure/high-temperature phenolic compound extraction from agri-food waste. *Int J Food Sci Technol*. 2016; 51(2): 349-58.
31. Huang W, Xue A, Niu H, Jia Z, Wang J. Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from folium eucommiae and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro. *Food Chem*. 2009; 114(3): 1147-54.
32. Md Yusof AH, Abd Gani SS, Zaidan UH, Halmi MIE, Zainudin BH. Optimization of an ultrasound-assisted extraction condition for flavonoid compounds from Cocoa shells (*Theobroma cacao*) using response surface methodology. *Molecules*. 2019; 24(4): 1-16.
33. Lapornik B, Prosek M, Golc A. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J Food Eng*. 2005; 71: 214-22.
34. Yolmeh M, Jafari SM. Applications of response surface methodology in the food industry processes. *Food Bioprocess Technol*. 2017; 10(3): 413-33.
35. Hemwimol S, Pavasant P, Shotipruk A. Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Ultrason Sonochem*. 2006; 13(6): 543-8.
36. Andersen OM, Markham KR. *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications*. Boca Raton: CRC Press, 2005.

37. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014; 37 (Supplement 1): S81-S90.
38. Díaz-Casasola L, Luna-Pichardo D. Productos finales de glicación avanzada en la enfermedad cardiovascular como complicación de la diabetes. *Med e Investig*. 2016; 4(1): 52-7.
39. Ahmed N. Advanced Glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005; 67(1): 3-21.
40. Kumar Pasupulati A, Chitra PS, Reddy GB. Advanced glycation end products mediated cellular and molecular events in the pathology of diabetic nephropathy. *Biomol Concepts* 2016; 7(5-6): 293-309.
41. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2014; 18(1): 1-14.
42. Ruggiero-Lopez D, Lecomte M, Moinet G, Patereau G, Lagarde M, Wiersperger N. Reaction of metformin with dicarbonyl compounds. Possible implication in the inhibition of advanced glycation end product formation. *Biochem Pharmacol*. 1999; 58(11): 1765-73.
43. Yeh WJ, Hsia SM, Lee WH, Wu CH. Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings. *J Food Drug Anal*. 2017; 25(1): 84-92.
44. Chinchansure AA, Korwar AM, Kulkarni MJ, Joshi SP. recent development of plant products with anti-glycation activity: A review. *R Soc Chem*. 2015; 5: 31113-38.
45. Séro L, Sanguinet L, Blanchard P, Dang BT, Morel S, Richomme P *et al*. Tuning a 96-well microtiter plate fluorescence-based assay to identify AGE inhibitors in crude plant extracts. *Molecules*. 2013; 18: 14320-39.
46. Rudnicki M, de Oliveira MR, Veiga Pereira T da, Reginatto FH, Dal-Pizzol F, Fonseca Moreira JC. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. *Food Chem*. 2007; 100(2): 719-24.
47. Da Silva Morrone M, De Assis AM, Da Rocha RF, Gasparotto J, Gazola AC, Costa GM *et al*. *Passiflora manicata* (Juss.) aqueous leaf extract protects against reactive oxygen species and protein glycation in vitro and ex vivo models. *Food Chem Toxicol*. 2013; 60: 45-51.
48. Sadowska-Bartosz I, Galiniak S, Bartosz G. Kinetics of glycoxidation of bovine serum albumin by glucose, fructose and ribose and its prevention by food components. *Molecules*. 2014; 19(11): 18828-49.
49. Matsuda H, Wang T, Managi H, Yoshikawa M. Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. *Bioorganic Med Chem*. 2003; 11(24): 5317-23.
50. Ospina LF, Olarte J, Calle J, Pinzón R. Comprobacion de la actividad hipoglicemiente y captadora de radicales libres oxigenados de los principios activos de *Curatella americana* L. *Rev Colomb Cienc Quím Farm*. 1995; 24(1): 6-11.

51. Alarcón-Aguilara FJ, Román-Ramos R, Pérez-Gutiérrez S, Aguilar-Contreras A, Contreras-Weber CC, Flores-Sáenz JL. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *J Ethnopharmacol.* 1998; 61(2): 101-10.
52. Cazarolli LH, Zanatta L, Alberton EH, Figueiredo MS, Folador P, Damazio RG *et al.* Flavonoids: Cellular and Molecular mechanism of action in glucose homeostasis. *Mini Rev Med Chem.* 2008; 8(10): 1032-8.
53. Nicolle E, Souard F, Faure P, Boumendjel A. Flavonoids as promising lead compounds in type 2 diabetes mellitus: Molecules of interest and structure-activity relationship. *Curr Med Chem.* 2011; 18(17): 2661-72.
54. Ballard CR, Roberto M, Junior M. Health benefits of flavonoids. En: Segura-Campos M, editora. *Bioactive compounds.* Cambridge: Woodhead Publishing; 2018. pp. 185-201.
55. Gupta RK, Kumar D, Chaudhary AK, Maithani M, Singh R. Antidiabetic activity of *Passiflora incarnata* Linn. in streptozotocin-induced diabetes in mice. *J Ethnopharmacol.* 2012; 139(3): 801-6.
56. Sudasinghe HP, Peiris DC. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of aqueous leaf extract of *Passiflora suberosa* L. *Peer J.* 2018; 6(2): e4389.
57. Anusooriya P, Malarvizhi D, Gopalakrishnan VK, Devaki K. Antioxidant and antidiabetic effect of aqueous fruit extract of *Passiflora ligularis* Juss. on streptozotocin induced diabetic rats. *Int Sch Res Not.* 2014; 2014: 1-10.
58. ICH. International Conference on Harmonization. Stability testing of new drug substances and products. 2003. pp 1-20.
59. Cuyckens F, Claeys M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J Mass Spectrom.* 2004; 39(1): 1-15.
60. Liu Y, Chen HB, Zhao YY, Wang B, Zhang QY, Zhang L *et al.* Quantification and stability studies on the flavonoids of *Radix hedysari*. *J Agric Food Chem.* 2006; 54(18): 6634-9.
61. Graham N, Jiang CC, Li XZ, Jiang JQ, Ma J. The influence of pH on the degradation of phenol and chlorophenols by potassium ferrate. *Chemosphere.* 2004; 56(10): 949-56.
62. Peng S, Zou L, Zhou W, Liu W, Liu C, McClements D. J. Encapsulation of lipophilic polyphenols into nanoliposomes using pH-driven method: Advantages and disadvantages. *J Agric Food Chem.* 2019; 67(26): 7506-11.
63. Jin Y, Zhang W, Meng Q, Li D, Garg S, Teng L *et al.* forced degradation of flavonol glycosides extracted from *Ginkgo biloba*. *Chem Res Chinese Univ.* 2013; 29(4): 667-70.
64. Plaza M, Pozzo T, Liu J, Gulshan KZ, Turner C, Karlsson EN. substituent effects on in vitro antioxidizing properties, stability, and solubility in flavonoids. *J Agric Food Chem.* 2014; 62: 3321-33.

Autores

Diana Marcela Aragón Novoa

Química farmacéutica y doctora en Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Colombia, con tesis distinguida con mención meritoria. Tiene experiencia en investigación en el diseño de nuevas formas farmacéuticas, la estandarización de extractos vegetales y el estudio de propiedades biofarmacéuticas y farmacocinéticas de diferentes ingredientes activos; áreas en las cuales ha dirigido más de 15 tesis de maestría y doctorado, y publicado más de 35 artículos científicos. Fue merecedora de la distinción por investigación meritoria de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, y es investigadora sénior, de acuerdo con el sistema de clasificación de Minciencias. Actualmente es profesora titular del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, en donde también se desempeñó como directora del área curricular de Farmacia y como vicedecana académica de la Facultad de Ciencias. Ha sido investigadora de proyectos financiados por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Minciencias y la Universidad Nacional de Colombia, algunos de ellos con cooperación internacional. Fue profesora visitante en la Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Brasil) y la Universidad de Innsbruck (Austria), es miembro coordinador de la Red Iberoamericana de Farmacometría, y *topic editor* y *guest editor* de la revista *Pharmaceutics*

María Isabel Cardona Paredes

Química farmacéutica de la Universidad de Antioquia. En 2015 finalizó su maestría en Ciencias Farmacéuticas en la Universidad Nacional de Colombia, en la que recibió la distinción meritoria por su trabajo en la estandarización de un extracto de cálices de *Physalis peruviana*. Actualmente es candidata al Doctorado en Ciencias Farmacéuticas de la misma institución. Su tesis sobre el desarrollo de sistemas mucopenetrantes (sistema autoemulsificable y micropartículas) cargados con un extracto estandarizado de cálices de *Physalis peruviana* se lleva a cabo con el Grupo de Investigación en Tecnología de Productos Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, en colaboración con el Centro de Química y Biomedicina de la Universidad de Innsbruck, Austria. También, es becaria del Minciencias, ha participado en varios proyectos de investigación relacionados con tecnología de productos naturales, y ha sido coautora de publicaciones en esta misma área.

Leonardo Castellanos Hernández

Químico con maestría y doctorado en Ciencias – Química, enfocado en productos naturales de la Universidad Nacional de Colombia, y experiencia posdoctoral en metabolómica en Leiden University (Holanda). Ante Minciencias está clasificado como investigador sénior, y es profesor de la Universidad Nacional de Colombia desde el 2000. Fue ganador del premio al Mejor Grupo de Investigación de Educación Superior 2009, otorgado por Colciencias y el Ministerio de Educación; recibió el premio Academia de Ciencias para el Mundo en Desarrollo (TWAS) para científicos jóvenes colombianos en 2011, y ha sido coordinador de investigación del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia. Actualmente lidera al grupo Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y frutas de Colombia, clasificado A1 en Colciencias. Tiene interés y experiencia en el estudio de productos naturales marinos y vegetales, y en biotecnología para la producción de compuestos bioactivos. En su desarrollo profesional ha liderado proyectos que buscan la separación e identificación de productos naturales bioactivos, otorgándole valor agregado a la biodiversidad. Adicionalmente, posee experiencia en síntesis orgánica, metabolómica y biotecnología.

Sandra Milena Echeverry González

Licenciada en Química de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas y magister en Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Colombia, en la que obtuvo distinción meritoria por su tesis. Actualmente es becaria de Minciencias y candidata a doctora en Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Colombia, donde se encuentra vinculada a los grupos de investigación de Sistemas para Liberación Controlada de Moléculas Biológicamente

Activas (Silicomoba) y Principios Bioactivos en Plantas Medicinales, del Departamento de Farmacia. Su trabajo se ha enfocado principalmente en el área de investigación de productos naturales, específicamente en extractos vegetales estandarizados obtenidos a partir de subproductos de cosecha y con potencial uso para el tratamiento de la diabetes mellitus. Asimismo, ha trabajado en proyectos de investigación en temas relacionados con el desarrollo de sistemas de entrega como estrategia para mejorar la biodisponibilidad de los principios bioactivos presentes en estos extractos, responsables del control de la glicemia en sangre y otras complicaciones asociadas a la diabetes. Es coautora de varias publicaciones en las áreas descritas.

Laura Gómez Devia

Bióloga de la Pontificia Universidad Javeriana. Su trabajo de grado “Análisis de flavonoides en extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* por electroforesis capilar” estuvo enfocado en la contribución del estudio de la composición química de los flavonoides de *Passiflora ligularis*. Actualmente cursa la Maestría en Biodiversity and Collection Management, en la Technische Universität Dresden (Alemania). Espera poder seguir creciendo en su carrera como bióloga con un enfoque en botánica.

Fátima Regina Mena Barreto Silva

Química de la Universidade Católica de Pelotas (UCPel, Brasil), magíster y doctora en Bioquímica de la Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, Brasil), con posdoctorado de la L'université de Caen Normandie (UNICAEN, Francia). Actualmente es profesora titular de la Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Brasil), y ha dirigido más 65 trabajos de pregrado, 24 de maestría, 12 de doctorado y 12 de posdoctorado. Tiene un índice H de 29 y 2290 citaciones, habiendo publicado más de 120 artículos científicos internacionales y cuatro capítulos de libro. Ha sido coordinadora de cooperaciones internacionales con UNICAEN (desde 2007), Universidad de Guelph, Canadá (2014-2019), Universidad Sorbona (2011-2012), Universidad de California, Riverside (2000-2010), Universidad Nacional de Colombia (desde 2017), y Universidad De Montfort, Leicester, Reino Unido (desde 2017). Fue becaria de la Agencia Internacional de Cooperación Japonesa (1998), científica visitante en la Universidad de California, Riverside (200-2002) y profesora invitada en UNICAEN (desde 2018). Actualmente es miembro del Comité Científico Internacional de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), editora asociada de la revista *Frontiers in Physiology* (desde 2020), editora invitada de la revista *Pharmaceutics* (desde 2021) y editora líder invitada de las revistas *Life Sciences*, *CTMC*, *Pharmacologia*, *Frontiers in Endocrinology*, *BioMed Res. Int.*, *CDT*, *SciRes Lit. Nutrition & Food Sci*. Sus áreas de investigación están relacionadas

con farmacognosia y química medicinal, y en bioquímica enfocada principalmente al efecto y el mecanismo de acción de hormonas, compuestos naturales o sintéticos sobre la diabetes y la reproducción masculina. Ha liderado el grupo de investigación de endocrinología (CNPq, Brasil) desde 1997.

Carolina Meneses Macías

Licenciada en química de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas, magíster en Ciencias - Química de la Universidad Nacional de Colombia y estudiante de Doctorado en Ciencias de la Educación de la Universidad Nacional de Rosario (Argentina). Tiene experiencia en investigación en química de productos naturales en octocorales del género *Eunicea* sp. y *Passiflora ligularis* en el grupo Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia de la Universidad Nacional de Colombia, así como en ciencias forestales (química y física de suelos), ciencias ambientales (análisis químicos de calidad del agua) y en el laboratorio de suelos y calidad del agua de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas, con publicaciones y presentaciones en congresos científicos en estas áreas. Se desempeña como docente de cátedra de ciencias naturales en la Pontificia Universidad Javeriana y la Universidad Militar, y de ciencias naturales de la Secretaría de Educación del Distrito, espacios en los que ha fortalecido actitudes investigativas en química y en educación con la implementación de instrumentos que le han permitido mejorar el proceso de interacción en el aula.

Geison Modesti Costa

Farmacéutico de la Universidade de Passo Fundo, Brasil; magíster y doctor en Farmacia de la Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, con estudios posdoctorales en la Universidad Nacional de Colombia. Actualmente es profesor asociado del Departamento de Química de la Pontificia Universidad Javeriana. Integra el Grupo de Investigación Fitoquímica Universidad Javeriana (GIFUJ), en el que ha realizado diversas investigaciones en el área de fitoquímica, con especial énfasis en técnicas cromatográficas aplicadas a extractos de origen vegetal. Además, ha sido investigador principal en diversos proyectos de investigación, de financiación nacional e internacional, con destacada participación como investigador principal en el Programa Colombia Científica (GAT), financiado por el Banco Mundial. Tiene colaboraciones activas con más de 10 grupos de investigación, tanto nacionales como internacionales. Ha sido director de 27 trabajos de grado y tesis, entre pregrado, maestría y doctorado, y ha publicado más de 25 artículos científicos en revistas indexadas de circulación internacional, especialmente sobre estudios fitoquímicos del género *Passiflora*.

Gabriel Monzón Daza

Químico farmacéutico y magíster en Ciencias - Química de la Universidad Nacional de Colombia, con tesis distinguida con mención meritoria. Apasionado por la química de plantas medicinales y su impacto en las comunidades a través de la etnofarmacología. En su pregrado hizo parte del grupo de investigación en farmacognosia y fitoquímica del Departamento de Farmacia, en el que investigó la actividad hipoglicemiante de extractos de una especie de cactácea tradicionalmente usada con este propósito. Al finalizar su pregrado obtuvo el segundo puesto en el examen final de ciencias del programa curricular de Farmacia. En 2016 inició sus estudios de maestría en el grupo de investigación Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia, estudiando el impacto de los cambios en el perfil metabólico de las hojas de *Passiflora ligularis* (Granadilla) sobre la actividad inhibitoria de sus extractos frente a enzimas de tipo glucosil-hidrolasas. Posee conocimientos en purificación y elucidación de compuestos, y en diversas técnicas analíticas y técnicas *in silico*, temas en los que tiene publicaciones y presentaciones en congresos.

Luis Fernando Ospina Giraldo

Químico farmacéutico (1990) y magíster en Ciencias - Farmacología (1995) de Universidad Nacional de Colombia, en la que obtuvo distinción meritoria en los trabajos de investigación realizados para la obtención ambos de títulos. Es doctor en Farmacia de Universidad de Valencia, España (2000), con tesis calificada como sobresaliente *cum laude*. En 1995, recibió el premio Enrique Núñez Olarte a la Investigación Farmacológica en Colombia. Actualmente es profesor titular de la Universidad Nacional de Colombia, con interés en la ética de la investigación, el desarrollo de modelos farmacológicos experimentales y la investigación en la farmacología de productos naturales, especialmente antiinflamatorios y antidiabéticos. En dichas áreas ha dirigido más de 20 tesis de maestría y doctorado, y publicado más de 30 artículos científicos. Es investigador sénior, de acuerdo con la clasificación de Minciencias, y líder del grupo de investigación Principios Bioactivos en Plantas Medicinales (Categoría A de Minciencias). A nivel académico-administrativo se ha desempeñado como coordinador del Bioterio de Farmacia, director del Departamento de Farmacia, vicedecano de Investigación y Extensión de la Facultad de Ciencias, y director de Bienestar de la misma Facultad.

Freddy Alejandro Ramos Rodríguez

Químico y magíster en Ciencias - Química de la Universidad Nacional de Colombia (2003), doctor en Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Tokushima (Japón, 2006). Se desempeña como profesor asociado del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia desde el 2008,

y como investigador del grupo Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia, del Departamento de Química de la misma institución. Ha publicado más de 60 artículos de investigación y dirigido estancias posdoctorales, junto con más de 30 tesis y trabajos de grado de doctorado, maestría y pregrado en diferentes programas de la Universidad Nacional. Obtuvo el Premio a la Docencia Excepcional 2019 de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional. Es investigador sénior de Colciencias y su investigación ha sido financiada por Colciencias, Minciencias, The International Foundation for Science (IFS) (Uppsala, Suecia) y la Universidad Nacional de Colombia. Es experto en el aislamiento, elucidación estructural, metabolómica y evaluación de la actividad biológica de compuestos de origen natural producidos por plantas, invertebrados y microorganismos marinos.

Diana Patricia Rey Padilla

Química farmacéutica y magíster en Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Colombia; becaria de Minciencias y candidata a doctora en Ciencias Farmacéuticas de la misma institución. Está vinculada al grupo de investigación Principios Bioactivos de Productos Naturales desde el 2011, cuando desarrolló su tesis de maestría evaluando el efecto *in vitro* de un extracto de frutos de *Physalis peruviana* sobre enzimas carbohidrasas intestinales. Actualmente desarrolla su tesis doctoral orientada al estudio *in vivo* e *in vitro* del efecto antidiabético de un extracto de hojas de *Passiflora ligularis*; al respecto ya cuenta con varias publicaciones internacionales y presentaciones en congresos científicos. Su área de interés es la actividad farmacológica de extractos y derivados naturales con acciones antidiabéticas o hipoglicemiantes especialmente.

Paula Michelle Sepúlveda Ramos

Química farmacéutica de la Universidad Nacional de Colombia y estudiante de la Maestría en Ciencias Farmacéuticas de la misma institución. Investigadora vinculada a los grupos Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia, y Principios Bioactivos de Plantas Medicinales, en los que ha adquirido experiencia en el estudio de fuentes naturales para el desarrollo de productos fitoterapéuticos, principalmente en áreas relacionadas con la estandarización de extractos vegetales, ensayos de actividad biológica (especialmente hipoglicemiante/antidiabética), estudios de biodisponibilidad y caracterización biofarmacéutica; áreas en las que posee varias publicaciones y presentaciones en congresos científicos.

El presente libro es fruto de la investigación interdisciplinaria entorno a las hojas de *Passiflora ligularis* (granadilla) con fines medicinales, entre los grupos de investigación Principios Bioactivos de Plantas Medicinales del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia y el Grupo de Investigación en Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana, con apoyo del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia. A lo largo de estas páginas, se resumen algunos de los resultados y avances más destacados de estos grupos de investigación en cuanto a la caracterización química de las hojas de esta especie dando énfasis a los flavonoides y saponinas, al estudio *in silico*, *in vitro* e *in vivo* de su actividad farmacológica, principalmente como hipoglicemiante y antiinflamatorio, al desarrollo de metodologías analíticas precisas, exactas y reproducibles que permitan la completa caracterización del extracto optimizado obtenido como un ingrediente activo promisorio para el desarrollo de productos fitoterapéuticos, etapa actualmente en progreso.

Se pretende que esta publicación permita la divulgación técnica y científica de los resultados de varios años de estudio con el fin de dar valor agregado a los cultivos de *Passiflora ligularis*, una planta de gran interés comercial debido a sus frutos y cuyas hojas en la actualidad son simplemente un subproducto de su cosecha, desconociendo el potencial terapéutico de las mismas y la posibilidad de convertirse en un materia prima para la obtención de productos fitoterapéuticos estables, seguros y eficaces.

ISBN: 978-958-794-642-0



9 789587 946420