



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Saponinas y flavonoides de *Passiflora ligularis* y evaluación de su actividad antiinflamatoria.

Carolina Meneses Macías

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ciencias, Departamento de Química
Bogotá D.C., Colombia
2015

Saponinas y flavonoides de *Passiflora ligularis* y evaluación de su actividad antiinflamatoria.

Carolina Meneses Macías

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias-Química

Director

Freddy Alejandro Ramos Ph.D

Codirectora

Diana Marcela Aragón Novoa Dr. Sci

Línea de investigación:

Productos Naturales

Grupos de investigación:

Estudio y aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia
(Departamento de Química)

Productos Bioactivos de Plantas

(Departamento de Farmacia)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de ciencias, Departamento de Química

Bogotá D.C., Colombia

2015

Dedicado a:

Mis padres, hermanas y sobrinitos

(“Somos la memoria que tenemos y la responsabilidad que asumimos, sin memoria no existimos y sin responsabilidad quizá no merezcamos existir” José Saramago)

Agradecimientos

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dándome ánimo, acompañándome en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

A Dios por darme la fortaleza y la tenacidad para que esto fuera posible

A mis padres Rosa y Alberto, sin los cuales esto no hubiese podido ser, a mis hermanas Elena y Mónica, más que hermanas amigas en las buenas y en las malas y a mis sobrinitos Camilo e Isabella por ser un apoyo constante, gracias por la compañía en esta aventura que significó esta maestría y que, de forma incondicional, entendieron mis ausencias y malos momentos.

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento al profesor Freddy Ramos por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de la misma, pero sobre todo por la motivación, la paciencia y el apoyo recibido a lo largo de este tiempo.

A la profesora Marcela Aragón y el profesor Leonardo Castellanos por el apoyo, sugerencias y confianza depositada.

Al profesor Luis Fernando Ospina por el apoyo en la realización de los ensayos la actividad antiinflamatoria.

A Adriana, Farja, Lina y Sandra que fueron de forma presencial y virtual una compañía y amistad permanente en cada etapa de este trabajo, así como compañeras de “pausas activas” y momentos de relajación completamente necesarios.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a los compañeros de la línea de investigación “Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia” Laura Reina, Laura Becerra, Juan David, Paola, Charly, Carlos, las mamás (Sandra y Luz Adriana), Diana, Mateo, Michelle, por su amistad, colaboración y sobre todo por hacer del laboratorio un lugar divertido y acogedor.

A Norman, Fabián y Geison por haber sido tan colaboradores y pacientes conmigo, por siempre estar disponibles a ayudarme y a brindarme un poco de su tiempo cada día para

que esto pudiese ser realidad, pero sobre todo por permitirme aprender tantas cosas de ustedes, no solo académicas sino para la vida.

A Jenny, Teresa y Diana, amigas duraderas e incondicionales que de una forma u otra siempre estuvieron acompañándome en este largo camino, con las que compartí alegrías, tristezas y momentos que hicieron crecer y fortalecer esta amistad.

A todas aquellas personas que esta maestría me permitió conocer Ana María, Gabriela, Daniel, que se convirtieron poco a poco en amigos, personas especiales y cómplices de esta aventura.

A todos aquellos que de una forma u otra estuvieron involucrados en este proceso.

A la universidad Nacional de Colombia y al programa de exención de derechos académicos.

Al Proyecto “Red nacional para la bioprospección de frutas tropicales” RIFRUTBIO por la financiación (Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas, contrato No. 0459–2013)

Resumen

Las especies del género *Passiflora* han sido ampliamente estudiadas debido a la gran cantidad de usos etnofarmacológicos que tienen, lo que ha motivado la realización de un gran número de estudios de su composición química y de actividad farmacológica. En Colombia se cuenta con una alta diversidad de especies del género *Passiflora*, varias de ellas conocidas por su fruto es comestible y por sus usos etnofarmacológicos.

Passiflora ligularis, conocida comúnmente como granadilla tiene varios usos reportados, tanto para el fruto como para otras partes de la planta. Entre estos usos se destaca la preparación de cataplasmas con las hojas para tratar inflamaciones tópicas. Trabajos previos demostraron que el extracto acuoso de las hojas de *P. ligularis* presenta actividad antiinflamatoria en modelos de inflamación *in vivo*. De igual forma, en su composición química se han detectado y aislado flavonoides y saponinas, los cuales podrían ser los responsables de la actividad observada.

Basados en estos antecedentes, en este estudio, a partir del extracto acuoso de *P. ligularis*, por diferentes técnicas cromatográficas, entre las cuales se resalta el uso de HSCCC, se logró separar 8 compuestos, 4 flavonoides identificados como quercetina-3-O- β -glucopiranosido, kaempferol-3-O- β -glucopiranosido, (-) catequina y crisina, junto con 4 saponinas triterpenoidales con núcleo lanostano y un glicosido de la 3`-(2`-(N-acetil)glucopiranosaminoil)glucopiranososa en el carbono 3 de la aglicona denominados ligularosidos A-D, de los cuales el ligularosido B al D son compuestos reportados por primera vez en la naturaleza. La caracterización de los ocho compuestos se basó en datos espectroscópicos RMN y EM. Tanto a los compuestos aislados como al extracto acuoso se les realizó la evaluación de la actividad antiinflamatoria en modelo de edema de oreja en ratón inducido por TPA, mostrando que la quercetina-3-O- β -glucopiranosido y el ligularosido C son los compuestos responsables de la actividad antiinflamatoria detectada en el extracto crudo, con una inhibición del edema del 77,1% y 57.3% respectivamente. Este trabajo mostró la interesante diversidad química de las hojas de la especie y su correlación con la actividad antiinflamatoria observada para el extracto crudo.

Palabras clave:

Passiflora, *Passiflora ligularis*, granadilla ligularosidos A - D saponinas, flavonoides, actividad antiinflamatoria

Abstract

Passiflora species have been studied extensively because of their many ethnopharmacological uses that have, which has led to the realization of a large number of studies on their chemical composition and pharmacological activity. Colombia has a high diversity of species of the genus *Passiflora*, some of them known for its fruit is edible. and other for their ethnopharmacological uses.

Passiflora ligularis, commonly known as granadilla have several reported uses for both the fruit and other parts of the plant. Among them, the leaves are uses as poultices to treat topical inflammation. Our previous work has shown that the aqueous extract of *P. ligularis* exhibits anti-inflammatory activity in *in vivo* inflammation models. Similarly, about its chemical composition flavonoids and saponins that have been detected and isolated and those compounds could be the responsible for the anti-inflammatory activity detected.

Therefore, in this study from the aqueous extract of the leaves of *P. ligularis*, by different chromatographic techniques including HSCCC, we report the isolation of eight compounds, 4 flavonoids identified as quercetin-3-O- β -glucopyranoside, kaempferol-3-O- β -glucopyranoside, (-) catechin and chrysin, along with 4 lanostane triterpenoid saponins glycosidated with 3'-(2''-N-acetylglucopyranoseaminoil)glucopyranose bound to the carbon 3 of the aglycone. These compounds were denominated ligularosides A-D, where the ligularoside B to D are compounds reported for the first reported in nature. The characterization of the isolated compounds was based on NMR and MS spectroscopic data. Both, the aqueous extract and the isolated compounds were evaluated for their anti-inflammatory activity in the model of ear edema in mice induced by TPA, and the results showed that quercetin-3-O- β -glucopyranoside and ligularoside C present potential anti-inflammatory compounds with edema inhibition 77.1% and 57.3% respectively. This study showed the interesting chemical diversity of the leaves of this specie as well as the correlation of this chemical diversity with the anti-inflammatory activity observed for the crude extract.

Keywords:

Passiflora, *Passiflora ligularis*, granadilla, ligularosides A to D saponins, flavonoids, anti-inflammatory activity.

Contenido

Pág.

Resumen	VII
Lista de figuras.....	1
Lista de tablas	3
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	4
Introducción.....	5
1. Capítulo 1: Composición química y actividad biológica de especies del género <i>Passiflora</i>, revisión actual del tema.....	7
1.1 Saponinas.....	7
1.2 Flavonoides	11
1.3 Otros compuestos.....	14
1.4 Actividad biológica de especies del género <i>Passiflora</i>	15
1.5 Conclusiones.....	19
2. Capítulo 2: Aislamiento y elucidación estructural de flavonoides y saponinas de <i>Passiflora ligularis</i>.	20
2.1 Generalidades de <i>Passiflora ligularis</i>	20
2.1.1 Usos tradicionales.....	21
2.1.3 Actividad biológica de <i>P. ligularis</i>	22
2.1.4 Composición química de <i>P. ligularis</i>	23
2.2 Materiales y métodos.....	25
2.2.1 Métodos generales.....	25
2.2.2 Material vegetal y extracción	25
2.2.3 Fraccionamiento por Cromatografía contracorriente de alta velocidad	26
2.3 Resultados y discusión	29
2.3.1 Elucidación del compuesto 1.....	31
2.3.2 Elucidación compuesto 2	36
2.3.3 Elucidación del compuesto 3.....	41
2.3.4 Elucidación compuesto 4	44
2.3.5 Elucidación compuesto 5	47

2.3.6	Elucidación compuesto 6	49
2.3.7	Elucidación compuesto 7	51
2.3.8	Elucidación compuesto 8	52
2.4	Discusión general	53
2.5	Conclusiones.....	54
3.	Capítulo 3: Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extracto, fracciones y compuestos de las hojas de <i>Passiflora ligularis</i>	55
3.1	Generalidades de la inflamación	55
3.1.1	Inflamación	55
3.1.2	Compuestos con actividad antiinflamatoria	56
3.1.3	Productos naturales y actividad antiinflamatoria	58
3.1.4	Saponinas y flavonoides con actividad antiinflamatoria.....	61
3.2	Metodología	62
3.2.1	Animales de experimentación	62
3.2.1	Evaluación de la actividad antiinflamatoria.....	62
3.2.1	Análisis estadístico	63
3.3	Resultados y discusión.....	63
3.4	Conclusiones.....	67
4.	Conclusiones y recomendaciones	68
4.1	Conclusiones.....	68
4.2	Recomendaciones.....	68
5.	Bibliografía	70
6.	Anexos.....	79

Lista de figuras

		Pág.
Figura 1	Partes de la planta de granadilla	20
Figura 2	Flavonoides aislados del extracto acuoso de <i>P. ligularis</i>	23
Figura 3	Fenoles glicosidados identificados en la pulpa y la cáscara de <i>P. ligularis</i>	24
Figura 4	Estructura química de saponina aislada del extracto acuoso de <i>Passiflora ligularis</i>	24
Figura 5	Esquema de aislamiento de los compuestos obtenidos de la fracción butanólica de <i>P. ligularis</i>	28
Figura 6	Cromatogramas de HPLC de la fracción butanólica en Cloroformo, metanol, agua (4:4:2), A) Fase superior, B) Fase inferior	29
Figura 7	CCD de F1 a F10, Fase móvil: Acetato de etilo: acetona: Ácido acético: agua (6/2/1/1)7, Fase estacionaria: Silica, Revelador: Sulfato cérico amónico	30
Figura 8	Principales correlaciones para los diglicósidos y el núcleo de la aglicona en el compuesto 1	34
Figura 9	Posibles subestructuras encontradas para la cadena lateral del compuesto 1	34
Figura 10	Correlaciones NOESY encontradas para el compuesto 1	35
Figura 11	Estructura planteada para el compuesto 1 (ligularosido B)	36
Figura 12	Principales correlaciones para los azúcares y el núcleo de la aglicona en el compuesto 2	37
Figura 13	Posibles subestructuras encontradas para la cadena lateral del compuesto 2	39
Figura 14	Correlaciones NOESY encontradas para el compuesto 2	40
Figura 15	Estructura planteada para el compuesto 2 (ligularosido C)	41
Figura 16	Estructura propuesta para el compuesto 3 (ligularosido D)	44
Figura 17	Estructura del compuesto 4 (ligularosido A)	46
Figura 18	Estructura del compuesto 5	48
Figura 19	Estructura del compuesto 6	50
Figura 20	Estructura del compuesto 7	52
Figura 21	Estructura del compuesto 8	53
Figura 22	Mecanismo de acción de los AINES	57

Figura 23	Actividad antiinflamatoria del extracto acuoso, fracción butanólica y los compuestos obtenidos de <i>P. ligularis</i> (500 µg/oreja). Patrón (Indometacina 500 µg/oreja). Datos expresados como la media ± E.E.M., n=10 (ANOVA post-test Dunnet: **p<0.01; ***p<0.001, ****p>0.0001).	64
Figura 24	Inhibición de la inflamación presentada por patrón (indometacina), las hojas y la fracción butanólica de <i>P. ligularis</i> y los compuestos 1 y 6 en dosis de 500 µg/oreja. Datos expresados como la media ± E.E.M., n=10.	64
Figura 25	Cromatograma de la fracción butanólica del extracto acuoso de las hojas de <i>P. ligularis</i> ; Fase móvil: MeCN (A) y H ₂ O (B) 0-10min 10-20%A, 30min 50%A, 40min 95% A, 45min 95%A, Fase estacionaria: Columna Thermo® RP-18 (75 mm x 3 i.d; 2,2 mm), detector: LT- ELSD	66

Lista de tablas

		Pág
Tabla 1	Principales saponinas identificadas en especies del género <i>Passiflora</i>	8
Tabla 2	Principales flavonoides aislados de especies del género <i>Passiflora</i>	12
Tabla 3	Metabolitos secundarios aislados de especies del género <i>Passiflora</i>	14
Tabla 4	Principales actividades biológicas para especies del género <i>Passiflora</i>	15
Tabla 5	Usos tradicionales de <i>Passiflora ligularis</i> . (tomada y adaptada de Carvajal et al, 2014)	21
Tabla 6	Estudios farmacológicos realizados con <i>Passiflora ligularis</i>	22
Tabla 7	Relación de las áreas de los diferentes tiempos de retención observados en el cromatograma de la fase inferior y superior.	29
Tabla 8	Desplazamientos en RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) para el compuesto 1 en CD_3OD , δ en ppm.	32
Tabla 9	Desplazamientos en RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) para el compuesto 2 en CD_3OD , δ en ppm.	38
Tabla 10	Desplazamientos en RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) para el compuesto 3 en CD_3OD , δ en ppm.	42
Tabla 11	Desplazamientos en RMN ^1H (400 MHz) para el compuesto 4 en CD_3OD , δ en ppm.	45
Tabla 12	Desplazamientos en RMN ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75 MHz) para el compuesto 5 en CD_3OD , δ en ppm, J en Hz	47
Tabla 13	Desplazamientos en RMN ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75 MHz) para el compuesto 6 en CD_3OD , δ en ppm, J en Hz	49
Tabla 14	Desplazamientos en RMN ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75 MHz) para el compuesto 7 en CD_3OD , δ en ppm, J en Hz	52
Tabla 15	Desplazamientos en RMN ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75 MHz) para el compuesto 8 en CD_3OD , δ en ppm, J en Hz	52
Tabla 16	Actividad antiinflamatoria reportada para algunos extractos y metabolitos secundarios de plantas	58
Tabla 17	Efectos del extracto, la fracción butanólica y los compuestos aislados de <i>P. ligularis</i> sobre el edema auricular inducido por TPA.	63

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolo	Término
Anova	Analysis of variance
APT	Attached-Proton-Test
CCD	Cromatografía en capa delgada
COSY	correlation spectroscopy
d	Doblete
d.i	Diámetro interno
dd	Doble doblete
ESI	Electrospray Ionization
Glc	Glucosa
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High-performance liquid chromatography
HSCCC	High Speed Countercurrent Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IT	Ion Tramp
J	Constante de acoplamiento
LT-ELSD	Low Temperature Evaporation Light-scattering Detector
m/z	Relación masa/ carga
MeCN	Acetonitrilo
NAcGlc	N- acetil glucosamina
RMN	Resonancia Magnética nuclear
s	Singlete
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TOF	Time-of-flight
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
UV	Ultravioleta

Introducción

El género *Passiflora* constituye una enorme riqueza a nivel biológico y económico, puesto que varias de sus especies tienen un uso ornamental y comestible. Adicionalmente, un número significativo de especies ha sido utilizado en la medicina popular tradicional en muchos países, como remedio para tratar la ansiedad, el insomnio, la histeria, la epilepsia, los espasmos y el dolor (Dhawan et al., 2004). Esta información etnomedicinal ha impulsado la realización de varios estudios farmacológicos con los extractos de algunas especies del género *Passiflora*, mostrando tener propiedades sedativas, antiespasmódicas, antiinflamatorias, antibacteriales (Nicolls et al, 1973) y antioxidantes (Mahattanatawee et al., 2006). La actividad biológica observada se ha correlacionado con los compuestos aislados en diferentes estudios químicos, entre los cuales cabe destacar a los flavonoides conocidos por su actividad antioxidante, hepatoprotectora (Wiseman, 2006) y actividad inhibitoria de la comunicación bacteriana (quorum sensing) (Vikram et al, 2010), entre otras. Adicionalmente, se destacan las saponinas (Sparg et al, 2004), las cuales tienen actividad hemolítica (Baumann et al, 2000; Oda et al, 2000), actividad antimicrobiana (Killeen et al, 1998), actividad citotóxica (Itabashi et al, 1999) y actividad antiinflamatoria (Just et al, 1998), entre otras.

Datos recientes describen 170 especies de la familia Passifloraceae tanto en formas silvestres como cultivadas distribuidas en todas las regiones biogeográficas de Colombia, muchas de ellas endémicas (Ocampo et al, 2013). Dentro de las especies comerciales, *Passiflora ligularis*, conocida comúnmente como granadilla es la segunda especie en importancia económica por poseer fruto comestible y comercializado en mercados nacionales e internacionales siendo Colombia el principal productor a nivel mundial con 4500 hectáreas cultivadas (Parra et al, 2014). En el 2012, las exportaciones de granadilla totalizaron USD 2,9 millones, un 15,7 % más que lo registrado en el 2011 cuando fueron de USD 2,5 millones. Durante los últimos tres años, el crecimiento promedio anual de las

ventas externas de esta fruta fue del 2,1%, ya que entre el 2010 y el 2011 estas exportaciones decrecieron en un 10,1%. La granadilla se cultiva en varios departamentos de nuestro país, siendo Antioquia y Huila los departamentos con las mayores áreas plantadas. Esta información muestra la importancia de este cultivo en la industria agrícola del país.

Sin embargo, las hojas de granadilla, al igual que las hojas de otras especies comerciales del género *Passiflora*, podrían ser potencialmente aprovechables en diferentes aplicaciones. Estudios previos han mostrado que el extracto acuoso de las hojas *P. ligularis* presenta actividad antiinflamatoria (Aragón et al, 2014) y que entre sus componentes químicos se encuentran flavonoides y saponinas (López, 2011; Manrique, 2012; Moreno, 2013).

En este sentido, y como continuación de los trabajos de investigación del grupo “Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia” del “Departamento de Química y el grupo Principios Bioactivos de Plantas” del Departamento de Farmacia en la composición química y actividad biológica de especies del género *Passiflora*, en este Trabajo Final de maestría se presenta la contribución al estudio químico y la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados de las hojas, enfocándonos principalmente en la caracterización de saponinas y flavonoides.

1. Capítulo 1: Composición química y actividad biológica de especies del género *Passiflora*, revisión del estado actual del tema

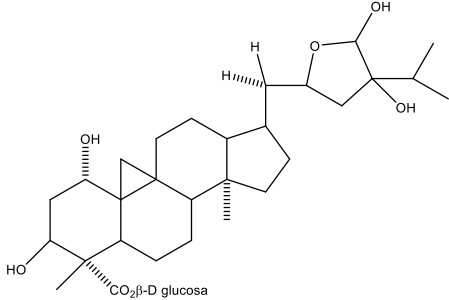
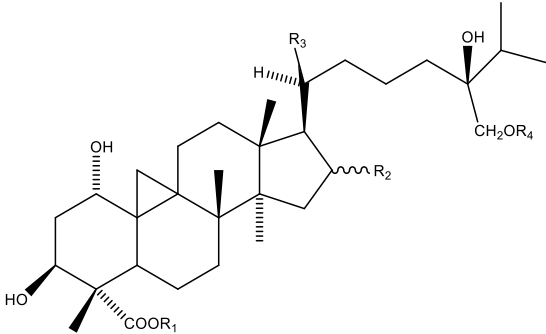
Las especies del género *Passiflora* presentan gran diversidad en su composición química, entre los cuales se han reportado alcaloides, fenoles, compuestos cianogénicos flavonoides y saponinas (Patel et al, 2011). Sin embargo, dentro de los diferentes compuestos mencionados los dos últimos se destacan por la gran diversidad estructural como se presentará a continuación.

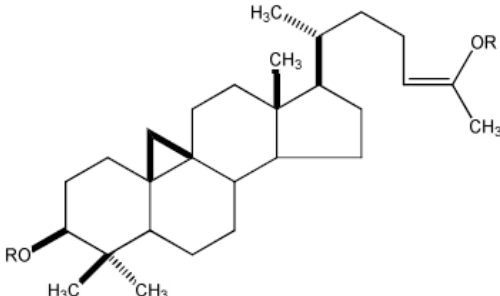
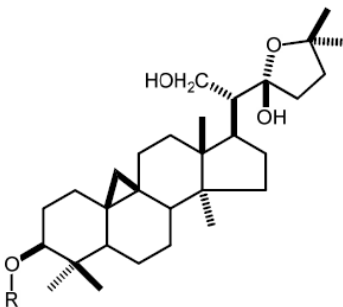
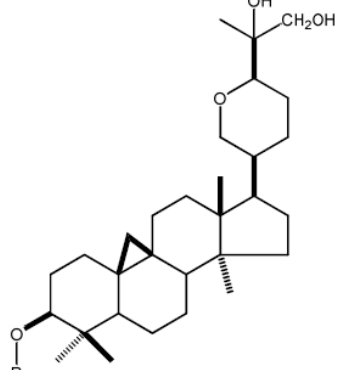
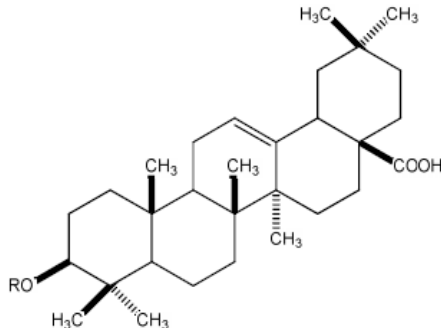
1.1 Saponinas

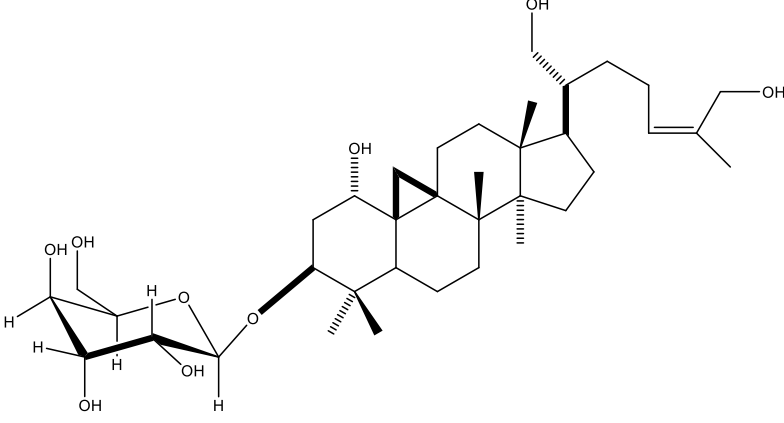
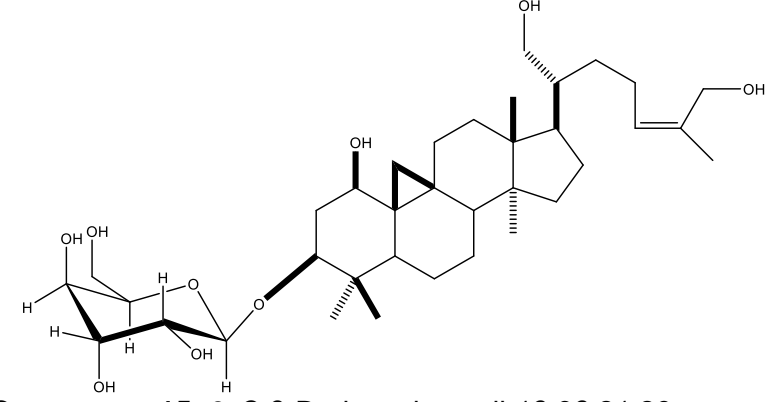
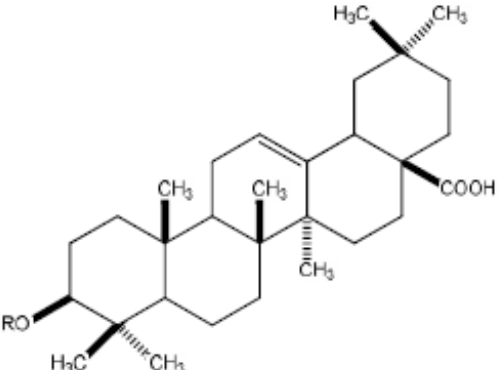
Las saponinas encontradas en las especies de este género presentan gran variedad de esqueletos carbonados, entre los cuales cabe resaltar los núcleos tetracíclicos tipo cicloartano, descrito en *P. edulis*, *P. incarnata* y *P. alata*, su principal característica es la presencia de un ciclopropilo entre el C-9, C-10 y C-19 (Yoshikawa et al, 2000; Bombardelli, et al 1975; Orsini et al, 1986; Reginatto et al, 2001; Costa, 2013;); el núcleo tipo lanostano, descrito en *P. ligularis* y que se caracteriza por presentar una insaturación entre el C-8 y C-9 (Moreno, 2013). Los núcleos pentacíclicos tipo oleano han sido descrito en *P. alata* y *P. quadrangularis* (Reginato et al, 2001; Costa, 2013); encontrando una alta diversidad compuestos, mayoritariamente debido a modificaciones que pueden tener en los metilos (migraciones y oxidaciones) y/o a la presencia de grupos hidroxilo de el núcleo. Otro factor de diversidad estructural son las modificaciones en la cadena lateral, en terpenos tetracíclicos (insaturaciones, ciclos y heterociclos), así como glicosidaciones, comunmente glucosa, enlazada en el carbono 3 y en los carbonos de las cadenas laterales. Las

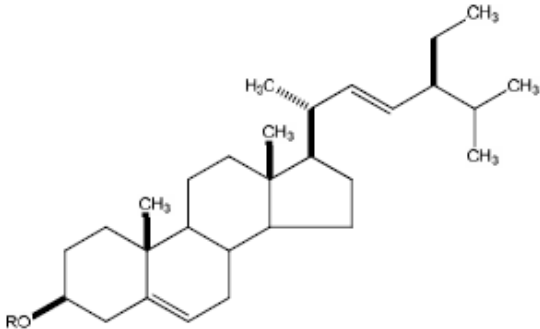
principales saponinas aisladas de especies del género *Passiflora* se enumeran en la Tabla 1. En esta tabla se observan como las cadenas laterales presentan hidroxilos en las posiciones 21, 22, 24, 25 y 26, insaturaciones y diferentes ciclaciones.

Tabla 1: Principales saponinas identificadas en especies del género *Passiflora*

ESTRUCTURA	ESPECIE	REFERENCIA
 <p>Compuesto 1: Passiflorina</p>	<p><i>Passiflora edulis</i></p> <p><i>Passiflora quadrangularis</i></p> <p><i>Passiflora alata</i></p>	<p>Bombardelli et al 1975</p> <p>Orsini et al, 1986</p> <p>Reginatto et al, 2001</p>
 <p>Compuesto 2 (Ácido ciclopasifloico E): R1=R4=H, R2=β-OH, R3= OH</p> <p>Compuesto 3 (Ácido ciclopasifloico F): R1=R3= R4= H, R2=β-OH</p> <p>Compuesto 4 (Ácido ciclopasifloico G): R1=R3=R4= H, R2=α-OH</p> <p>Compuesto 5 (Ciclopasiflosido VII): R1=Glc, R2=β-OH, R3=OH, R4=H</p> <p>Compuesto 6 (Ciclopasiflosido VIII): R1=Glc, R2=β-OH, R3=R4=H</p> <p>Compuesto 7 (Ciclopasiflosido IX): R1=R4 Glc, R2=β-OH, R3=H</p> <p>Compuesto 8 (Ciclopasiflosido X): R1=Glc, R2=β-OH, R3=R4=H</p> <p>Compuesto 9 (Ciclopasiflosido XI): R1=R4=Glc, R2=α-OH, R3=H</p>	<p><i>Passiflora edulis</i></p>	<p>Yoshikawa et al, 2000</p>

 <p>Compuesto 10: <u>Quadrangulósido; R= Gentibiose</u></p>	<p><i>Passiflora quadrangularis</i></p>	<p>Orsini et al, 1986</p>
 <p>Compuesto 11: 9,19-ciclanostano-22,25-epóxi-3-O-21,22(R)-triol-3-O-gentiobiosídeo; R= Gentibiose</p>	<p><i>Passiflora quadrangularis</i></p>	<p>Orsini et al, 1987</p>
 <p>Compuesto 12: 9,19-ciclanostano-21,24-epóxi-3-O-25,26-triol-3-O-gentiobiosídeo, R= Gentibiose.</p>	<p><i>Passiflora quadrangularis</i></p>	<p>Orsini et al, 1987</p>
 <p>Compuesto 13: ácido 3-O-β-D-glicopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosiloleanólico, R= glucosa (1→2)glucosa</p>	<p><i>Passiflora quadrangularis</i></p>	<p>Orsini et al, 1987</p>

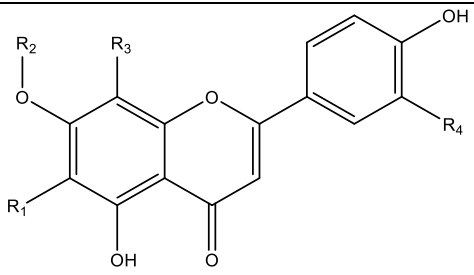
 <p>Compuesto 14: 3-O-β-D-glucopiranosil-9,19- ciclanost-24Z-an-1α,3β,21,26-tetraol</p>	<i>Passiflora quadrangularis</i>	Costa, 2013
 <p>Compuesto 15: 3-O-β-D-glucopiranosil-1β,3β,21,26-tetrahidroxi-9,19-ciclanost-24Z-ano</p>	<i>Passiflora quadrangularis</i>	Costa, 2013
 <p>Compuesto 16: 3-O-β-D-glicopiranosil de ácido oleanólico; R= Glucosa</p> <p>Compuesto 17: 3-O-β-D-glicopiranosil-(1→3)-β-D-glicopiranosídeo de ácido oleanólico R= Glucosa (1→3) glucosa</p> <p>Compuesto 18: 3-O-β-D-glicopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosídeo de ácido oleanólico R= Glucosa (1→2) glucosa.</p>	<i>Passiflora alata</i>	Reginatto et al, 2001

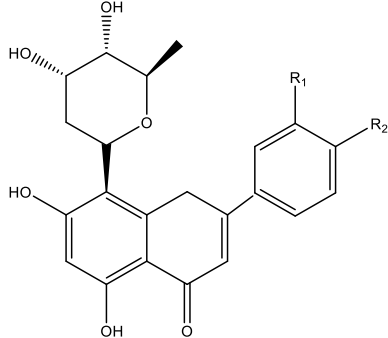
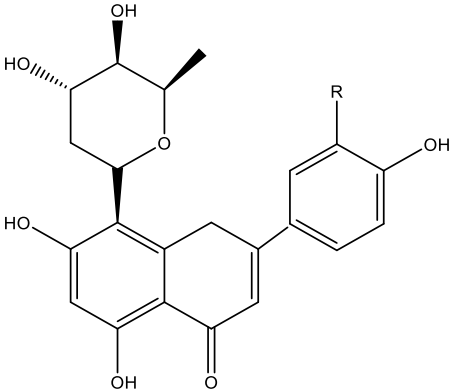
 <p>Compuesto 19: 3-O-β-D-glicopiranosil estigmasterol</p>	<i>Passiflora alata</i>	Reginatto et al, 2001
--	-------------------------	-----------------------

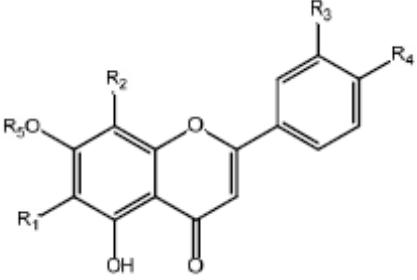
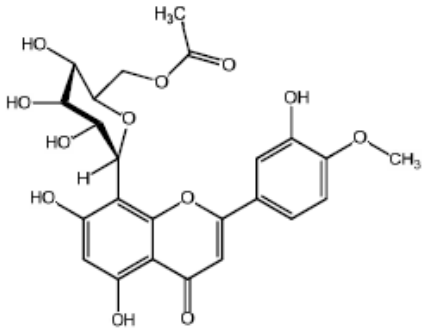
1.2 Flavonoides

Entre los principales flavonoides de las especies del género *Passiflora* se destacan las flavonas, que varían en sus sustituciones en el anillo A, B y/o C dando núcleos característicos como, vitexina, orientina, isorientina, entre otros, los cuales se diferencian a su vez por el número y el tipo de glicosilaciones que presenten (*O*- y *C*-glicósidos). Entre los azúcares más comunes se han encontrado arabinosa, glucosa y xilosa. Usualmente, es las especies del género *Passiflora* encontramos flavonoides monoglicosidados y diglicosidados, lo cual da una gran variedad de este tipo de compuestos como se observa en la Tabla 2

Tabla 2: Principales flavonoides aislados de especies del género *Passiflora*

ESTRUCTURA						ESPECIE	REFERENCIA
						<i>Passiflora incarnata</i>	Rafaelli et al, 1997 (Zucolotto et al, 2009)
Compuesto		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄		
20	Vicenina-2	Glc	H	Glc	H		
21	Schaftosido	Glc	H	Ara	H		
22	Isoschaftosido	Ara	H	Glc	H		
23	Isorientin-2"-O-β-gluco-piranoside	Soph	H	H	OH		

24	Isoorientin	Glc	H	H	OH		
25	Isovitexin-2''-O- β -glucopyranoside	Soph	H	H	H		
26	Swertisin	Glc	Me	H	H		
27	Orientin	H	H	Glc	OH		
28	Isovitexin	Glc	H	H	H		
29	Vitexin	H	H	Glc	H		
 <p>Compuesto 30: luteolin-8-C-β-digitoxopiranosil-4'-O-β-D-glucopiranosido; R1= OH, R2= O-β-glucopiranosil Compuesto 31: apigenin-8-C-β-digitoxopiranosido; R1= H, R2= OH</p>						<i>Passiflora edulis</i>	Fengqing et al, 2013
 <p>Compuesto 32: apigenin-8-C-β-boivinopiranosido; R=H Compuesto 33: luteolin-8-C-β boivinopiranosido; R=OH</p>						<i>Passiflora edulis</i>	Fengqing et al, 2013
<p>Compuesto 34: 2''-O-xilosil- orientina. R1= Glu-O-xil, R2= OH, R3= OH Compuesto 35: 2''-O-xilosil- vitexina R1= Glu-O-xil, R2= H, R3= OH Compuesto 36: 2''-O-xilosil- vitexina R1= Glu-O-glu, R2= H, R3= OH</p>						<i>Passiflora quadrangularis</i>	Salakem et al, 2013

 <p>Compuesto 37: vicenina-2 R1=Glu, R2=Glu, R3= H, R4= OH, R5= H Compuesto 38: swertisina R1=Glu, R2=H, R3= H, R4= OH, R5= CH₃ Compuesto 39: orientina R1=H, R2=Glu, R3= OH, R4= OH, R5= H Compuesto 40: isoorientina R1=Glu, R2=H, R3= OH, R4= OH, R5= H Compuesto 41: vitexina R1=H, R2=Glu, R3= H, R4= OH, R5= H Compuesto 42: isovitexina R1=Glu, R2=H, R3= H, R4= OH, R5= H Compuesto 43: Schaftosideo R1=ara, R2=Glu, R3= H, R4= OH, R5= H</p>	<i>Passiflora tripartita</i> var <i>mollissima</i>	(Ramos et al 2010) (Zucolotto et al, 2012) (Simirgiotis et al, 2013)
 <p>Compuesto 44: 4'-O- metil-8-C-(6''-acetil)-glucopiranosil-luteolina</p>	<i>Passiflora tripartita</i> var <i>mollissima</i>	(Ramos et al 2010) (Zucolotto et al, 2012) ((Simirgiotis et al, 2013)

1.3 Otros compuestos

Además de las saponinas y los flavonoides, las especies del género *Passiflora* también han mostrado tener una gran variedad de metabolitos secundarios, como los alcaloides, compuestos cianogénicos y compuestos volátiles. En la tabla 3 se muestran otros compuestos aislados en especies de este género.

Tabla 3: Metabolitos secundarios aislados de especies del género *Passiflora*

Metabolitos secundarios	Nombre de los compuestos	Especie	Referencia
Alcaloides	Noyaux (estructura β - carbolina), tipo harmano, harmina, harmol, harmalina, harmalol.	<i>P. incarnata</i>	Ghedira et al, 2013
	harmalol, harmol y harmalina	<i>P. edulis</i>	Lutomski et al, 1975
Aceites esenciales	Hidrocarburos triterpenicos (Limoneno, α -pineno, cumeno), carbona, alcohol de bencilo, fenetilo y linalol	<i>P. incarnata</i>	Ghedira et al, 2013
Polisacáridos y compuestos glicosidicos	ácido galacturónico, arabinosa, glucosa, ramnosa, manosa y fucosa	<i>P. edulis</i>	Silva et al, 2013
	Sacarosa, fructosa, glucosa, rafinosa	<i>P. incarnata</i>	Ghedira et al, 2013
	β -D-Glucopiranosidos, α -L-ramnopiranosil β -D-glucopiranosidos, α -L-arabinofuranosil β -D-glucopiranosido y (s) linaool	<i>P. edulis</i> y <i>P. edulis</i> var <i>flavicarpa</i>	Chassagne et al, 1998
	β -D-glucósido de metil salicilato	<i>P. edulis</i> y <i>P. edulis</i> var <i>flavicarpa</i>	Chassagne et al, 1997
	eugenil β -D-glucósido	<i>P. mollissima</i>	
Compuestos cianogénicos	heterósidos cianogénicos	<i>P. incarnata</i>	Ghedira et al, 2013
	passicoriacina, epipassicoriacina	<i>P. edulis</i>	Chassagne et al, 1998
	(<i>R</i>)-mandelonitrilo α -L-ramnopiranosil- β -d-glucopiranosido	<i>P. edulis</i>	Chassagne et al, 1998
Terpenos	(2E)-2,6-dimetil-2,5-ácido heptadienoico, (2E)-2,6-dimetil-2,5-ácido heptadienoico beta-D-glucopiranosil ester, (5E)-2,6-dimetil-5,7-octadieno-2,3-diol, (3E)-3,7-dimetil-3-octeno-1,2,6,7-tetrol y 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona beta-D-glucopiranosido.	<i>P. quadrangularis</i>	Osorio et al, 2000

Las tablas 1-3 permiten observar la gran diversidad de compuestos químicos que tienen las especies del género *Passiflora*, mostrando variaciones en los tipos de metabolitos, así como en sus núcleos y tipo y número de glicosilaciones. Esta riqueza metabólica justifica continuar con la caracterización de los compuestos presentes en diferentes especies de esta familia, pues representan una fuente de compuestos con diferentes estructuras y funciones químicas.

1.4 Actividad biológica de especies del género *Passiflora*

Para las especies del género *Passiflora* se han reportado diversos estudios sobre su actividad biológica, resaltando un gran número de reportes de actividad ansiolítica, actividad antioxidante, antiinflamatoria. En la tabla 4 se enumeran las principales actividades, así como los modelos empleados para tal fin y las dosis empleada cuando se encuentra esta información.

Tabla 4: Principales actividades biológicas para especies del género *Passiflora*

Espece	Actividad	Resultados	Referencia
<i>Passiflora incarnata</i>	Actividad ansiolítica	La crisina, flavonoide identificado de <i>P. incarnata</i> , mostró actividad ansiolítica a 2 mg/kg similares al midazolam (control positivo) en una dosis de 2 mg/kg. Se encontró que moduló el sitio de benzodiazepinas sobre el receptor GABA con el modelo (elevated pluze-maze).	(Brown et al, 2007)
	Actividad antioxidante y para tratar la enfermedad de Parkinson	El extracto butanólico de partes aéreas de <i>P. incarnata</i> mostró actividad en el ensayo de captación de radicales libres generados por DPPH ABTS y H ₂ O ₂ , con una concentración variable del extracto (2 - 1000 µg/mL). Mostró ser útil para tratar la enfermedad de Parkinson, usando haloperdiol para inducir catalepsia en ratones y tacrina para inducir movimientos de la mandíbula en ratas mostrando que previene la neurodegeneración propia de esta enfermedad.	(Ingale et al, 2014) (Masteikova et al,2008)
	Anticonvulsiona nte	Se evaluó la actividad anticonvulsionante de el extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de <i>P. incarnata</i> en el modelo de convulsión inducido por pentilentretazol en ratones. Mostró actividad anticonvulsionante a 0.4mg/Kg	(Nassiris-Asl et al, 2007)

<i>Passiflora edulis</i>	Contra dislipidemia e hiperglicemia	El extracto seco de la pulpa De <i>P. edulis</i> demostró tener efectos benéficos en la prevención y el tratamiento de dislipidemias e hiperglicemia en ratas diabéticas inducida por estreptozotocina.	(Barbalho et al, 2011)
<i>Passiflora edulis</i>	Actividad ansiolítica	El extracto acuoso de hojas de <i>P. edulis</i> indujo efectos de tipo ansiolítico en ratas, similar al diazepam (1 mg/kg), el modelo utilizado fue "elevated plus- maze test". ; los efectos se compararon con este, que es una fármaco estándar ansiolítico.	(Barbosa et al, 2008)
	Actividad ansiolítica Actividad antiinflamatoria	Las partes aéreas de <i>Passiflora edulis</i> var <i>flavicarpa</i> tienen actividad ansiolítica a bajas dosis y sedante a altas dosis.	(Jun et al 2010)
		El extracto acuoso de las partes aéreas y pericarpio de <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> fue evaluado en ratones usando telemetría; para efectos en locomoción se utilizaron dosis de 300 mg/kg, 600 mg/kg, 1200 mg/kg, de esta forma se evidenció una disminución en la actividad locomotora después de 24 minutos, mientras que la dosis más alta mostró un efecto sedante significativo después de los 18 minutos.	(Klein et al, 2014)
		Un aislamiento bioguiado de <i>Passiflora edulis</i> mostró que C- glicosíflavonas pueden ser responsables de efecto antiinflamatorio en el modelo de pleuresía en ratones, en dosis de 50 y 100 mg/kg	(Zucolotto et al, 2009)
	Actividad antioxidante	La actividad antioxidante fue monitoreada por DPPH y muchas especies reactivas de oxígeno (radical superóxido, radical hidroxilo y ácido hipocloroso) en las hojas, los resultados	(Ferrerres et al, , 2007)

		muestran que puede ser una nueva fuente de antioxidantes naturales.	
	Actividad ansiolítica	Actividad de tipo ansiolítica sobre el SNC, en el extracto hidroetanólico de las hojas, administrada por vía oral en ratones con dosis de 100, 250 y 500 mg/kg en los modelos: pluz-maze, open field y holeboards test.	(Castro et al 2007)
Passiflora quadrangularis	Actividad antibacteriana y antioxidante	Se evaluó la actividad antioxidante de esta passiflora en el extracto metanólico de las partes aéreas mostrando una fuerte captación de los radicales libres por DPPH. Asimismo, se evaluó la actividad antibacteriana, en la cual se determinó que <i>Passiflora quadrangularis</i> tiene actividad intermedia contra <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> y <i>L. monocytogenes</i> y actividad moderada contra <i>B. cereus</i> .	(Ramaiya et al, 2014)
	Actividad ansiolítica	El extracto acuoso de hojas de <i>P. alata</i> indujo efectos de tipo ansiolítico en ratas, similar al diazepam (1 mg/kg), en dosis de 100 y 150 mg/kg, en el modelo "elevated plus - maze"	(Barbosa et al 2008)
Passiflora alata	Actividad antibacteriana y antioxidante	Se evaluó la actividad antioxidante de <i>P. alata</i> en el extracto metanólico de las partes aéreas mostrando una fuerte captación de los radicales libres por DPPH. Asimismo se evaluó la actividad antibacteriana, en la cual se determinó que <i>Passiflora quadrangularis</i> tiene actividad intermedia contra <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> y <i>L. monocytogenes</i> y actividad moderada contra <i>B. cereus</i> .	(Ramaiya et al, 2014)
	Actividad antioxidante y potencial anti-diabético.	El extracto acuoso de hojas de <i>P. alata</i> contiene compuestos fenólicos con actividad antioxidante evaluada en el modelo DPPH, ABTS y FRAP. Además, puede actuar como un agente	(Colomeu et al, 2014) (Oga et al, 1984)

		antiinflamatorio ayudando en el control de la diabetes.	
	Actividad sedativa	Se evaluó la actividad sedante del extracto acuoso de pericarpio de <i>P. alata</i> en ratones usando radiotelemetría, mostrando una disminución de la actividad locomotora con las concentraciones más bajas (300 y 600 mg/kg) después de 24 minutos y con la más alta (1200 mg/kg) después de 18 minutos.	(Klein et al, 2013)
<i>Passiflora mollisima</i>	Actividad Anti hiperglicemiante	Se evaluó el extracto etanólico de hojas <i>Passiflora mollisima</i> en dos dosis 100 mg/kg y 200 mg/kg El extracto disminuyó los niveles sanguíneos de glicemia en ratas hiperglicémicas.	(Edwin et al 2007)
	Actividad antioxidante	La cáscara y el fruto presenta actividad antioxidante con FRAB (Ferric reducing antioxidant activity) y ABTS (Free radical-scavenging capacity).	(Contreras et al, 2011)

1.5. CONCLUSIONES

Las especies del género *Passiflora* presentan una gran variedad en su composición química, entre la cual se destacan flavonoides y saponinas, los cuales, como se observa en la tabla 1 y 2 presentan varias modificaciones en los núcleos, tipo y número de glicosilaciones y cadenas laterales; adicionalmente tienen un gran número de actividades biológicas reportadas que se han evaluado en el extracto acuoso, etanólico y metanólico, que son acordes a las propiedades sedativas, antiinflamatorias, analgésicas, antioxidantes que tradicionalmente se han reportado (Dhawan et al, 2004).

Teniendo en cuenta lo anterior, desde la Red nacional para la bioprospección de frutas tropicales” RIFRUTBIO se decidió realizar estudios de la composición química y la actividad farmacológica de especies del género *passiflora* con importancia comercial, priorizando el estudio de las especies *P tripartita* var *mollissima*, *P. edulis* var *edulis*, *P quadrangularis* y *P ligularis*, las cuales presentan un suministro de biomasa “constante” con miras a su posible aprovechamiento.

2. Capítulo 2: Aislamiento y elucidación estructural de flavonoides y saponinas de *Passiflora ligularis*.

2.1 Generalidades de *Passiflora ligularis*

La granadilla (*Passiflora ligularis*) es una enredadera semileñosa, sus raíces son fibrosas y ramificadas, el tallo es cilíndrico, de coloración amarillo verdoso y de coloración claro en estado adulto. El tallo posee estructuras como zarcillos con los cuales se enreda y se trepa, además de ser el soporte de la planta, cumple con la función de almacenar el agua (Villalba, 2006).

Tiene flores grandes, que miden de 6 a 9 cm, muy llamativas, solitarias, bisexuales, de 5 sépalos y 5 pétalos, los estambres están unidos en un tubo alrededor del ovario y tienen anteras versátiles, el ovario súpero tiene una sola celda, con tres estilos clavados y estigmas reniformes y cordiformes; los sépalos son blanquecinos o amarillentos. El fruto es una baya ovoide, de cáscara dura, tiene un mesocarpio blanco y esponjoso de 5 mm, de espesor (Muñoz, 2007).

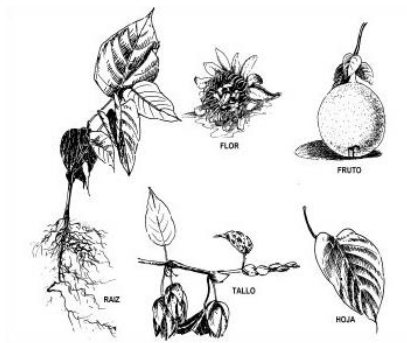


Figura 1: Partes de la planta de granadilla.

2.1.1 Usos tradicionales.

Las hojas y fruto de la granadilla son comúnmente utilizadas por campesinos para tratar diferentes trastornos y afecciones, utilizando por vía oral o tópica. En la tabla 5 se enumeran los principales usos tradicionales a las diferentes partes de la planta.

Tabla 5: Usos tradicionales de *Passiflora ligularis*. (tomada y adaptada de Carvajal et al, 2014)

No	USO LOCAL	PARTE DE LA PLANTA	ESTADO	MODO DE USO	VÍA
1	Descongestionante nasal	Flor	Jóvenes	Se huele la flor cuando se abre en las mañanas	Aspiración
2	Para la tos	Flor	Jóvenes	Infusión	Vía oral
3	Para la tos de los bebés de tres meses en adelante	Fruto	Maduro	El jugo se cocina y se le adiciona miel de abejas	Vía oral
4	Gripa	Fruto	Maduro	Jugo	Vía oral
5	Regula la digestión	Fruto	Maduro	Jugo	Vía oral
		Fruto	Maduro	Consumo del fruto	Vía oral
		Hoja	Jóvenes	Infusión	Vía oral
		Cogollo (yema terminal)	Jóvenes	Infusión	Vía oral
6	Antidiarreico	Hoja	Jóvenes	Infusión	Vía oral
		Fruto	Maduro	Se extrae el zumo sin semilla	Vía oral
		Flor	Maduras	Infusión	Vía oral
		Bejuco	Joven	Infusión	Vía oral
7	Gastritis	Fruto	Maduro	Consumo de fruta sin semilla en la mañana y la noche	
8	Úlcera	Fruto	Maduro	Consumo sin semillas	Vía oral
9	Insomnio y tranquilizante	Fruto	Maduro	Consumo	Vía oral
		Cogollos	Jóvenes	Infusión	Vía oral

		Flor	Maduras	Infusión	Vía oral
10	Controlar ataques epilépticos	Flor	Maduras	Infusión	Vía oral
11	Alivia las contusiones	Cogollos	Jóvenes	Infusión y cataplasma	Aplicación superficial
		Hojas	Jóvenes	Cataplasma	Aplicación superficial
12	Controla la presión arterial	Fruto	Maduro	Consumo de dos frutos en ayunas	Vía oral
13	Crecimiento de los niños	Fruto	Maduro	Jugo	Aplicación superficial en las articulaciones

2.1.2 Actividad biológica de *P. ligularis*

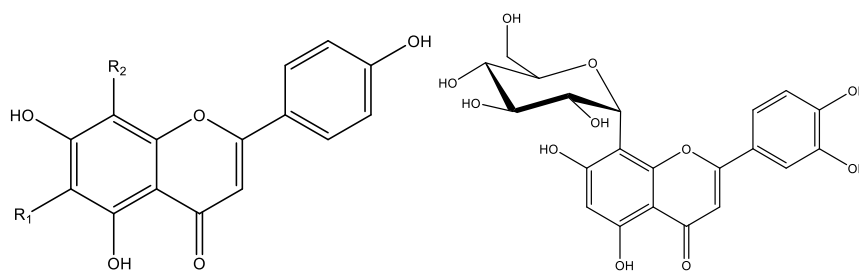
Passiflora ligularis ha sido una especie poco estudiada en cuanto a su actividad biológica. Entre las actividades biológicas reportadas, se encuentran la actividad antioxidante, antimicrobiana y antiinflamatoria, esta última de gran interés para el presente trabajo de grado.

Tabla 6: Estudios farmacológicos realizados con *Passiflora ligularis*

Actividad	Resultados	
Actividad antioxidante y actividad antimicrobiana	Extractos hidroalcohólicos de las hojas presentan actividad antioxidante y actividad antimicrobiana.	(Navarro et al, 2014)
Actividad antiinflamatoria	Extractos acuosos presentan actividad antiinflamatoria (modelo de edema auricular inducido por TPA en ratones).	(Aragón D.M, 2014)

2.1.3 Composición química de *P. ligularis*.

En cuanto a su composición química, en *Passiflora ligularis* se ha encontrado la presencia de fenoles glicosidados (Chasagne et al., 1997), flavonoides mono y di glicosidados (Lopez, 2011; Manrique, 2012) y saponinas (Moreno, 2013). Entre los flavonoides aislados se han reportado a partir de una muestra de hojas recolectada en Choachí (Cundinamarca) cuatro C-glicosidos, compuestos con núcleo apigenina, entre los cuales se encuentran 6,8-di-C- α -L-arabinopiranosil apigenina (I), 6-C- α -L-arabinopiranosil-8-C- β -L-arabinopiranosil apigenina (II), 6-C- β -L-arabinopiranosil-8-C- α -L-arabinopiranosil apigenina (III), 6-C- β -D-xilopiranosil-8-C- α -L-arabinopiranosil apigenina ó 6-C- α -L-arabinopiranosil-8-C- β -D-xilopiranosil apigenina (IV) (Lopez, 2011). Adicional a esto, se encontró en una muestra recolectada en Anolaima la presencia de orientina en *P. ligularis*, pero no de isoorientina ni de ninguno de los cuatro flavonoides glicosidados previamente mencionados (Manrique, 2012) (Figura 2)



Orientina

Compuesto I: R1= α -L-arabinopiranososa, R2= α -L-arabinopiranososa
Compuesto II: R1= α -L-arabinopiranososa, R2= β -L-arabinopiranososa
Compuesto III: R1= β -L-arabinopiranososa, R2 = α -L-arabinopiranososa
Compuesto IV: β -D-xilopiranososa, R2= α -L-arabinopiranososa

Figura 2: Flavonoides aislados del extracto acuoso de *P. ligularis*

A partir del extracto acuoso de la pulpa se han aislado los fenoles glicosidados: β -D-glucósido del salicilato de metilo, β -D-glucósido del eugenilo y β -D-rutinósido del salicilato de metilo; y a partir del extracto metanólico de la cáscara se recuperaron el β -D-glucósido del salicilato de metilo y el β -D-glucósido del eugenilo (Figura 3, Chasagne et al, 1997).

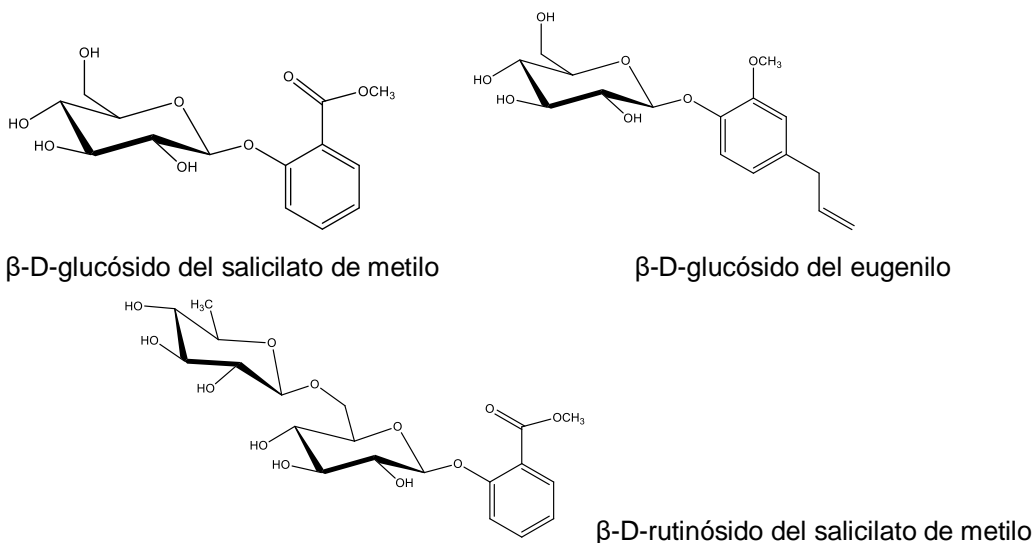


Figura 3: Fenoles glicosidados identificados en la pulpa y la cáscara de *P. ligularis*

En cuanto a las saponinas, la fracción butanólica del extracto acuoso de las hojas de *P. ligularis* permitió aislar e identificar al ligularosido A, una saponina con núcleo lanostano, con dos unidades de azúcar (*N*-acetilglucoamina y glucosa) y la formación de una delta lactona a partir de la ciclación intramolecular de la cadena lateral con el hidroxilo en la posición 22 como se muestra en la Figura 4 (Moreno, 2013).

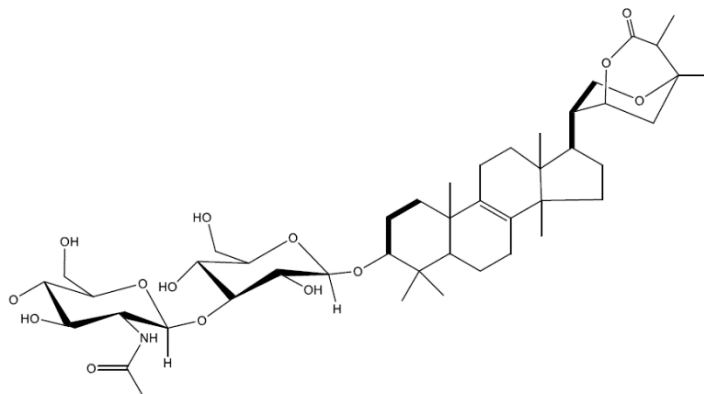


Figura 4: Estructura química de saponina aislada del extracto acuoso de *Passiflora ligularis*

En ese trabajo, en el que se establecieron las metodologías analíticas para la separación de estas saponinas, se logró evidenciar la presencia de otros compuestos similares, lo cual, junto con la actividad farmacológica arriba mencionada, motivó la continuación de los estudios de la composición química y la evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos de esta especie, cuyos resultados se presentan a continuación.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Métodos generales

La cromatografía en capa delgada (CCD) se llevó a cabo sobre cromatofolios de gel de sílice 60 F254 de Merck, reveladas con una lámpara de luz ultravioleta a 254 nm y 365 nm, y posteriormente asperjadas con sulfato cerico amónico al 1% de ácido sulfúrico. Como fase móvil se empleó una mezcla de acetato de etilo / acetona / ácido acético / agua (6:2:1:1) (Birk et al, 2005)

Los análisis por cromatografía en contracorriente de alta velocidad (HSCCC por sus siglas en inglés) se realizaron en un equipo P.C. INC modelo SER #521, acoplado a una bomba L-6000A Merck- Hitachi, recolectando fracciones de 3 mL mediante un colector automático EldexU-200 UFC.

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés) acoplada a DAD (Diode-Array Detection) y LT- ELSD (Low-Temperature Evaporative Light-Scattering Detector) se realizaron en un equipo UHPLC Dionex ultimate 3000. La cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) a escala preparativa se realizó en un equipo MERCK-HITACHI 6000A, equipado con detector por arreglo de diodos DAD L-4500, y una bomba ternaria MERCK-HITACHI L-6200A y un equipo MERCK-HITACHI 6000A con detector UV/Vis L-4250 y una bomba MERCK-HITACHI L-6000A. Para las separaciones cromatográficas analíticas se empleó una columna Thermo® RP-18 (75 mm x 3 i.d; 2,2 µm) trabajando a un flujo de 0,5 mL/min y para la cromatografía preparativa se usaron las siguientes columnas; columna Hibar® LiChrospher RP-18 (250mm x 25 mm i.d; 7µm) trabajando a un flujo de 3.0 mL/min, columna Thermo® RP-18 (250 x 10 mm i.d; 5 µm) trabajando a un flujo de 2.0 mL/min y columna Waters® RP-8 (150 mm x 4,6 i.d; 5 µm) a un flujo de 1 mL/min. Los solventes empleados fueron acetonitrilo y agua grado HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania).

Los espectros de RMN mono- y bidimensionales se registraron en un espectrómetro Bruker Advance 300 (300 MHz para RMN-¹H y 75 MHz para RMN-¹³C) y en un espectrómetro Bruker AV-400 (400MHz para RMN-¹H y RMN-¹³C) empleando como solventes CD₃OD con grado de deuteración 99.8%.

El análisis de masas se realizó en un equipo UHPLC-TOF-MS Ultimate 3000 acoplado a micro-ToF-2Q con una interfase ESI, la adquisición de los datos se hizo de forma positiva y negativa, las condiciones de ESI fueron las siguientes: Para saponinas se trabajó en modo ionización positiva, Set Capillary 3800 V Set Dry Gas 10.0 l/min, Set Nebulizer 2.0 Bar, Set Dry Heater 210 °C y para los flavonoides se trabajó en ionización negativa con las mismas condiciones.

Las rotaciones ópticas fueron medidas en un polarímetro Polartronic E, Sch. Lmidt+Haensch en metanol grado analítico (Merck, Darmstadt, Alemania), el tamaño de la celda fue de 5cm con un volumen de 1mL

2.2.2 Material vegetal y extracción

Las hojas de *P. ligularis* fueron recolectadas en un cultivo comercial en la finca "Villa Leonor" en la vereda "La Florida" del municipio de Anolaima en el Departamento de Cundinamarca. Se recolectaron 7,5 kg de material vegetal fresco. Las hojas (7,5 Kg) se secaron a temperatura ambiente, posteriormente fueron molidas obteniéndose un peso de 1786 g. Posteriormente, fueron extraídas por infusión con agua a 90°C para obtener el extracto acuoso (332,5 g) el cual se sometió a partición con BuOH para obtener 91,4 g de la frcción en BuOH.

2.2.3 Fraccionamiento por cromatografía contracorriente de alta velocidad (HSCCC)

El aislamiento de compuestos a partir de la fracción butanólica de las hojas de *P. ligularis* fue realizado con el uso de HSCCC seguido de la purificación por HPLC. Para determinar los sistemas de solventes para el fraccionamiento se hizo una revisión en la literatura en la que se identificaron 20 sistemas de solventes que usaban entre otros hexano, acetato de etilo, butanol, etanol, metanol, isopropanol y agua en diferentes proporciones (Anexo 1).

Para su aplicación en la separación de compuestos del extracto de *P. ligularis* algunas reglas fueron consideradas. Por ejemplo, la fracción butanólica debía ser soluble y estable en el sistema evaluado, el equilibrio del sistema debe ser corto (<30 s) y el coeficiente de partición (*K*) de los picos de interés debe estar en un rango, usualmente entre 0.5 y 2.0 (Li & Chen, 2007). A cada uno de estos sistemas de solventes se le hizo seguimiento por CCD con las especificaciones dadas con anterioridad y por HPLC utilizando como fase móvil acetonitrilo (A) y agua (B); (0-10 min 10-20% A, 30 min 50% A, 40 min 95% A, 45 min 95% A). Por medio de la cual se evaluaron los coeficientes de partición para los picos de interés. Finalmente, el sistema escogido fue el reportado por Ma et al, 2010, compuesto por cloroformo / metanol / agua (4:4:2).

El equipo de HSCCC se trabajó a 800 rpm, con un flujo de 2 mL/min en modo isocrático, utilizando como fase estacionaria la fase inferior y como fase móvil la fase superior. Se inyectaron aproximadamente 850 mg por inyección hasta separar 3.4 g de extracto y se recogieron 70 fracciones que fueron reagrupadas en 10 fracciones (**F1** a **F10**) de acuerdo a la composición establecida por CCD. De estas fracciones, **F6** (56 mg) corresponde al compuesto **2**

La fracción **F1** presenta por cromatografía en CCD la presencia de flavonoides y saponinas. La fracción **F2** (192 mg) fue posteriormente fraccionada mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una columna RP-18 preparativa Hibar® usando un sistema isocrático MeCN / H₂O (3:7), con un flujo de 3.0 mL/min detectando a 220 nm. De esta manera se obtuvieron: Compuesto **7** (7 mg), el compuesto **6** (26 mg) y el compuesto **5** (6 mg). La fracción **F9** y la fracción **F7** mostraron perfiles cromatográficos idénticos por lo cual ambas fracciones se purificaron mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una columna RP-18 semipreparativa Thermo® usando un sistema en gradiente de acetonitrilo (A) y agua (B) (0-5 min 45% A, 6-25 min 50% A, 26 - 45 min 95%A), logrando la separación del compuesto **1** (12 mg) y el compuesto **8** (3 mg).

Los compuestos minoritarios, fueron obtenidos aplicando una segunda estrategia de purificación basada en el uso de resinas no iónicas (Kakuno et al, 1992; De Marino et al, 1998). De esta forma, 10 g de la fracción butanólica se extrajeron por agitación con la resina Amberlite XAD-2 por agitación con agua durante 2 horas, las proporciones de fracción butanólica / resina / agua 1:10:100. Posteriormente, la resina fue lavada con agua (1L) y luego con metanol (1 L) resultando en las fracciones **X1** (7g) y **X2** (3g), respectivamente. A

partir de 500 mg de la fracción **X2** se realizó un fraccionamiento en columna abierta RP-18 con gradiente discontinuo de MeCN - agua, desde 20% MeCN hasta 100% MeCN, resultando 15 fracciones **XF1** – **XF15**. La fracción **XF10** (14 mg) se purifico por Cromatografía liquida de alta eficiencia en una columna RP-8 Waters® usando un sistema en gradiente de acetonitrilo (A) y agua (B) (0-5min 40%A, 10min 50%A, 15min 70%A) obteniéndose el compuesto **4** (2,5 mg) y el compuesto **3** (3 mg); este último se encontró también en la fracción **XF12** obteniéndose en total 14 mg del compuesto **3**. Igualmente la fracción **XF15** (31 mg) se purifico en las mismas condiciones que **XF 10**, obteniéndose el compuesto **1** (5 mg). Un esquema de aislamiento de los compuestos se muestra en la figura 6

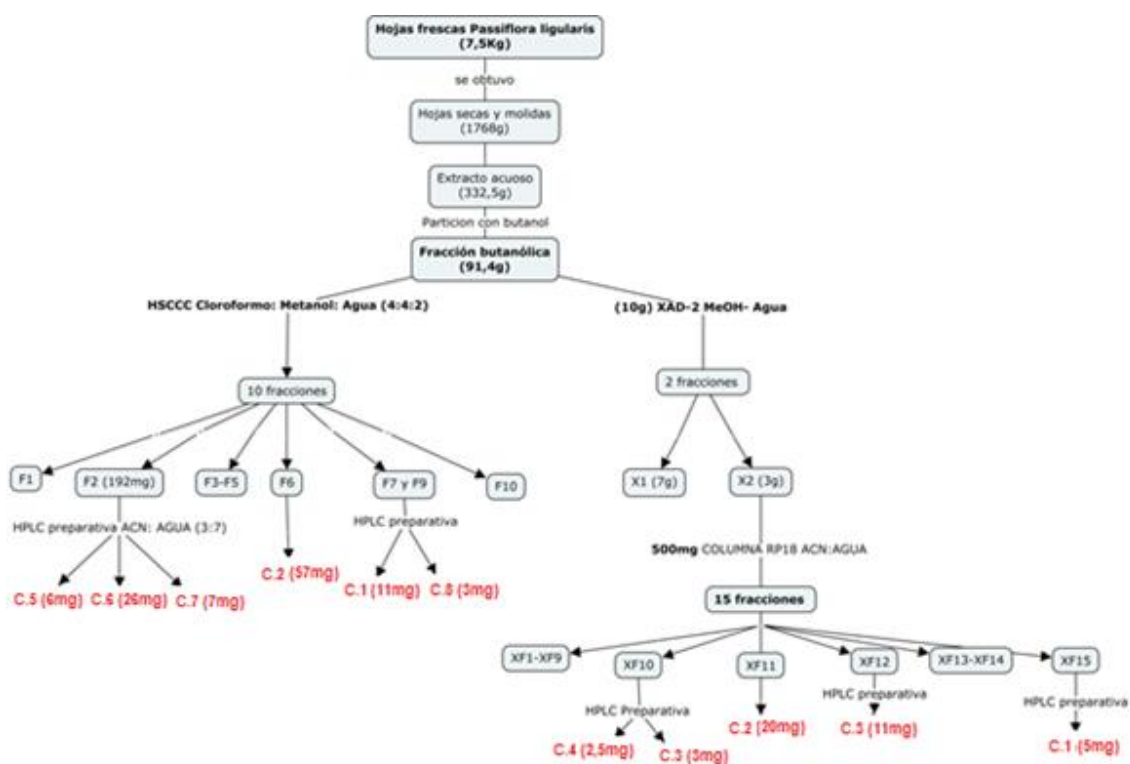


Figura 5: Esquema de aislamiento de los compuestos obtenidos de la fracción butanólica de *P. ligularis*

2.3 Resultados y Discusión

Para la selección del sistema de solventes para el fraccionamiento por HSCCC, se siguió en ambas fases el contenido de saponinas y flavonoides por CCD revelando con sulfato cérico amónico (Birk et al, 2005). Adicionalmente, se evaluaron los coeficientes de partición de los compuestos en el cromatograma de la fase superior y en el de la fase inferior, por medio de HPLC a partir de las áreas bajo la curva de los diferentes picos (Oka, 2005) como se muestra en la Figura 6 y la Tabla 7.

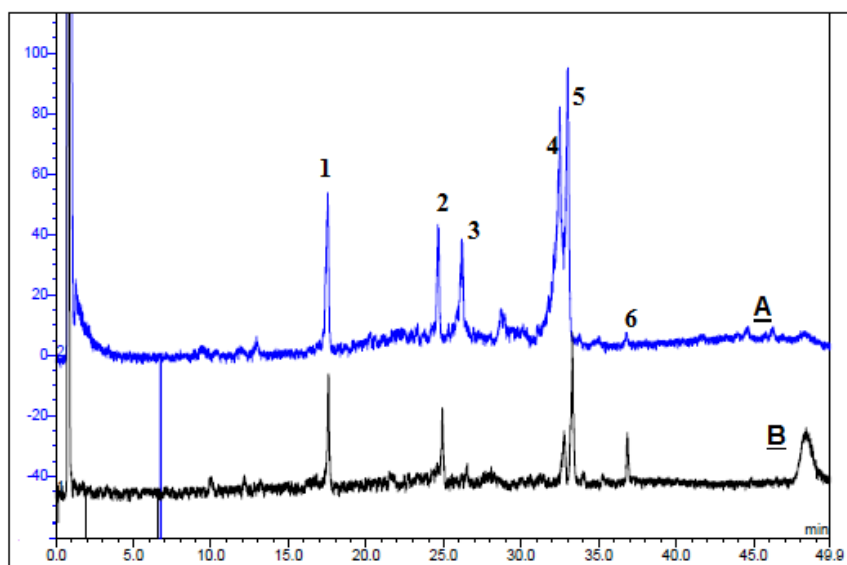


Figura 6: Cromatogramas de HPLC de la fracción butanólica en Cloroformo, metanol, agua (4:4:2), A) Fase superior, B) Fase inferior empleando el sistema de acetonitrilo (A) y agua (B) (0-5 min 45% A, 6-25 min 50% A, 26 - 45 min 95%A)

Tabla 7: Relación de las áreas de los diferentes tiempos de retención observados en el cromatograma de la fase inferior y superior para el sistema de acetonitrilo (A) y agua (B) (0-5 min 45% A, 6-25 min 50% A, 26 - 45 min 95%A).

PICO	TIEMPO DE RETENCION	Fase inferior	Fase superior	K FI/FS	K FS/FI
1	17.515	5.717	11.1791	0.5	2.0
2	24.62	6.3227	6.0658	1.0	1.0
3	26.168	1.3143	5.1569	0.3	3.9
4	32.481	5.1569	14.2052	0.4	2.8
5	32.996	7.7933	15.7702	0.5	2.0
6	36.845	1.9525	1.3268	1.5	0.7

En la tabla 7 se observan los coeficientes obtenidos para el sistema de acetonitrilo (A) y agua (B) (0-5 min 45% A, 6-25 min 50% A, 26 - 45 min 95%A) utilizando como fase estacionaria la fase orgánica y como fase móvil la fase acuosa, y viceversa. Algunos autores recomiendan seleccionar para la separación aquellos sistemas que logren un rango entre $0.5 \leq K \leq 1$ De esta forma un coeficiente de 1 nos permite considerar un sistema ideal para la separación del pico con óptima resolución (Han et al, 2008).

Teniendo en cuenta los resultados del análisis de HPLC para los 2º sistemas evaluados, se seleccionó un sistema para la separación de saponinas previamente reportado por Ma et al en el 2010, con una composición (cloroformo/ metanol / agua) en proporción 4:4:2, en el cual se logró para el pico 2 un coeficiente de partición $K= 1$, para el pico 6 un coeficiente $K = 1.5$ y para los otros compuestos K cercanos a 0,5. Esto indica que existirá mayor afinidad de los compuestos por la fase inferior (fase móvil), haciendo que haya una baja retención de los compuestos de interés en la fase estacionaria (Oka & Ito, 2005).

Luego de establecer las mejores condiciones cromatográficas, se procesaron 3,4 g de la fracción butanólica por inyecciones repetidas en HSCCC, con el sistema mencionado con anterioridad, obteniéndose 70 fracciones reagrupadas en 10 fracciones (**F1 – F10**), teniendo en cuenta la composición detectada por CCD empleando como revelador sulfato cerico amónico tal y como se muestra en la Figura 7. En esta placa se puede detectar la presencia de flavonoides (manchas amarillas) en las fracciones **F1** a **F3** y de saponinas (manchas moradas, Birk et al, 2005) en las fracciones **F4** a **F10**, están enriquecidas en flavonoides y saponinas y posibles saponinas.

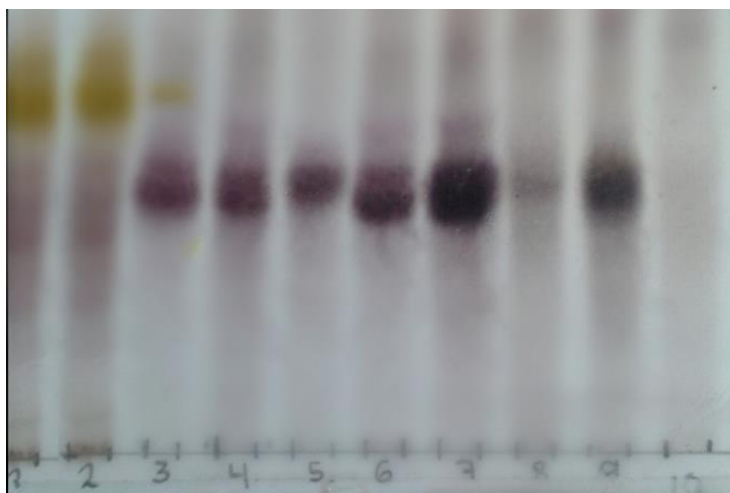


Figura 7: CCD de **F1** a **F10** , Fase móvil: Acetato de etilo: acetona: Ácido acético: agua (6/2/1/1)⁷, Fase estacionaria: Silica, Revelador: Sulfato cérico amónico

A partir de la fracción orgánica del extracto acuoso de las hojas de *P. ligularis* empleando dos estrategias de separación (HSCCC y XAD-2), fue posible obtener 8 compuestos **C.1-C.8** (Figura 5), entre los cuales se encuentran saponinas y flavonoides. Resulta importante mencionar la dificultad de la separación de compuestos de alta polaridad, razón por la cual la investigación fitoquímica generalmente no estudia estas fracciones. El uso tanto de HSCCC como resinas orgánicas, además de otras estrategias, han permitido que en los últimos años, los compuestos polares se puedan aislar para su elucidación estructural. Los compuestos aquí aislados fueron sometidos a análisis por medio de técnicas espectroscópicas (RMN mono y bidimensional) y de espectrometría de masas para la elucidación de sus estructuras.

2.3.1 Elucidación compuesto 1

El compuesto **1** (11 mg) un sólido amarillo con $[\alpha]^{25.9}_{\text{D}} + 29.93^{\circ}$ ($c = 0.025$ MeOH), mostró por ESI-MS en modo positivo un ión pseudomolecular $[M+H]^+$ en m/z 834.5250, para una fórmula molecular $\text{C}_{45}\text{H}_{71}\text{NO}_{13}$ (Calculada m/z 833,4925, error 29 ppm). Adicionalmente, mostró una fragmentación en m/z 631.4372 $[M - 203.088]^+$ (Anexo 2). El espectro de RMN- ^1H medido en CD_3OD (400 MHz, anexo 3), mostró las señales características de saponinas con 8 metilos (δ_{H} 0.76; 0.91; 0.92; 1.02; 1.11; 1.23; 1.43, 1.99); dos señales para hidrógenos de carbonos anoméricos en azúcares δ 4.40 y 4.88. Señales para protones unidos a heteroátomos en δ_{H} 4.60, 3.86, 3.83, 3.82, 3.63, 3.60, 3.58, 3.44, 3.41, 3.20, 3.19, 3.16.

El espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz, anexo 4) del compuesto **1** mostró 4 carbonos olefínicos (δ 135.6, 136.0, 107.7 y 144.0), 13 metilenos y 8 metilos (δ 12.2; 16.5; 16.5; 19.6; 20.4; 24.5; 28.3 y 22.9). También se evidenció una señal en δ_{C} 174 que corresponde al desplazamiento de un carboxilo. Adicionalmente, se observa dos carbonos cuaternarios en δ_{C} 107.6 y 68.3, 2 metinos en δ_{C} 144.0 y 72.3, señales para un metileno en δ_{C} 38.3 y dos metilos en δ_{C} 12.8 y 24.5.

La asignación de las señales de RMN- ^1H a los carbonos detectados en el experimento ^{13}C se realizó por medio de un experimento HSCQ (Anexo 5) y por correlaciones en HMBC con $J = 10$ Hz y 5 Hz (Anexo 6a y 6b) y COSY (Anexo 7). De esta forma se pudo establecer la estructura de la aglicona como núcleo lanostano con insaturaciones entre el C-8 y C-9, así como la presencia de metilos en las posiciones C-18, C-19, C-28, C-29 y C-30, acorde con

la numeración para núcleo lanostano (Emmons et al, 1989; Nakata et al, 2009). Además, por HMBC se logró identificar una *N*-acetilglucosamina unida por el protón anomérico (δ_H 4.88) al carbono 3 de una glucosa (δ_C 76.6) y a su vez la unión de esta glucosa por el carbono anomérico (δ_H 4.40) al carbono 3 de la aglicona (δ_C 91.8) como se muestra en la figura 8.

Para la cadena lateral en COSY se observa la correlación del H-22 (δ_H 4.25) con el H-23 (δ_H 1.91), mientras que en HMBC se observan las correlaciones de los metilos en δ_H 1.49 y 1.23 con el carbono en δ_C 144.0, 107.6 (C-24) y 68.3 (C-25). Adicionalmente, se observó un metino olefinico oxigenado en la posición 31, cuyo protón (δ_H 6.48) mostró una correlación con el carbono de la posición 22 δ_C 72.3, lo que nos indica que forma un ciclo de 6 miembros, estos éteres cíclicos han sido reportados en triterpenos con núcleo hopano y lanostano. Sin embargo, estos ejemplos no presentan insaturaciones (Isaka et al, 2011). Con esta información se proponen en la figura 9 las subestructuras A y B, como posibles estructuras para la cadena lateral del compuesto 1.

Tabla 8: Desplazamientos en RMN 1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) para el compuesto 1 en CD_3OD , δ en ppm.

Carbono	Compuesto 1		Moreno. 2013	
	δ_C	δ_H , mult, integración, J (Hz)	δ_C	δ_H , mult, integración, J (Hz)
1	36.9	1.74, (m), 1H	36.9	1.76, 1H
		1.23, (m), 1H		1.23, 1H
2	27.6	1.72. (d), 1H, 10.1	27.6	1.72, 1H
		2.09, (m), 1H		2.06, 1H
3	91.8	3.19, (m), 1H	91.7	3.21, (d), 1H. 4.27
4	40.5	-	40.6	-
5	52.1	1.15, (m), 1H	52.1	1.08, 1H
6	19.2	1.50, (m), 1H	19.2	1.50, 1H
		1.70, (m), 1H		
7	27.6	1.73, (m), 1H	27.6	1.70, 1H
		1.97, (m), 1H		2.00, 1H
8	135.6	-	135.5	-
9	136	-	136.0	-
10	37.9	-	37.9	-
11	21.9	2.06, (m), 2H	22.0	2.07, 2H
12	31.9	1.70, (m), 2H	31.9	1.70, 2H

13	51.0	-	51.0	
14	45.2	-	45.2	-
15	31.8	1.27, (m), 2H	31.1	1.28, 2H
16	27.0	ND	27.0	
17	43.9	1.80, (m), 1H	43.8	1.78, 1H
18	16.5	0.76, (s), 3H	16.5	0.79, (s), 3H
19	19.7	1.02, (s), 3H	19.7	1.04, (s), 3H
20	30.8	1.28, (m), 2H	30.6	1.29, 2H
21	64.6	3.77, (m), 1H	63.6	3.06, 1H
		3.32, (m), 1H		4.00, (dd), 1H, 4.9, 13.5
22	72.3	4.25 (m). 1H	76.9	4.72 (d). 1H. 4.4
23	38.4	1.91, (m), 1H	38.6	1.85, 1H
		2.00, (m), 1H		2.17, 1H
24	68.3	--	72.0	-
25	107.6	--	43.9	1.77, 1H
26	12.8	1.49, (s), 3H	9.5	1.30 (d), 3H, 2.85
27	24.5	1.23, (s), 3H	26.6	1.22, (s), 3H
28	28.3	1.11, (s), 3H	28.6	1.12, (s), 3H
29	16.7	0.92, (s), 3H	16.7	0.92 (s), 3H
30	24.7	0.91,(s), 3H	24.7	0.93, (s), 3H
31	144.0	6.48, (s), 1H	177.5	-
1´	105.3	4.40, (d), 1H. 7.7	105.3	4.43, (d), 1H, 8.1
2´	79.3	3.60, (m), 1H	79.6	3.61, 1H
3´	76.6	3.44, (d). 1H. 4.39	79.3	3.47, (m), 1H
4´	71.9	3.30, (m). 1H	72.9	3.15, (m), 1H
5´	78.4	3.25, (m). 1H	71.9	3.26, (m), 1H
6´	62.8	3.82, (m). 1H		3.59, (m), 1H
		3.83, (m). 1H	63.6	3.87, (m), 1H
1´´	102.0	4.88, (d), 1H. 8.0	102	4.9, (d), 1H, 10.3
2´´	58.1	3.63, (d), 1H. 8.24	58.1	3.61, 1H
3´´	79.2	3.41, (m), 1H	76.7	3.44, 1H
4´´	72.8	3.16, (m), 1H	78.3	3.27,1H
5´´	77.0	3.27, (m), 1H	77.7	3.25, (d), 1H, 4.66
6´´	63.6	3.58, (d), 1H, 5.1	62.8	3.85, (m), 1H
		3.86, (m), 1H		3.64, (m), 1H
COMe	174.0	-	174.0	-
COMe	23.0	1.99, (s), 3H	23.0	2.01, (s), 3H

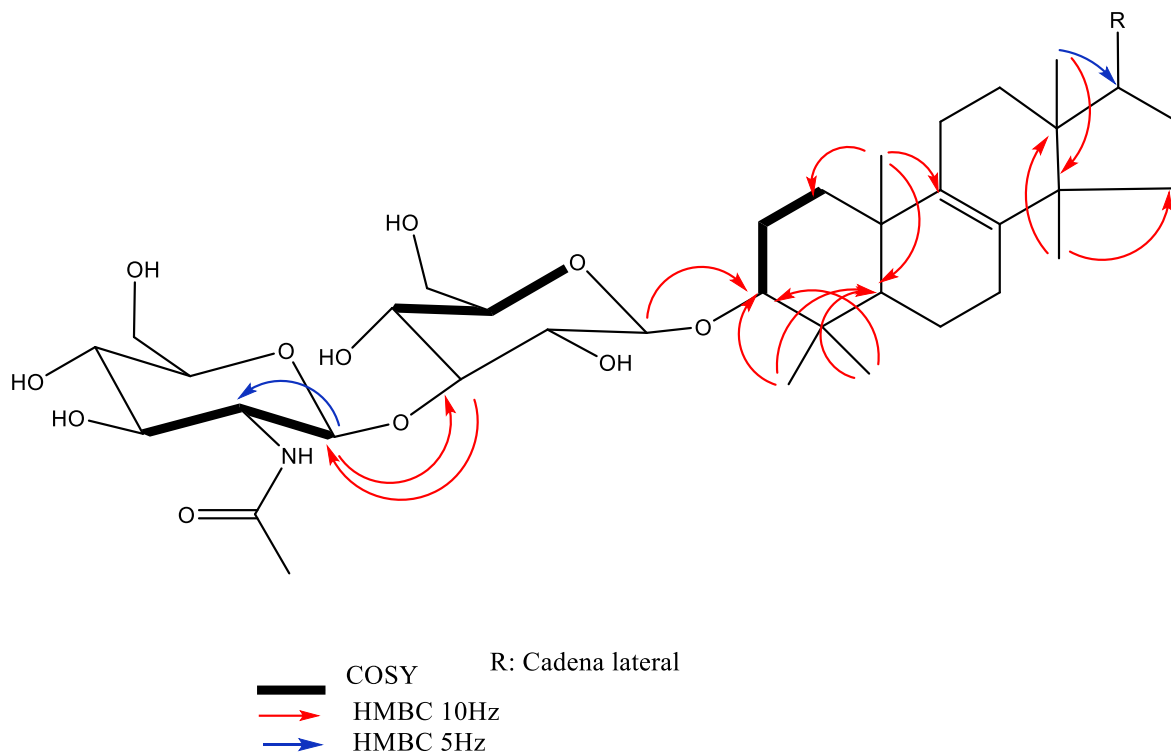


Figura 8: Principales correlaciones encontradas para los azúcares y el núcleo de la aglicona en el compuesto **1**

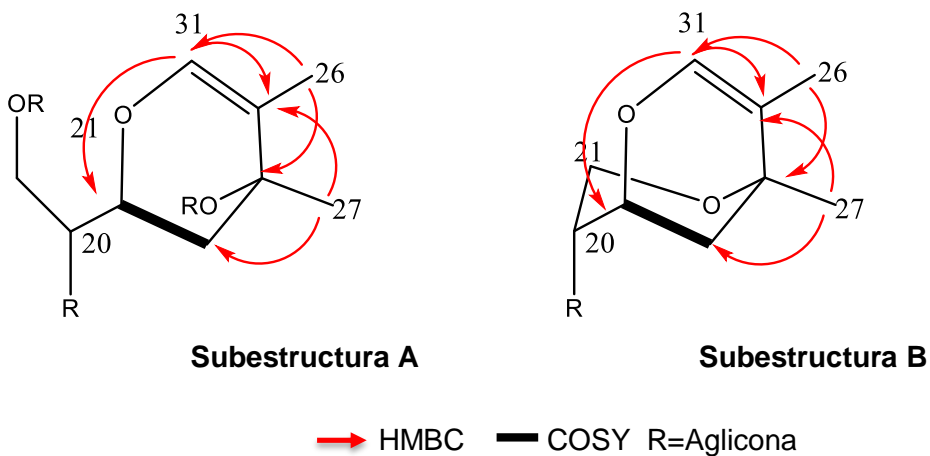


Figura 9: Posibles subestructuras encontradas para la cadena lateral del compuesto **1**

Teniendo en cuenta la masa obtenida de 833.5250 y que en la posición 24 se encuentra un carbono cuaternario enlazado a un oxígeno (δ_c 68.3) se propone la formación de un piranosido en la cadena lateral entre C-21 y C-24, como se presenta en la subestructura B. De otro lado, el epsetro de masas mostró un ion en m/z 631.4333 correspondiente a la pérdida de la subunidad de N-acetilglucosamina.

En cuanto a la estereoquímica del compuesto **1**, se tomaron espectros NOESY (Anexo 8) por medio del cual se pudo observar la correlación en el espacio del proton del C-3 (δ_H 3.19) que esta en posición α correlaciona con los protones del metilo ecuatorial del C- 28 (δ_H 1.10), el cual a su vez correlaciona espacialmente con un proton del C-2 (δ_H 1.72) y con un protón del C-6 (δ_H 1.70 α), este último correlaciona también con los protones del metilo del C-30 (δ_H 0.94) en posición axial, el cual correlaciona con el proton del C-17 (δ_H 2.08). De otra parte se encuentra correlación de los protones del metilo C-29 (δ_H 0.91) con el protón del C-6 (δ_H 1.50) en posición β el cual correlaciona con los protones del metilo en C-18 (δ_H 0.82) y este con los protones del metilo C-19 (δ_H 1.03), las anteriores correlaciones permiten proponer la configuración del núcleo lanostano como se muestra en la figura 10.

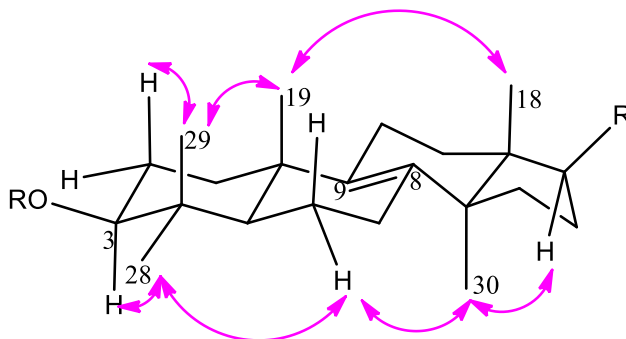


Figura 10: Correlaciones NOESY encontradas para el compuesto **1**

Sin embargo, los resultados de correlaciones NOESY para los protones de la cadena lateral fueron poco concluyentes y no dejaron evidenciar las correlaciones esperadas para poder establecer la configuración relativa del carbono 20, 22 y 24. A pesar de la falta de esta información, la comparación de los desplazamientos químicos del compuesto **1** con otros núcleos de lanostanos (IUPAC-IUB, 1989; Wang et al, 2014, Afiyatulloev et al, 2007), nos permiten concluir que la estereoquímica de la aglicona, así como la estereoquímica relativa de los azúcares es la que se presenta en la figura 11. De esta forma se propone la estructura plana del compuesto **1** denominado ligularósido B, como se muestra en la Figura 11, de acuerdo a la revisión en bases de datos especializadas Scifinder® y Chemspider®, este compuesto no ha sido previamente aislado de fuentes naturales.

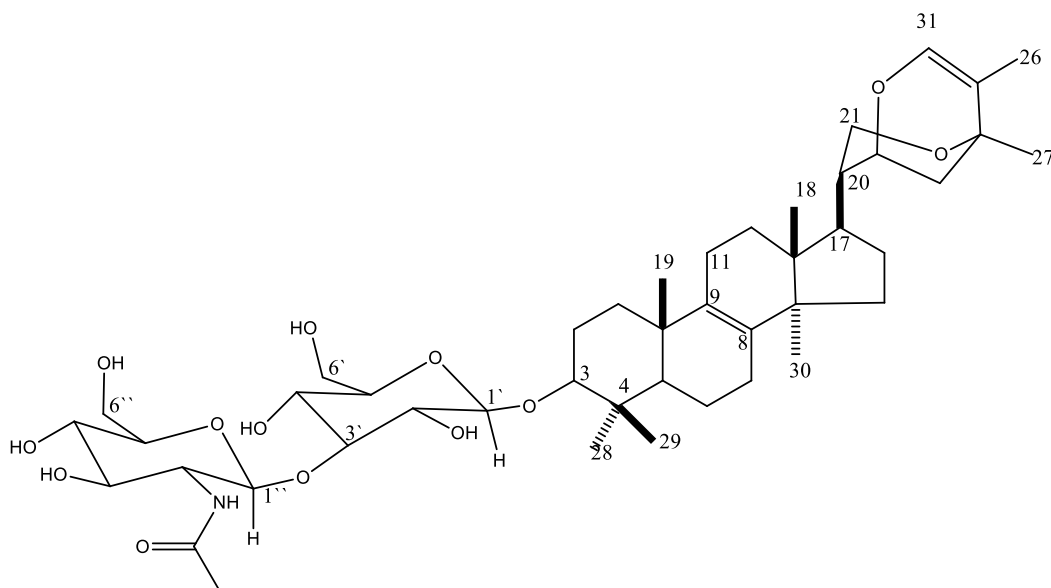


Figura 11: Estructura propuesta para el compuesto **1** (ligularosido B)

2.3.2 Elucidación compuesto 2

El compuesto **2** (57 mg), un sólido amarillo con $[\alpha]_D^{25} + 23.51^\circ$ ($c = 0.1$ MeOH), mostró por ESI-MS en modo positivo un ión pseudomolecular $[M+H]^+$ en m/z 850.5258, para una fórmula molecular $C_{41}H_{71}NO_{14}$ (Calculada para 849.4875, error 36 ppm) (Anexo 9). Adicionalmente, se observaron fragmentaciones en m/z 647.4359 [$M - 203.0899$], m/z 425.7685 [647.4359 – 221.6674]. El espectro de RMN- 1H (CD_3OD , 400 MHz, anexo 10) muestra 8 señales para metilos con desplazamientos δ_H 0.82; 0.91; 0.94; 1.03; 1.11; 1.85; 1.98; 1.99; dos señales para hidrógenos de carbonos anoméricos en azúcares δ_H 4.40 (1H, d, $J = 7.8$ Hz) y 4.88 (1H, d, $J = 8.0$ Hz). También se identificaron señales para protones unidos a heteroátomos en δ_H 3.16; 3.41; 3.19; 3.44; 3.60; 3.63, 3.58; 3.82; 3.83 y 3.86, además de señales para metilenos alifáticos.

El espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz, Anexo 11) del compuesto **2** mostró dos carboxilos de éster (δ_C 174 y 170), cuatro carbonos olefínicos (δ_C 153.9, 136.0, 135.5, y 121.8), 15 metinos (δ_C 105.3, 102.0, 91.8, 79.7, 79.3, 79.2, 78.4, 77.0, 76.6, 72.8, 71.9, 58.1, 52.1, 43.9, 30.7) 12 metilenos (δ_C 63.6, 62.8, 61.4, 36.7, 35.5, 32.0, 31.6, 27.6, 27.6, 27.0, 22.0, 19.2) junto con 8 metilos (δ 12,2; 16,5; 16,5; 19,6; 20,4; 24,5; 28,0 y 22,9). Las señales observadas para el compuesto **2** son similares a las de saponinas glicosidadas, la cual según sus desplazamientos químicos corresponden a un núcleo lanostano y a dos

unidades de azúcar, similares al ligularosido A, obtenido previamente en nuestro grupo a partir de *P. ligularis* (Moreno, 2013). Sin embargo, al comparar los datos, se observan diferencias en los desplazamientos de la cadena lateral, como se presenta en la tabla 9. La asignación de las señales de RMN-¹H a los carbonos detectados en el ¹³C se realizó por medio del experimento HSQC (Anexo 12), la conectividad entre los fragmentos asignados por estos experimentos se realizaron por medio de experimentos COSY H-H (Anexo 13), TOCSY (Anexo 14) y HMBC (Anexo 15A y 15B) medido con $J = 10$ Hz y $J = 5$ Hz. Estos experimentos permitieron establecer la conectividad entre C-3' y C-1'' de la glucosa y la *N*-acetilglucosamina, respectivamente. Asimismo, se estableció la conectividad de estos azúcares a la aglicona por el C-3 (Figura 12). Es importante mencionar que la asignación de las señales de carbono y proton de las dos unidades de azúcar fueron revisadas respecto a lo reportado por Moreno, 2013, por medio del análisis cuidadoso del experimento TOCSY.

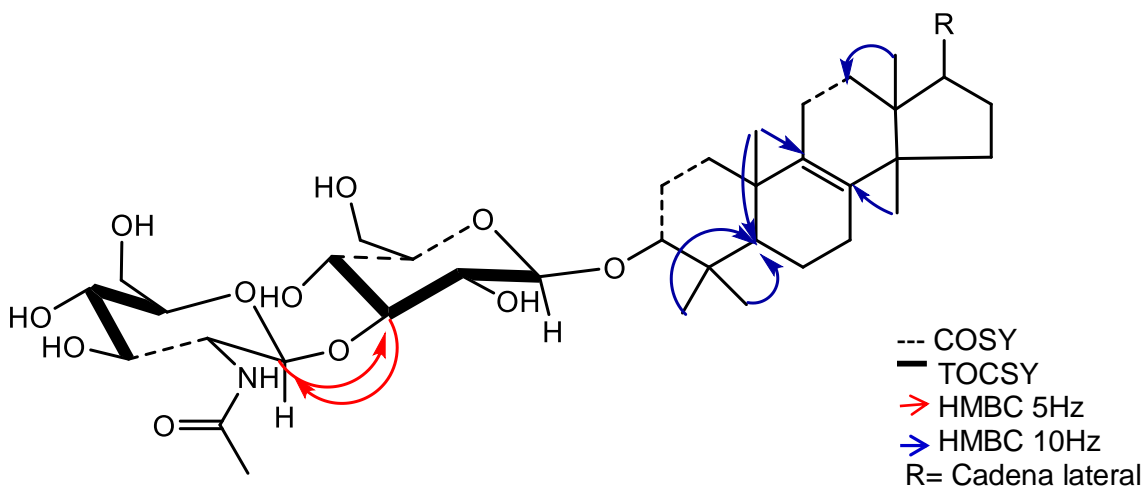


Figura 12: Principales correlaciones para los azúcares y el núcleo de la aglicona en el compuesto **2**

La elucidación de la cadena lateral se hizo con base en las correlaciones observadas en HMBC (Figura 13) lo cual permitió ubicar las dos oxigenaciones en C-21 (δ_c 61.4) y C-22 (δ_c 79.7), un doble enlace entre C-24 y C-25 (δ_c 153.9 y 121.8), dos metilos en C-26 (δ_c 20.4) y C-27 (δ_c 12.2) y un carboxilo en C-31 (δ_c 170.0). Es importante resaltar la presencia de una insaturación entre los C-24 y C-25, que es común para saponinas triterpenoidales

tetracíclicas de núcleo lanostano (Emmons et al, 1989; Nakata et al, 2009), pero que no se había evidenciado en lo reportado para esta especie.

Tabla 9: Desplazamientos en RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) para el compuesto **2** en CD_3OD , δ en ppm.

Posición	Compuesto 2		Moreno. 2013	
	δC	δH , mult, Integración, J (Hz)	δC	δH , mult, Integración, J (Hz)
1	36.7	1.76, (m), 1H.	36.9	1.76, 1H
		1.20, (m).1H		1.23, 1H
2	27.6	1.72, (m), 1H. 3.0	27.6	1.72, 1H
		2.06, (d), 1H, 13.7		2.06, 1H
3	91.8	3.19, (m), 1H)	91.7	3.21, (d), 1H. 4.27
4	40.6	-	40.6	-
5	52.1	1.10, (d), 1H, 2.8	52.1	1.08, 1H
6	19.2	1.70, (d), 1H, 3.0	19.2	1.50, 1H
		1.57, (m), 1H		
7	27.6	1.72, (m), 1H	27.6	1.70, 1H
		2.01, (m), 1H		2.00, 1H
8	135.5	-	135.5	-
9	136.0	-	136.0	-
10	37.9	-	37.9	-
11	22.0	2.09, (m), 2H	22.0	2.07, 2H
12	31.6	1.69, (m), 1H	31.9	1.70, 2H
13	51.0	-	51.0	-
14	45.2	-	45.2	-
15	32.0	1.27, (m), 2H	31.1	1.28, 2H
16	27.0	ND	27.0	
17	43.9	2.08, (m), (1H)	43.8	1.78, 1H
18	16.5	0.82, (s), 3H	16.5	0.79, (s), 3H
19	19.6	1.03, (s), 3H	19.7	1.04, (s), 3H
20	30.7	1.29, (m), 2H	30.6	1.29, 2H
21	61.4	3.70, (m), 1H. 4.0	63.6	3.06, 1H
		3.60, (d), 1H. 2.8		4.00, (dd), 1H, 4.9, 13.5
22	79.7	4.60, (d), 1H, 14.8	76.9	4.72 (d). 1H. 4.4
23	35.5	2.20, (m), 1H	38.6	1.85, 1H
		2.97, (t), 1H, 15.3, 15.3		2.17, 1H
24	153.9	-	72	-

25	121.8	-	43.9	1.77, 1H
26	20.4	1.98, (s), 3H	9.5	1.30 (d), 3H, 2.85
27	12.2	1.85, (s), 3H	26.6	1.22, (s), 3H
28	28.4	1.10, (s), 3H	28.6	1.12, (s), 3H
29	16.5	0.91, (s), 3H	16.7	0.92 (s), 3H
30	24.5	0.94, (s), 3H	24.7	0.93, (s), 3H
31	170.0	-	177.5	-
1'	105.3	4.40, (d), 7.8Hz	105.3	4.43, (d), 1H, 8.1
2'	79.3	3.60, (m), 1H	79.6	3.61, 1H
3'	76.6	3.44, (m), 1H	79.3	3.47, (m), 1H
4'	71.9	3.30, (m), 1H	72.9	3.15, (m), 1H
5'	78.4	3.25, (m), 1H	71.9	3.26, (m), 1H
6'	62.8	3.67. (m). 1H	63.6	3.59, (m), 1H
		3.86. (m). 1H		3.87, (m), 1H
1''	102.0	4.91, (d), 1H, 8.01	102	4.9, (d), 1H, 10.3
2''	58.1	3.63, (m), 1H	58.1	3.61, 1H
3''	79.2	3.41, (m), 1H	76.7	3.44, 1H
4''	72.8	3.16, (m), 1H	78.3	3.27, 1H
5''	77.0	3.27, (m), 1H	77.7	3.25, (d), 1H, 4.66
6''	63.6	3.66, (d), 1H, 4.78	62.8	3.85, (m), 1H
		3.87, (d), 1H, 6.61		3.64, (m), 1H
<u>COMe</u>	174.0	-	174	-
COMe	23.0	1.99, (s), 3H	23.0	2.01, (s), 3H

Teniendo en cuenta las correlaciones en HMBC observadas para los carbonos de la cadena lateral, se pueden proponer 2 subestructuras iniciales (figura 13).

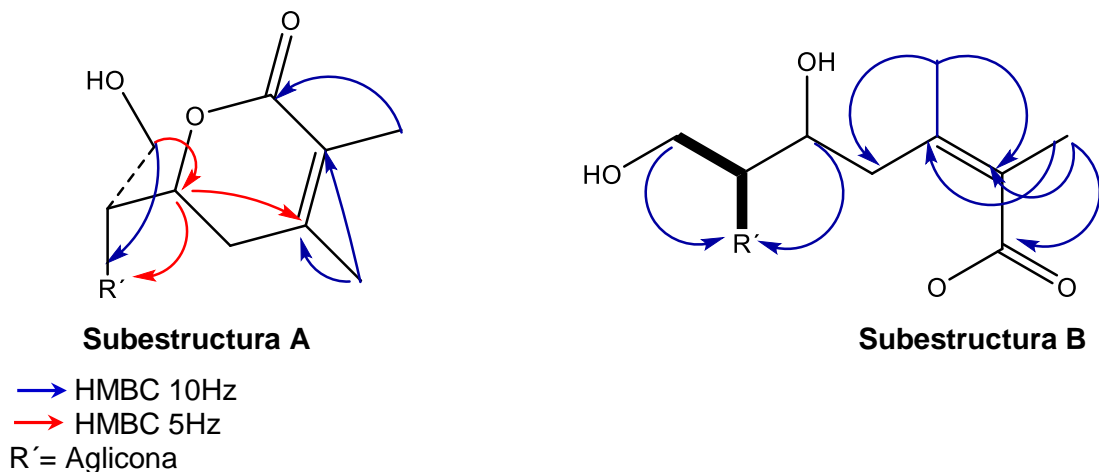


Figura 13: Posibles subestructuras encontradas para la cadena lateral del compuesto 2

El desplazamiento en δ_c 170 así como la del carbono 22 en δ_c 79.7 sugiere la presencia de una δ lactona. Adicionalmente, si tenemos en cuenta el ión en m/z 849.5258 observados en el espectro de masas, nos confirma la subestructura de la figura 13A en la cual se forma la lactona. Saponinas con γ -lactonas se han encontrado en hongos género *Ganoderma* (Andrade et al; Qiao et al, 2007). De esta forma se propone la estructura plana del compuesto **2** como se muestra en la figura 15, el cual se denominó ligularosido C, el cual no mostró coincidencias en las bases de datos especializadas Scifinder y Chemspider.

Para la estereoquímica relativa de la aglicona del compuesto **2**, se compararon desplazamientos de esta y los del compuesto **1** resultando bastante similares, lo que indica que los azúcares y el núcleo tetracíclico de la aglicona comparten la misma configuración descrita para el compuesto 1. Adicionalmente, se compararon las correlaciones del espectro NOESY (Anexo 16) encontrando, además de las correlaciones descritas para el compuesto 1, una nueva correlación de los protones del metilo C-18 y los protones del metileno del C-21 (δ_H 3.60, 3.70) perteneciente a la cadena lateral. Esto evidenció que la cadena lateral está en β respecto al núcleo tetracíclico (Figura 14). Sin embargo, la ausencia de otras correlaciones de los demás protones de la cadena lateral no nos permite establecer la configuración relativa del carbono 20 y 22

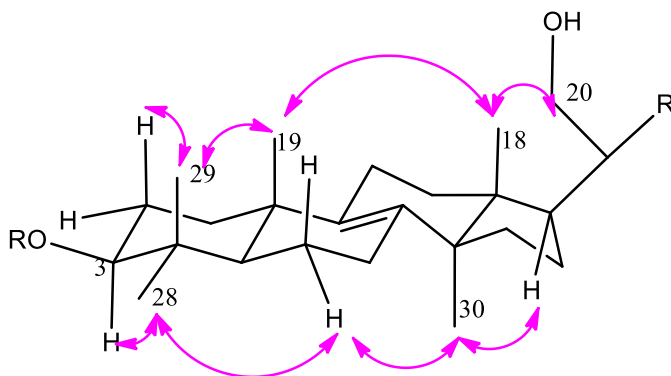


Figura 14: Correlaciones NOESY encontradas para el compuesto **2**

De esta forma se plantea la estructura del compuesto **2** como se observa en la figura 15

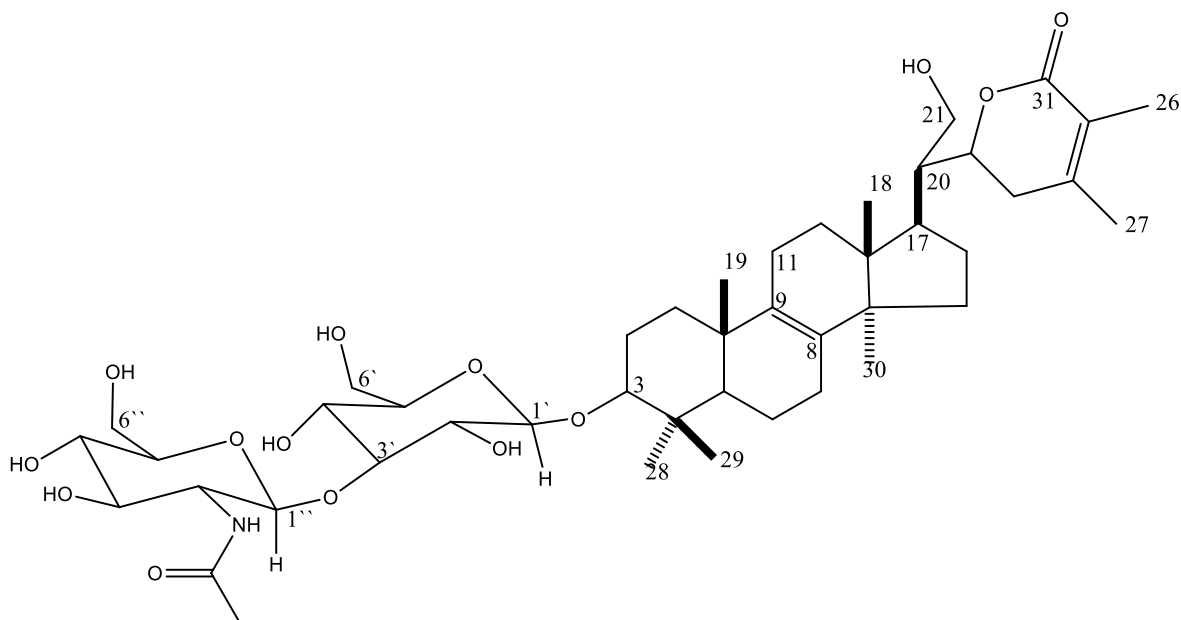


Figura 15: Estructura planteada para el compuesto **2** (ligularosido C)

2.3.3 Elucidación compuesto 3

El compuesto **3** (14 mg) un sólido amarillo con $[\alpha]^{25.9}_D + 28.40^\circ$ ($c = 0.025$ MeOH) fue identificado por ESI-IT-MS con un ión pseudomolecular $[M+Na]^+$ m/z 872.3808 (Anexo 17). En el espectro de RMN-H (Anexo 18) se observaron señales para ocho metilos en δ_H 0,78; 0,90; 0,91; 1,02; 1,10; 1,20; 1,29; 1,99; dos señales para metinos en δ_H 4,40 y 4,89, características para hidrógenos de carbonos anoméricos en azúcares. Señales para protones unidos a heteroátomos en δ_H 4,72, 3,86, 3,83, 3,82, 3,63, 3,60, 3,58, 3,44, 3,41, 3,20, 3,19, 3,16.

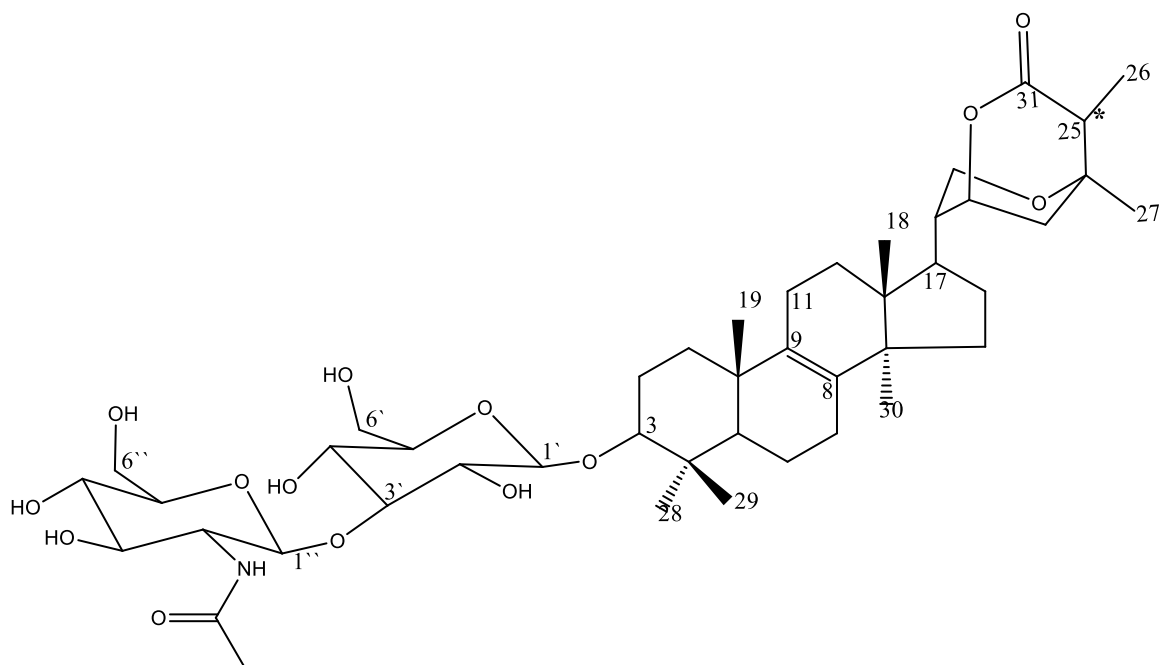
El espectro de RMN ^{13}C (Anexo 19) mostró señales para ocho metilos (δ_C 9.4, 16.5, 16.7, 19.7, 23.0, 24.7; 28.3; 28.4), 2 carbonos olefínicos (δ_C 135.4 y 136.1), además de dos carbonos carboxílicos en δ_C 174.0 y 177.1. Al comparar los datos con la aglicona de los ligularosidos A, B y C el compuesto **3** también posee un núcleo lanostano que presenta una insaturación entre los carbonos 8 y 9, así como la glicosidación por el carbono 3 de la aglicona por una subunidad de glucosa sustituida en la posición 3' con una *N*-acetilglucosamina. Sin embargo, se observaron diferencias en la cadena lateral del compuesto **3**, particularmente en los desplazamientos de los carbonos 25 y 27 (δ_C 44.5 y 28.3, respectivamente), así como en el desplazamiento del protón del carbono 25 en δ_H

2.56. Al observar las correlaciones en HSQC (Anexo 20), HMBC (Anexo 21) y COSY (Anexo 22) se plantea la misma estructura plana del ligularosido A (Moreno 2013), sugiriendo que el compuesto **3** podría ser el epímero en el C-25 del ligularósido A. Al igual que el compuesto 1 y 2, los desplazamientos de los carbonos y los hidrógenos de la aglicona son similares por lo que se plantea la misma configuración para los azúcares y la aglicona del compuesto **3** (Figura 16). Sin embargo, al igual que con los otros compuestos descritos, se requieren datos de los experimentos NOESY o ROESY para poder establecer la configuración de los carbonos 20, 22, 24 y 25 de la cadena lateral.

Tabla 10: Desplazamientos en RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) para el compuesto **3** en CD_3OD , δ en ppm.

Posición	Compuesto 3		Moreno. 2013	
	δC	δH , mult., Integración, J (Hz)	δC	δH , mult., Integración, J (Hz)
1	36.7	1.76, (m), 1H. 1.24, (m), 1H	36.9	1.76, 1H
				1.23, 1H
2	27.6	1.72, (m), 1H, 3.0 2.06, (m), 1H	27.6	1.72, 1H
				2.06, 1H
3	91.8	3.19, (m), 1H	91.7	3.21, (d), 1H. 4.27
4	40.6	-	40.6	-
5	52.1	1.10, (m), 1H	52.1	1.08, 1H
6	19.2	1.70, (d), 1H. 3.0 1.57, (m), 1H	19.2	1.50, 1H
7	27.6	1.72, (m), 1H 2.01, (m), 1H	27.6	1.70, 1H
				2.00, 1H
8	135.5	-	135.5	-
9	136.0	-	136.0	-
10	37.9	-	37.9	-
11	22.0	2.09, (m), 2H	22.0	2.07, 2H
12	31.6	1.69, (m), 1H	31.9	1.70, 2H
13	51.0	-	51.0	-
14	45.2	-	45.2	-
15	32.0	1.28, (m), 2H	31.1	1.28, 2H
16	27.0	ND	27.0	

17	43.9	1.81, (d), 1H, 3.9	43.8	1.78, 1H
18	16.6	0.78, (s), 3H	16.5	0.79, (s), 3H
19	19.7	1.02, (s), 3H	19.7	1.04, (s), 3H
20	30.8	1.30, (m), 1H	30.6	1.29, 2H
		3.06 (d), 1H, 2.7		3.06, 1H
21	63.6	4.00, (d), 1H, 4.0	63.6	4.00, (dd), 1H, 4.9, 13.5
22	76.9	4.72, (m), 1H	76.9	4.72 (d). 1H. 4.4
		1.88, (m), 1H		1.85, 1H
23	38.4	2.2, (d), 1H, 5.1	38.6	2.17, 1H
24	71.9	-	72.0	-
25	44.6	2.56 (q), 1H, 7,2	43.9	1.77, 1H
26	9.40	1.29, (m), 3H	9.50	1.30 (d), 3H, 2.85
27	28.3	1.19, (s), 3H	26.6	1.22, (s), 3H
28	28.4	1.10, (s), 3H	28.6	1.12, (s), 3H
29	16.5	0.90, (s), 3H	16.7	0.92 (s), 3H
30	24.6	0.91,(s), 3H	24.7	0.93, (s), 3H
31	177.1	-	177.5	-
1'	105.3	4.40, (d), 7.8	105.3	4.43, (d), 1H, 8.1
2'	79.3	3.60, (m), 1H	79.6	3.61, 1H
3'	76.6	3.44, (m), 1H	79.3	3.47, (m), 1H
4'	71.9	3.30, (m), 1H	72.9	3.15, (m), 1H
5'	78.4	3.25, (m), 1H	71.9	3.26, (m), 1H
		3.67, (m), 1H		3.59, (m), 1H
6'	62.8	3.83, (m), 1H	63.6	3.87, (m), 1H
1''	102.0	4.91, (d), 1H, 8.1	102.0	4.9, (d), 1H, 10.3
2''	58.1	3.63, (m), 1H	58.1	3.61, 1H
3''	79.2	3.41, (m), 1H	76.7	3.44, 1H
4''	72.8	3.16, (m), 1H	78.3	3.27,1H
5''	77.0	3.27, (m), 1H	77.7	3.25, (d), 1H, 4.66
		3.58, (d), 1H, 4.78		3.85, (m), 1H
6''	63.6	3.86, (d), 1H, 6.61	62.8	3.64, (m), 1H
COMe	174.0	-	174	-
COMe	23.0	1.99, (s), 3H	23.0	2.01, (s), 3H



* Posición donde probablemente se encuentra el epímero

Figura 16: Estructura propuesta para el compuesto **3** (ligularósido D)

2.3.4 Elucidación compuesto 4

El compuesto **4** (2.5 mg), un sólido amarillo con $[\alpha]^{25.9}_D + 22.13^\circ$ ($c = 0.1$ MeOH) mostró por ESI-ITMS con un ión pseudomolecular m/z $[M+Na+H]^+$ 873.3437 (Anexo 23) en el espectro de RMN- 1H medido en CD_3OD (400MHz, anexo 24, Tabla 11) muestra 8 señales para metilos con desplazamientos δ 0.75; 0.90; 0.91; 1.02; 1.11; 1.98; 1.99; dos señales para hidrógenos de carbonos anoméricos en azúcares δ 4.40 y 4.88. También se identificaron señales para protones unidos a heteroátomos δ 3.86, 3.83, 3.82, 3.60, 3.58, 3.44, 3.41, 3.19, 3.16. Los datos reportados para el compuesto **4** (RMN- 1H) coinciden con los reportados para el ligularósido A, (Moreno, 2013), salvo la corrección de la asignación de las subunidades de los azúcares descrita en el compuesto 2. Otra contribución a la elucidación estructural del ligularosido A es el plantear, por comparación con los datos de los compuestos **1** a **3**, la configuración relativa de las dos sub unidades de azúcar y el núcleo de la aglicona, tal y como se presenta en la Figura 17.

Tabla 11: Desplazamientos en RMN 1H (400 MHz) para el compuesto **4** en CD₃OD, δ en ppm.

Posición	Compuesto 4	Moreno. 2013	
	δ H, mult., Integración, J (Hz)	δ C	δ H, mult., Integración, J (Hz)
1	1.76, (m), 1H.	36.9	1.76, 1H
	1.23, (m), 1H		1.23, 1H
2	1.72, (m), 1H, 3.0	27.6	1.72, 1H
	2.06, (m), 1H		2.06, 1H
3	3.21, (m), 1H	91.7	3.21, (d), 1H. 4.27
4	-	40.6	-
5	1.11, (m), 1H	52.1	1.08, 1H
6	1.57, (m), 1H	19.2	1.50, 1H
7	1.72, (m), 1H	27.6	1.70, 1H
	2.01, (m), 1H		2.00, 1H
8	-	135.5	-
9	-	136	-
10	-	37.9	-
11	2.09, (m), 2H	22	2.07, 2H
12	1.70, (m), 1H	31.9	1.70, 2H
13	-	51	-
14	-	45.2	-
15	1.27, (m), 2H	31.1	1.28, 2H
16	ND	27	
17	1.80, (m), (1H)	43.8	1.78, 1H
18	0.78, (s), 3H	16.5	0.79, (s), 3H
19	1.02, (s), 3H	19.7	1.04, (s), 3H
20	1.29, 2H	30.6	1.29, 2H
21	3.06, (m), 1H	63.6	3.06, 1H
	3.99, (m), 1H		4.00, (dd), 1H, 4.9, 13.5
22	4.72, (d), 1H, 4.5	76.9	4.72 (d). 1H. 4.4
23	1.87, (m), 1H	38.6	1.85, 1H
	2.20, (m), 1H		2.17, 1H
24	-	72	-
25	1.80, (m), 1H	43.9	1.77, 1H
26	1.28, (m), 3H	9.5	1.30 (d), 3H, 2.85
27	1.20, (s), 3H	26.6	1.22, (s), 3H
28	1.10, (s), 3H	28.6	1.12, (s), 3H
29	0.90, (s), 3H	16.7	0.92 (s), 3H

30	0.91, (s), 3H	24.7	0.93, (s), 3H
31	--	177.5	-
1'	4.41, (d), 1H, 7.8	105.3	4.43, (d), 1H, 8.1
2'	3.60, (m), 1H	79.6	3.61, 1H
3'	3.44, (m), 1H	79.3	3.47, (m), 1H
4'	3.30, (m), 1H	72.9	3.15, (m), 1H
5'	3.25, (m), 1H	71.9	3.26, (m), 1H
6'	3.82, (m), 1H	63.6	3.59, (m), 1H
	3.83, (m), 1H		3.87, (m), 1H
1''	4.91, (d), 1H, 8.01	102	4.9, (d), 1H, 10.3
2''	3.63, (m), 1H	58.1	3.61, 1H
3''	3.41, (m), 1H	76.7	3.44, 1H
4''	3.16, (m), 1H	78.3	3.27, 1H
5''	3.27, (m), 1H	77.7	3.25, (d), 1H, 4.66
6''	3.86, (d), 1H, 6.6	62.8	3.85, (m), 1H
	3.58, (m), 1H		3.64, (m), 1H
COMe	-	174	-
COMe	2.00, (s), 3H	23	2.01, (s), 3H

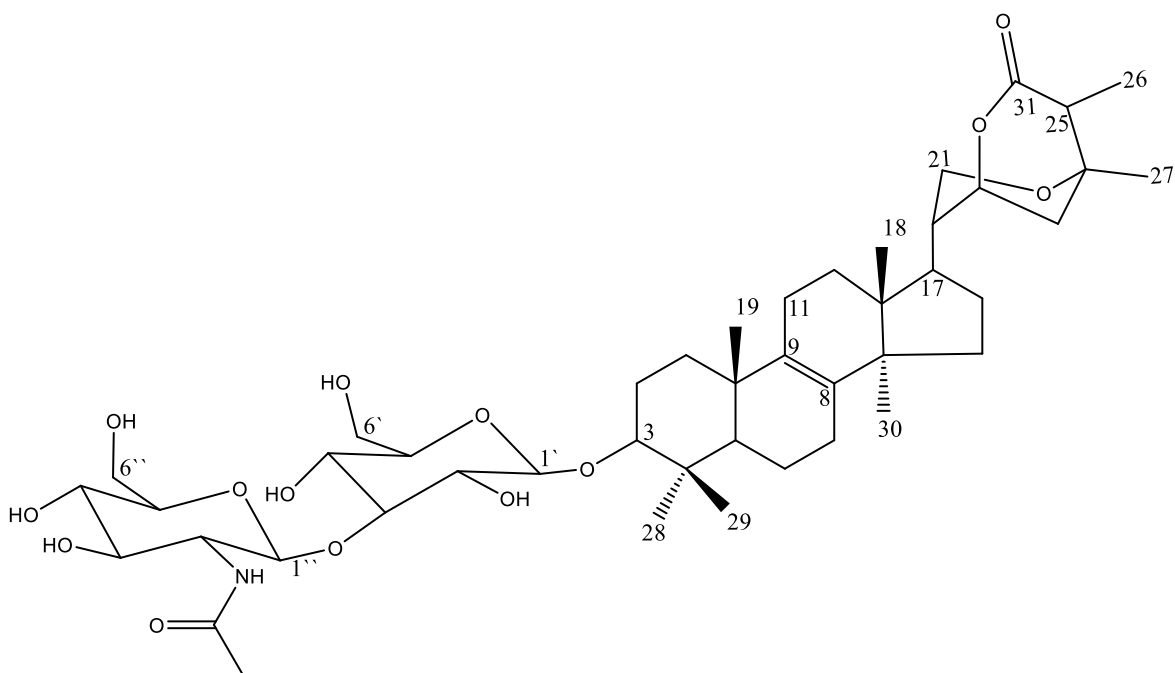


Figura 17: Estructura del compuesto 4 (ligularosido A)

2.3.5 Elucidación del compuesto 5

El compuesto **5** (6 mg) un sólido amarillo con $[\alpha]^{24.4}_D -22.58^\circ$ ($c = 0.05$ MeOH) mostró en el espectro de RMN- 1H (CD_3OD , 300 MHz, Anexo 25) señales características para los cuatro protones de un anillo aromático *p*-disustituido (δ_H 8.07, 2H, d, $J = 8.7$ Hz.), 6.91 (2H, d, $J = 8.7$ Hz). Se observan señales para un anillo tetrasustituido con protones en meta (δ_H 6.21, 1H, s y 6.40, 1H, s), que sugieren la estructura de un flavonide. Adicionalmente, se presentan señales para un azúcar, con un protón anomérico en δ_H 5.24 (1H, d, $J = 7.4$ Hz) y señales entre δ_H 3.2 - 3.7 ppm correspondientes a los protones carbinólicos, indicando que el compuesto **5** presenta una mono glicosilación.

En el espectro de APT (CD_3OD , 300 MHz, Anexo 26) se observaron señales de carbonos sp^2 en δ_C 162.8, 159.5, 160.8, 158.4, 135.4 132.2 (X2), 122.8, 116.1 (X2), 100.1, 95.0. Se observó también un carbono anomérico en δ_C 104.1 que sugiere un enlace O-glicósido, ya que los enlaces C-glicósido saldrían a campo más alto, alrededor de 70 – 80 ppm (Rayyan et al, 2005) y 5 señales de la unidad de azúcar en δ_C 75.7, 78.3 71.2, 78.14, y 62.5, confirmando la monoglicosidación del compuesto **5**. Estos desplazamientos coinciden con los reportados para el kaempferol-3-O- β -glucopiranosido (Demirezer et al., 2005, Figura 18, Tabla 12)

Tabla 12: Desplazamientos en RMN- 1H (300 MHz) y ^{13}C (75 MHz) para el compuesto **5** en CD_3OD , δ en ppm, J en Hz

Carbono	Compuesto 5		Demirezer et al, 2005	
	δ_C	δ_H , mult, J (Hz), integración	δ_C	δ_H , mult, J (Hz)
2	158.4		158.6	
3	135.4		135.4	
4	ND		179.4	
5	162.8		163.0	
6	100.1	6.21, (s), 1H	100.3	6.18, (s) 1H
7	ND		167.3	
8	95.0	6.40, (s), 1H	95.1	6.37, (s) 1H
9	159.5		158.9	
10	ND		105.4	
1'	122.8		122.8	

2'	132.2	8.06, (d), 2H, 8.7	132.3	8.04, (d) 2H, 9.0
3'	116.1	6.89, (d), 2H, 8.7	116.1	6.87, (d) 2H, 9.0
4'	160.8		161.6	
5'	116.1	6.89, (d), 2H, 8.7	116.1	6.87, (d) 2H, 9.0
6'	132.1	8.06, (d), 2H, 8.7	132.3	8.04, (d) 2H, 9.0
1''	104.1	5.24, (d), 1H, 7.4	104.2	5.22, (d), 7.5
2''	75.7	3.21, (m), 1H	75.7	3.19, (m)
3''	78.3	3.46, (m), 1H	78.1	3.42, (m)
4''	71.2	3.44, (m), 1H	71.3	3.42, (m)
5''	78.1	3.44, (m), 1H	78.4	3.42, (m)
6''	62.5	3.55, (dd), 1H, 11.7; 5.5	62.6	3.52 (dd), 12.0; 4.5
		3.70, (dd), 1H, 11.7; 1.8		3.68 (dd), 12.0, 2.0

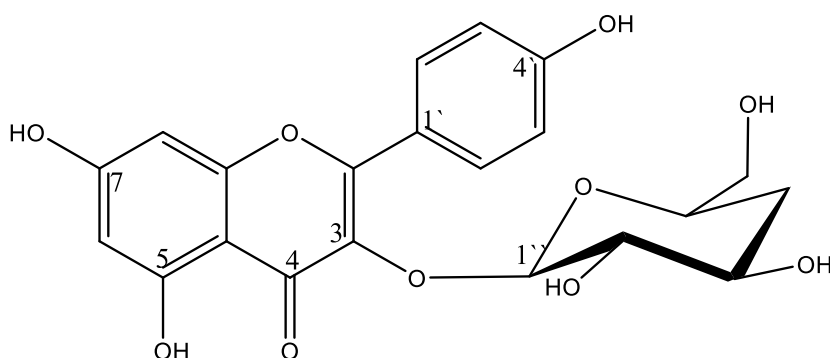


Figura 18: Estructura del compuesto 5

2.3.6 Elucidación compuesto 6

El compuesto **6** (26 mg) es un sólido amarillo con $[\alpha]^{27.3}_D - 41.69^\circ$ ($c = 0.1$ MeOH). En el espectro de RMN- ^1H (CD_3OD , 300 MHz, Anexo 27) se observaron señales características de un anillo aromático 1,3,4-trisustituido con protones en δ_H 7.71 (1H, d, $J = 1.6$ Hz), 6.87 (1H, d, $J = 8.1$ Hz) y 7.59 (1H, dd, $J = 8.5; 2.0$ Hz). El anillo A muestra dos protones con acoplamiento *meta*- en δ_H 6.2 (1H, d, 1.6 Hz) y 6.39 (δ_H d, 1.6 Hz). Adicionalmente, se presenta una señal característica de protón anomérico en 5.23 (1H, d, $J = 7.5$ Hz) indicando que el compuesto **6** presenta una mono glicosilación. En el espectro de APT (CD_3OD , 300 MHz, Anexo 28) se observaron señales de carbonos aromáticos en δ_C 163.1, 166.1, 158.5, 158.4, 149.8, 145.9, 135.6, 123.2, 117.5, 116.0, 100.0, 94.8. Se observó también un carbón anomérico en δ_C 104.3 que sugiere un enlace O-glicosido y 5 señales de la unidad de

azúcar en δ_C 75.7, 78.1, 71.2, 78.4 y 62.5. Con base en la comparación de los desplazamientos obtenidos por RMN- ^1H y RMN-APT con los datos de literatura, (Islam et al., 2012), el compuesto **6** fue identificado como **quercetina-3-O- β -glucopiranosido**. (Figura 19, Tabla 13)

Tabla 13: Desplazamientos en RMN ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75 MHz) para el compuesto **6** en CD_3OD , δ en ppm, J en Hz

Carbono	Compuesto 6		Islam et al, 2012	
	δ_C (ppm)	δH mult, integración J (Hz)	δ_C (ppm)	δH mult, integración J (Hz)
2	158.5	-	158.4	-
3	135.6	-	135.6	-
4	ND	-	179.84	-
5	163.1	-	162.99	-
6	100.0	6.20, (d), 1H; 1.6	99.89	6.19, (d), 1H; 2
7	166.3	-	165.97	-
8	94.8	6.40, (d), 1H, 1.6	94.73	6.38, (d), 1H; 2
9	158.4	-	158.44	-
10	ND	-	105.68	-
1'	123.1	-	123.08	-
2'	117.5	7.72 (d), 1H, 1.7	117.59	7.71, (d), 1H; 2
3'	145.9	-	145.87	-
4'	149.9	-	149.83	-
5'	116.0	6.87 (dd), 1H, 8.5	116.01	6.87, (d), 1H; 8.4
6'	123.2	7.59 (dd), 1H, 2.0; 8.5	123.2	7.58, (dd), 1H, 2, 8.4
1''	104.3	5.24 (d), 1H, 7.5	104.39	5.23, (d), 1H, 7.6
2''	75.7	3.49 (m), 1H	75.73	3.48, (t), 1H, 9.2
3''	78.1	3.36 (m), 1H	78.11	3.35, (t), 1H 8.8
4''	71.2	3.59 (m), 1H	71.22	3.43, (t), 1H 9.6
5''	78.4	3.22 (m), 1H	78.35	3,24 (m), 1H
6''	62.5	3.71, (dd), 2.2; 11.6 ,	62.58	3.73, (dd), 1H 2; 11.6
		3.42, (dd), 5.9; 11.6		3.56, (dd), 1H, 5.2; 11.6

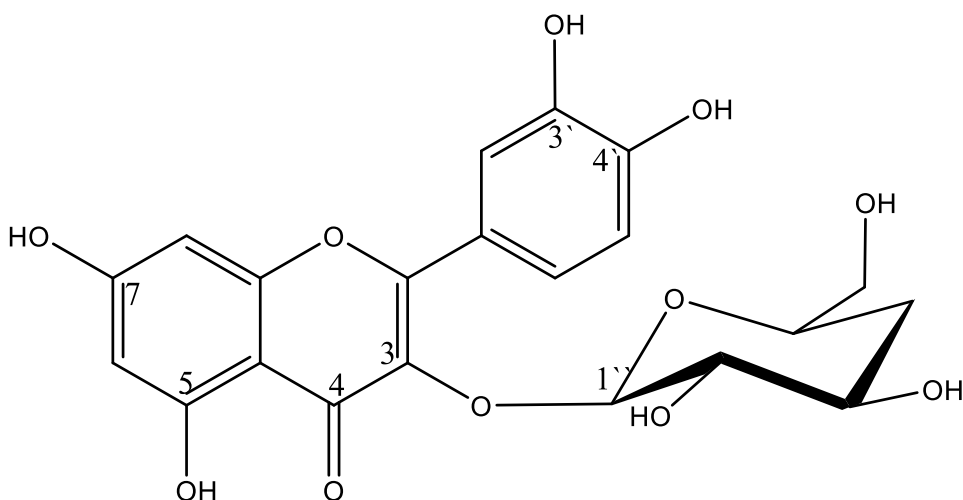


Figura 19: Estructura del compuesto 6

2.3.7 Elucidación del compuesto 7

El compuesto **7** (7 mg) se aisló como un sólido amarillo con $[\alpha]_{27.3}^{27.3} -14.04^\circ$ (c 0.1 MeOH), en el espectro de RMN- ^1H (Anexo 29) mostró señales características un anillo tetrasustituido con protones en posición *meta*- 5.85 (1H, d, J = 2.2 Hz) y 5.95 (1H, d, J = 2.2 Hz). Protones para un anillo 1,3,4 trisustituido con señales en 6.83 (1H, d, J = 1.6Hz), 6.76 (1H, d, J = 8.1Hz) y 6.73 (1H, J = 1.8 Hz).

En el espectro de APT (CD_3OD , 300 MHz, Anexo 30) se observaron señales de anillos aromáticos en δ_{C} 157.6, 157.9, 115.2, 116.0, 120.0, 95.5, 96.3, 82.9, 68.8 y 28.5, sugiriendo que se trata de un flavonoide, tipo flavan-3-ol similar al de la catequina y la epicatequina. El hidroxilo del C-3 se encuentra en posición *trans* debido a la constante de acoplamiento del proton de C-2 (δ_{H} 4.60 (d), J= 7.5Hz) y C-3 (δ_{H} 4.00 (td) J = 7.5; 5.5 Hz), lo cual nos indica que se trata de la catequina. Al comparar los datos de RMN con los datos propuestos por Chang et al, y teniendo en cuenta los datos de rotación óptica el compuesto **7** corresponde a la (-) **catequina**. (Figura 20 Tabla 14)

Tabla 14: Desplazamientos en RMN ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75 MHz) para el compuesto 7 en CD_3OD , δ en ppm, J en Hz

Carbono	Compuesto 7		Chang etal, 2013	
	δC	δH mult, integración J (Hz)	δC	δH mult, integración J (Hz)
2	82.9	4.60, (d), 7.5	82.8	4,56 (d), 1H, 7.4
3	68.8	4.00, (td), 7.5; 5.5	68.8	3,97 (m), 1H
4	28.5	2.85, (dd), 16,1; 5,5	28.5	2,84(dd), 1H, 16; 5.2
		2.50, (dd), 16,1; 8.2		2,5 (dd), 1H, 16,1; 8,1
5	157.6	-	157.5	-
6	95.5	5.85, (d), 2.2	95.5	5,85, (d) 1H, 2.2
7	157.0	-	156.9	-
8	96.3	5.92, (d), 2.2	96.3	5,92, (br. S), 1H
9	157.9	-	157.8	-
10	100.7	-	100.8	-
1'	132.2	-	132.2	-
2'	115.2	6.83, (d), 1.6	115.3	6,83 (d), 1H, 1.8
3'	ND		146.2	C
4'	ND		146.2	C
5'	116.0	6.76, (d), 8.1	116.1	6.75, (d), 1H, 8,2
6'	120.0	6.73, (d), 1.8, 8.1	120.0	6,71 (dd), 8.1, 1.8

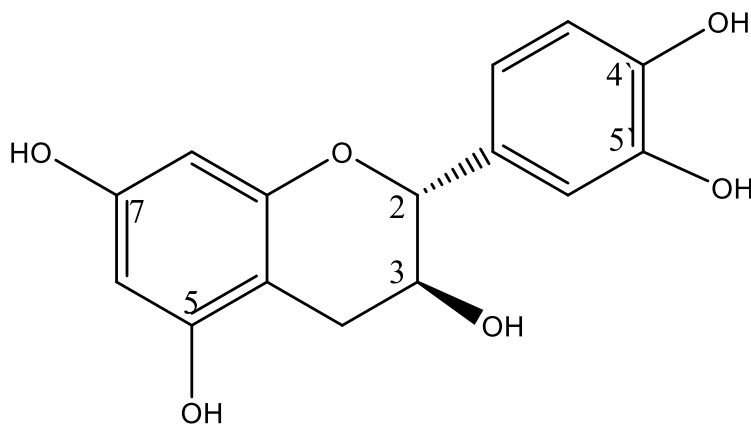


Figura 20: Estructura del compuesto 7

2.3.8 Elucidación compuesto 8

El compuesto **8** (3 mg) es un sólido amarillo que en el espectro de RMN-¹H (CD₃OD, 300 MHz, anexo 31), el cual mostró protones de un anillo aromático monosustituido en δ_H 8.00 (2H, dd, J = 7,6, 1.9 Hz), 7.56 (1H, m) y 7.55 (2H, d, J = 7.5 Hz); señales para un anillo tetrasustituido con protones en meta en δ_H 6.50 (1H, d, J = 2 Hz) y 6.24 (1H, d, J = 2 Hz), además de un protón en δ_H 6.76 (1H, s). En el espectro APT (Anexo 32), el compuesto **8** mostró desplazamientos de metinos de anillos aromáticos en δ_C 100.3, 95.4, 127.5, 130.2, 133.0 y 123.2 además de la presencia de carbono vinílico δ_C 106.3 (C-3) y carbono cuaternario en δ_C 164.5 (C-2). Adicionalmente, se encontró una señal en δ_C 181.5 (C-4). Los datos anteriores concuerdan con aquellos reportados para la **crisina** (Han et al, 2010), compuesto aislado previamente de otras especies del género *Passiflora* (Zanoli et al, 2000; Medina et al, 1990). (Figura 21, Tabla 15)

Tabla 15: Desplazamientos en RMN ¹H (300 MHz) y ¹³C (75 MHz) para el compuesto **8** en CD₃OD, δ en ppm, *J* en Hz

Carbono	Compuesto 8		Han et al, 2010
	δ_C	δ_H mult, integración J (Hz)	δ_H mult, integración J (Hz)
2	164.5
3	106.3	6.76, (s), 1H	6.73, (s), 1H
4	181.5	-	-
5	ND	-	-
6	95,4	6.50, (d), 1H, 2.0	6.48, (br s), 1H
7	165.0	-	-
8	100.3	6.24, (d), 1H, 2.0	6.23, (br s), 1H
9	157.0	-	-
10	103.0	-	-
1'	ND	-	-
2'	127.5	8.00 (dd), 1,9 Hz; 7,6Hz	7.97, (d), 1H, 7.6Hz
3'	130.3	7.57, (d), 7.4Hz	7.54, (m), 1H
4'	133.0	7.58, (m), 1H	7.55, (m), 1H
5'	130.3	7.57, (d), 1H, 7.4Hz	7.54, (m), 1H
6'	127.5	8.00 (dd), 1H, 1.9 Hz; 7.6Hz	7.97, (d), 1H 7.6Hz

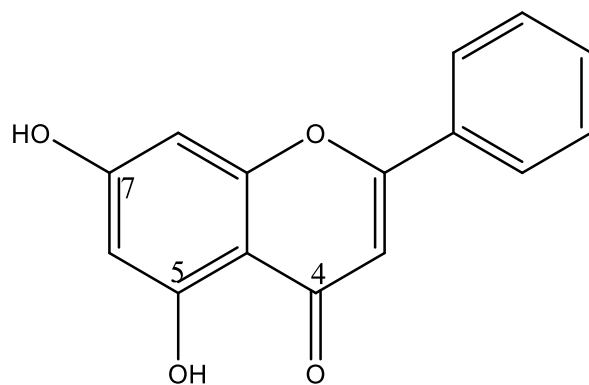


Figura 21: Estructura del compuesto 8

2.4. DISCUSIÓN GENERAL

De los flavonoides aislados en este trabajo es importante resaltar que el anillo A para los compuestos **5** a **8**, son 5,7-dihidroxlados, las variaciones se presentan en el número de hidroxilaciones del anillo B, así como variaciones en el anillo C. Adicionalmente, solo se observaron O-monoglicosidaciones en los compuestos **5** y **6** a diferencia de los compuestos observados en los estudios hechos con muestras recolectadas en Choachi donde se aislaron flavonoides di-C-glicosidados. Las diferencias en el número y tipos de glicosilaciones pueden deberse a las diferencias en los tiempos y lugar de recolecta o incluso a la presencia de diferentes quimiotipos de la planta, lo cual debería estudiarse más a fondo.

En cuanto a las saponinas, estas resultan interesantes ya que tienen un núcleo lanostano, que ha sido reportado principalmente en hongos y organismos marinos (esponjas). Además, presentan en sus glicosilaciones N-acetilglucosamina, este azúcar ha sido reportado en compuestos similares llamados erilosidos aislados de *Erylus formosus* (Antonov et al, 2007) y en saponinas de algunas plantas como *Entada pursaetha* (Tapondjou et al, 2005). También, presentan como característica común la presencia de metilos en los carbonos 24 y 25, lo cual es particular de núcleos lanostano (Emmons et al, 1989; Nakata et al, 2009). importante resaltar que saponinas con este núcleo no han sido reportadas en especies del género *Passiflora*, lo cual indica que este tipo de compuestos pueden ser considerados quimiomarcadores de la especie.

2.5. CONCLUSIONES:

A partir del extracto acuoso de las hojas de *P. ligularis*, se aislaron 8 compuestos, 4 flavonoides, y 4 saponinas. En cuanto a las saponinas aisladas, los compuestos 1 - 3 (ligularosido B, C y D) presentan un núcleo lanostano, y dos unidades de azúcar, una de las cuales corresponde a la N-acetil glucosamina, y la otra una glucosa. Estas dos características no se han reportado en especies del género *Passiflora*. Los compuestos 1 a 3 no han sido previamente reportados en la naturaleza. Adicionalmente, los compuestos 5-8 corresponden a flavonoides, tres de ellos tipo flavona y un flavan-3-ol. De esta manera, se confirma que *P. ligularis* es una fuente de compuestos novedosos cuyas actividad biológica deben ser evaluada con el ánimo de buscar una aplicación las hojas, un subproducto del cultivo potencialmente aprovechable.

3. Capítulo 3: Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extracto, fracciones y compuestos de las hojas de *Passiflora ligularis*

3.1 Generalidades de la inflamación

3.1.1 Inflamación

La respuesta inflamatoria consiste en un sistema innato de las respuestas celulares y humorales después de la lesión (calor o la exposición al frío, isquemia / reperfusión, traumatismo cerrado, etc.), en la que el cuerpo intenta restaurar el tejido a su estado pre lesión. En la respuesta inflamatoria aguda, existe un ensamble complejo de acontecimientos relacionados con la fuga de agua, sal, y proteínas del compartimiento vascular; activación de las células endoteliales; las interacciones adhesivas entre leucocitos y el endotelio vascular; reclutamiento de leucocitos; la activación de los macrófagos del tejido; activación de las plaquetas y su agregación; activación del complemento; sistemas de coagulación y fibrinolíticos; y la liberación de proteasas y oxidantes de los fagocitos, todos los cuales pueden ayudar a hacer frente a la situación de daño. Lo anterior se desencadena o bien por causas físicas o causas químicas, por microorganismos infecciosos, o por otras razones que afecten los tejidos (Ward, 2010).

Al generarse la respuesta inflamatoria, esta tiene tres componentes principales: El primero de ellos se refiere a los cambios hemodinámicos secuenciales en el flujo y el calibre de los conductos sanguíneos, que se caracterizan por una constricción arteriolar transitoria (se presenta a los pocos segundos de sufrir el estímulo), posteriormente se presenta una vasodilatación mediada por PGE₂, histamina/serotonina y producción de óxido nítrico (minutos a días), aumento del flujo sanguíneo por las arteriolas y la apertura de nuevos

lechos capilares y venulares en la zona afectada. El segundo componente es el incremento de la permeabilidad vascular, que se da por la contracción reversible de las células endoteliales la cual es ocasionada por acción de mediadores como histamina, bradiquinina y leucotrienos. Adicionalmente, este aumento de la permeabilidad se da por el incremento en la transcitosis, proceso entendido como el transporte de macromoléculas desde un espacio extracelular a otro a través del citoplasma de una célula: En el tercer componente se encuentran las modificaciones leucocitarias que incluyen la extravasación (rolling, activación, adhesión y migración transendotelial) de las células hematopoyéticas (neutrófilos, linfocitos, basófilos, entre otras), quimiotaxis, conglomeración y fagocitosis (Robbins et al, 1998). La inflamación crónica en cambio es permanente o recurrente y se encuentra asociada al influjo de macrófagos, agranulocitos, eosinófilos, basófilos, y de mayor cantidad de neutrófilos con la respectiva producción y liberación de mediadores moleculares (Tincani et al, 2007), contribuyendo al daño tisular y generando una condición patológica que se encuentra relacionada con numerosas enfermedades como el asma crónica, esclerosis múltiple, arterioesclerosis múltiple, psoriasis, artritis, reumatismo y otras enfermedades autoinmunes, que afectan a gran parte de la población en el mundo (Gautam et al, 2009; Tincani et al, 2007)

De esta forma al ser tan complejo el proceso de inflamación, un solo compuesto no puede actuar en todas las dianas farmacológicas que esta presenta, además cada patología que presenta en su sintomatología un proceso de esta naturaleza presenta otras características y factores asociados; entre estos compuestos existen algunos que generan efectos secundarios o acción limitada, por ello es importante la búsqueda de compuestos antiinflamatorios que puedan ayudar a disminuir los efectos secundarios y los asociados a la inflamación crónica.

3.1.2 Compuestos con actividad antiinflamatoria.

- **Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)**

Los antiinflamatorios no esteroideos inhiben la actividad de la enzima ciclo-oxigenasa (COX), resultando en la disminución de la formación de prostaglandinas y tromboxanos a partir de ácido araquidónico. De esta forma, al disminuir la síntesis de prostaglandinas es posible disminuir el dolor, inflamación y fiebre de los AINES ((Drug Information for the health Care Professional, 2001) (figura 1)



Figura 22: Mecanismo de acción de los AINES (Fuente: Huang, S of therapy. CMAJ. 2000)

Los AINES tradicionales inhiben de manera no selectiva la actividad enzimática de las isoformas COX-1 y COX-2, o en todo caso en mayor medida de la COX-1 lo cual trae como consecuencia la aparición de efectos secundarios a nivel cardíaco, gastrointestinal, hepático, renal y de coagulación (Florez, 1998; Strand et al, 2007). La investigación farmacológica ha tratado de obtener compuestos antiinflamatorios mas selectivos, es decir que presenten mayor inhibición de la COX-2 que de la COX-1 (Perez et al). El ácido acetilsalicílico, al igual que otros AINES, es activo frente a ambas isoformas de las COX, especialmente sobre la COX-1. Otros ejemplos de AINES son acetaminofén, ibuprofeno, indometacina, diclofenaco y piroxicam.

- **Antiinflamatorios esteroideos.**

Este grupo de fármacos se encuentra representado principalmente por el cortisol y la dexametasona, los cuales son ampliamente prescritos para el tratamiento de artritis reumatoidea, enfermedad de Graves, glomerulonefritis, diabetes mellitus tipo 1, esclerosis múltiple, tiroiditis, y otras enfermedades que se pueden asociar al proceso inflamatorio. Esta múltiple acción de los glucocorticoides se debe a un efecto pleiotrópico del receptor glucocorticoide en muchos de los procesos enzimáticos, pero de la misma manera, este efecto puede llevar a la presencia de reacciones adversas tales como hipertensión, inhibición de reparo de tejidos, osteoporosis, entre otros (Gautam et al, 2009)

En relación a sus posibles efectos secundarios los esteroideos (hidrocortisona, betametasona) actúan en los primeros pasos de la respuesta inflamatoria ocasionando efectos adversos tales como el hinchamiento (cara redondeada, boca estrecha, joroba supraclavicular, obesidad del tronco con las extremidades relativamente delgadas), hipertensión, hiperglicemia, debilidad muscular, aumento de la susceptibilidad a infecciones causado por la inmunosupresión, osteoporosis, glaucoma, trastornos

psiquiátricos, detención del crecimiento, etc (Gonzales, 2000). Por esta razón y por la amplia gama de reacciones involucran diversas enzimas y mediadores químicos, es de suma importancia la búsqueda de compuestos o fármacos con actividad antiinflamatoria, que tengan mejores efectos farmacológicos y de esta forma se pueda disminuir los efectos colaterales que se presentan al inhibir algún mecanismo en la respuesta inflamatoria.

3.1.3 Productos naturales y actividad antiinflamatoria

Al igual que para otras patologías, las plantas son una fuente importante de compuestos con actividad antiinflamatoria con mecanismos de acción variados que incluyen la modulación de la expresión de: citoquinas proinflamatorias (IL-1b, IL-6, IL-8, GM-CSF and TNF- α) así como de enzimas mediadoras (MMP-3, MMP-13, iNOS y COX-2) y catabolitos (NO y PGE₂) (Gómez et al, 2011)

Existen varios reportes en la literatura que presentan la potencial actividad antiinflamatoria tanto de extractos como de metabolitos secundarios aislados de fuentes naturales. Algunos de estos estudios se han realizado mediante estrategias bioguiadas a través de diferentes modelos farmacológicos tanto *in vivo* como *in vitro* (Newman et al. 2003; Setty et al, 2005) En la tabla 16 se presentan algunos ejemplos de plantas en las cuales se ha evaluado su potencial antiinflamatorio.

Tabla 16: Actividad antiinflamatoria reportada para algunos extractos y metabolitos secundarios de plantas

Espece vegetal	Metabolitos secundarios	Actividad antiinflamatoria/ mecanismo de acción reportado	Referencias
<i>Tripterygium wilfordii</i>	Terpeno (tripterina)	Inhibición de la producción de IL-1 en monocitos estimulados con LPS, con valores de IC ₅₀ de 40 η M.	(Huang et al, 1988)
<i>Maytenus canariensis</i>	Terpenos (pristimerina y tingenona)	Inhibición de la producción de IL-1 en monocitos estimulados con LPS, con valores de IC ₅₀ de 56 y 58 η M.	(Huang et al, 1988)

<i>Scutellaria baicalensis</i>	Flavonoides baicalina y baicaleina wogonina	Inhibición de la producción de NO inducida por LPS en células RAW 2647 y de la expresión del gen de la iNOS. Aumento de los niveles de TNF- α s.	(Lin et al, 1995)
<i>Silybium marianum</i>	Silimarina (mezcla de flavonoides bioactivos)	Inhibición de TNF- α inducida por la activación de NF-Kb en linfoma histiocítico humano.	(Manna et al, 1999)
<i>Aesculus hippocastanum</i>	Aescina (mezcla de saponinas triterpénicas)	Inhibición de la actividad de PLA2, antagonista del receptor 5-HT2).	(Bhattaram et al, 2002)
			(Sirtori, 2001)
<i>Croton celtidifolius</i>	Flavonoides y proantocianidinas	Inhibición del edema plantar inducido por caolín en ratas.	(Nardi GM, 2007)
<i>Croton menthodorum</i>	Extracto alcohólico		(Ortega T, 1996)
<i>Croton cuneatus</i>	Extracto acuoso		
<i>Bupleurum rotundifolium.</i>	Saponinas: <ul style="list-style-type: none"> • Ácido equinocístico. • 11-metoxi-primulagenina A • Rotundiósido E y F • Ester de primulagenina A • Rotundiósido C 	Inhibición del edeme auricular inducido por TPA.	(Navarro et al, 2001)

	Rutina, quercetina y hesperidina	Inhibición de la inflamación en fases agudas y crónicas de artritis inducida por adjuvante de Freud en ratas.	(Guardia et al, 2001)
<i>Kalopanax pictus</i>	Saponinas <ul style="list-style-type: none"> • Kalopanaxsaponina A • Pictosido A 	Inhibición de la inflamación en el modelo de permeabilidad vascular.	(Li et al, 2002)
<i>Tilia argentea</i>	Flavonoides <ul style="list-style-type: none"> • kaempferol-3,7-O-α-diramnósido • quercetina-3,7-O-α-diramnósido 	Inhibición del edema plantar inducido por carragenina en ratas.	(Toker et al, 2004)
<i>Panax ginseng</i>	Protopanaxadioles	Inhibición de la producción de óxido nítrico (NO) y TNF- α en células microgliales estimuladas con LPS.	(Wu et al, 2007)
<i>Polygala japonica</i>	Saponinas	Inhibición del edema plantar inducido por carragenina en ratas.	(Wang et al, 2008)
<i>Codonopsis lanceolata</i>	Saponinas	Inhibición del edema auricular inducido por xileno en ratones.	(Xu et al, 2008)

<i>Astragalus membranaceus</i>	Saponinas: Agroastragalósido IV y V	son saponinas con núcleo cicloartano aisladas de las raíces de <i>Astragalus membranaceus</i> , a estos compuestos se les evaluó la actividad antiinflamatoria inhibición de la producción de NO inducida por LPS en macrófagos RAW 264,7	(Lee et al, 2013)
--------------------------------	--	---	-------------------

3.1.4 Saponinas y flavonoides con actividad antiinflamatoria

Los flavonoides tienen diferentes roles biológicos siendo la actividad antiinflamatoria uno de ellos. Diferentes flavonoides han sido evaluados en modelos tanto *in vitro* e *in vivo* y se ha sugerido diferentes mecanismos como: inhibición de enzimas pro inflamatorias, como COX-2, (Welton et al, 1986), lipo oxigenasa y NO sintasa (Santangelo et al, 2007; Middleton et al, 2000; Yoon et al, 2005). También se le ha demostrado que son capaces de inhibir las proteínas quinasas debido en parte a la unión competitiva de los flavonoides en los sitios de unión de nucleótidos (Nishioka et al, 1989)

De igual forma, para las saponinas también se han reportado estudios sobre la elucidación de sus mecanismos de acción antiinflamatorios. Un ejemplo es el caso de *Glycine max* para cuyas saponinas (soyasaponinas) se ha propuesto que pueden tener un actividad quimiopreventiva a través de la baja regulación de la COX-2. También se logró evidenciar que suprimen la producción de TNF- α , de esta forma las soyasaponinas suprimen la transcripción de genes relacionados con la inflamación a través de la ruta de NF-kB (Kang et al, 2005). En otros estudios, se ha encontrado estos compuestos son capaces de inhibir la expresión de iNOS y COX-2, mediante la supresión del factor nuclear NF-Kb, en macrófagos estimulados con LPPS (Ahn et al, 2005).

Esta evidencia indica que los flavonoides y saponinas son compuestos con una importante actividad antiinflamatoria en diferentes modelos farmacológicos, estos compuestos son característicos de las especies del género *Passiflora*, las cuales como pudimos ver en el capítulo 1 han presentado resultados importantes en esta actividad, por esta razón *Passiflora ligularis* es una planta de gran interés para el estudio que se presenta en esta tesis.

3.2 Metodología

3.2.1. Animales de experimentación

Para la evaluación de la actividad antiinflamatoria de los compuestos de interés, se empleó el ensayo *in vivo* de edema auricular inducido por TPA (13-O-tetradecanoilforbol acetato). Para este ensayo se emplearon ratones ICR hembras exocriadas en el Bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia en grupos de 6 animales por tratamiento. Los animales del ensayo tenían peso comprendido entre 25-30 g y alrededor de 8 semanas de edad. Durante el desarrollo del experimento los ratones fueron mantenidos con alimento y agua *ad libitum*. Este estudio fue avalado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia (Acta 16 de 2015) (Anexo 33).

3.2.2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria

Para la evaluación de la actividad inflamatoria, se aplicó, en la oreja derecha de cada animal, 500 µg /oreja del compuesto a evaluar. Posteriormente, para inducir la inflamación se aplicó en la misma oreja 2.5 µg/oreja de TPA. La oreja izquierda no fue tratada y se empleó como control de cada animal. Como control positivo se utilizó indometacina en dosis de 500 µg/oreja y como control negativo el vehículo empleado (acetona/etanol 1:1). Transcurridas 4 horas después de la administración del TPA, los animales fueron sacrificados por dislocación y cervical y se tomaron muestras circulares de 5mm de cada una de las orejas.

Para determinar la actividad antiinflamatoria se estableció como la diferencia de peso entre las secciones de las orejas tratadas y no tratadas por cada animal (De Young et al, 1989), por medio de la siguiente ecuación:

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

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

3.2.3. 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<0.01; ***p<0.001, ****p>0.0001, ns no significativo.

3.3 Resultados y discusión.

Se evaluó la actividad antiinflamatoria del extracto de las hojas de *P. ligularis*, así como la fracción butanólica y los compuestos 1 a 7 cuya metodología de extracción fraccionamiento y aislamiento se describió en el capítulo 2. El modelo empleado fue el de edema auricular inducido por TPA, el cual ha sido utilizado por otros autores para evaluar la actividad antiinflamatoria de saponinas que tienen núcleo lanostano (Giner-Larza et al, 2000).

Los resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria se expresan como el delta del peso de las orejas del ratón en mg (peso de la oreja tratada menos la no tratada) y como el porcentaje de inhibición de la inflamación (Tabla 17 y Figura 23).

Tabla 17: 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 EEM	INHIBICIÓN (%) \pm EEM
Control	6.7 \pm 0.4	----
Patrón	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
Compuesto 1	19.1 \pm 0.8****	N.A
Compuesto 2	2.9 \pm 0.6*	57.3 \pm 8.8
Compuesto 3	18.2 \pm 1.4****	N.A
Compuesto 4	13.9 \pm 0.4****	N.A
Compuesto 5	18.0 \pm 0.3****	N.A
Compuesto 6	1.9 \pm 0.3**	77.1 \pm 3.3
Compuesto 7	13.4 \pm 0.8****	N.A

Extracto acuoso, fracción butanólica y los compuestos obtenidos de *P. ligularis* (dosis 500 μ g/oreja). Patrón (Indometacina 500 μ g/oreja). Datos expresados como la media \pm E.E.M., n=10 (ANOVA post-test Dunnett: **p<0.01; ***p<0.001, ****p>0.0001). N.A.: No Aplica, el delta de peso de las orejas del grupo tratado es mayor al delta de peso de las orejas del grupo control.

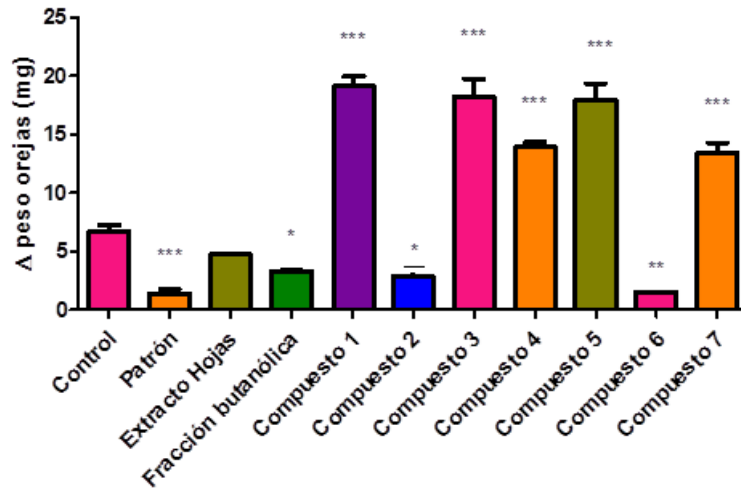


Figura 23: Actividad antiinflamatoria del extracto acuoso, fracción butanólica y los compuestos obtenidos de *P. ligularis* (500 μ g/oreja). Patrón (Indometacina 500 μ g/oreja). Datos expresados como la media \pm E.E.M., n=10 (ANOVA post-test Dunnet: **p<0.01; ***p<0.001, ****p>0.0001).

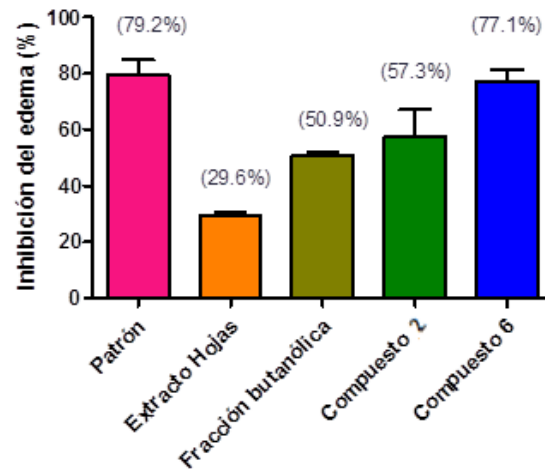


Figura 24: Inhibición de la inflamación presentada por patrón (indometacina), las hojas y la fracción butanólica de *P. ligularis* y los compuestos 2 y 6 en dosis de 500 μ g/oreja. Datos expresados como la media \pm E.E.M., n=10.

Los datos anteriores muestran el efecto de los tratamientos evaluados sobre el edema auricular inducido por la aplicación del TPA. Se observa la acción antiinflamatoria de la indometacina que redujo el edema con un porcentaje del 79.2%, resultado que era de esperarse considerando que este fármaco inhibe la enzima COX, responsable de la síntesis de prostaglandinas proinflamatorias, que son liberadas como consecuencia del estímulo inflamatorio (De Young et al, 1989).

El extracto de *P. ligularis* se había evaluado previamente con este mismo modelo, mostrando un porcentaje de inhibición de la inflamación menor al 40% (Aragón, 2013) lo cual es congruente con los resultados aquí obtenidos, ya que el extracto mostró una inhibición del 29.6%. De otra parte, es importante notar que la fracción butanólica presentó una inhibición del edema mayor que la del extracto (50.9%), esto resultados sugieren que los compuestos activos del extracto se encuentran en esta fracción la cual fue analizada en mayor profundidad. De los 8 compuestos aislados de esta fracción, 4 saponinas con núcleo lanostano y 4 flavonoides; sólo 7 compuestos fueron evaluados debido a la cantidad disponible de cada uno de ellos.

La actividad antiinflamatoria presentada por este extracto es similar a la reportada para otras especies de este mismo género, como en *Passiflora quadrangularis* y *Passiflora edulis* var *edulis* (Aragón 2013). Igualmente para *Passiflora edulis* var *flavicapa*, mediante del modelo de pleuresía causado por carragenina, se evidenció que el extracto acuoso de las hojas de esta planta, inhibe citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-1 β) así como liberación o acción de enzimas como la mieloperoxidasa y de mediadores como bradicinina, histamina, óxido nítrico, entre otros (Benincá et al, 2007; Monthaner et al, 2007). Adicionalmente, para un extracto etanólico de la especie *Passiflora foetida* también se ha demostrado actividad antiinflamatoria al inhibir 37.5% del edema plantar inducido por carragenina (Sasikala et al en el 2010).

El compuesto **2**, una saponina diglicosidada con núcleo lanostano, presentó una inhibición del edema del 53.4%, resultado que concuerda con lo reportado en la literatura para moléculas similares ya que trabajos previos han demostrado actividad antiinflamatoria en compuestos que presentan este núcleo (Giner-Larza et al, 2000). Así mismo el compuesto **6**, la quercetina-3-O- β -glucopiranosido, presentó un porcentaje de inhibición del 77.1%, lo cual es coherente con reportes previos en los cuales este compuesto presentó una

inhibición de 51.2% del edema plantar inducido por carragenina en ratas (Valentová et al, 2014). Cabe resaltar que el compuesto **2 (C.2)** y el compuesto **6 (C.6)** son unos de los compuestos mayoritarios de la fracción butanólica de *P. ligularis*, como se puede observar en la figura 25.,

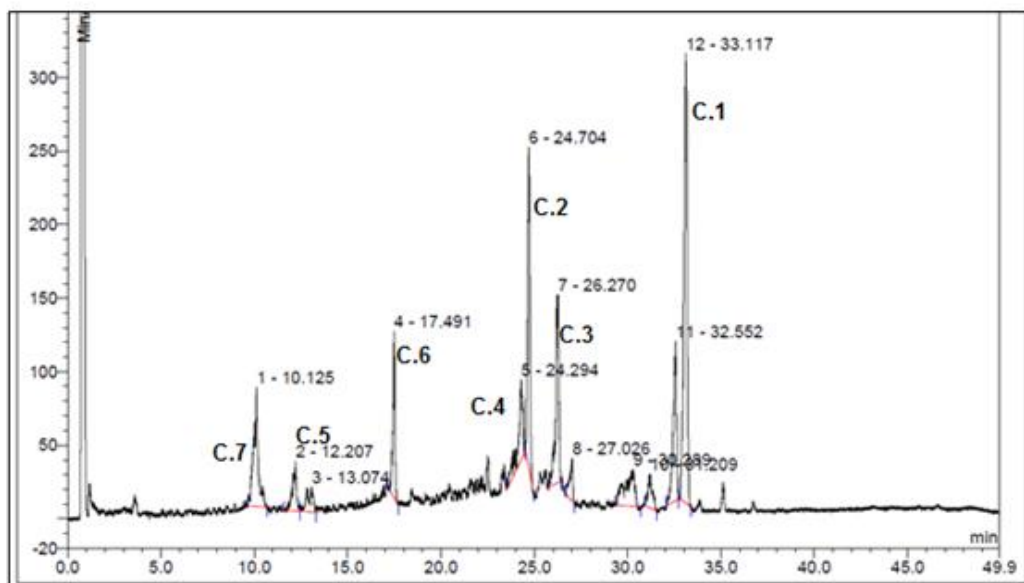


Figura 25: Cromatograma de la fracción butanólica del extracto acuoso de las hojas de *P. ligularis*; Fase móvil: MeCN (A) y H₂O (B) 0-10min 10-20%A, 30min 50%A, 40min 95% A, 45min 95%A, Fase estacionaria: Columna Thermo® RP-18 (75 mm x 3 i.d; 2,2 µm), detector: LT- ELSD. C.1: ligularósido B, C.2: ligularósido C, C.3: ligularosido D, C.4: ligularósido A, C.5: Kaempferol-3-O-β-glucopiranosido, C.6: Quercetina-3-O-glucopiranosido, C.7: (-) catequina, C.8: Crisina.

Lo anterior sugeriría que estos compuestos (**C.2** y **C.6**) podrían ser los responsables de la actividad antiinflamatoria que inicialmente presentaron la fracción butanólica y el extracto acuoso de esta especie. En este sentido, el presente trabajo contribuye de manera significativa al estudio de la actividad antiinflamatoria de las hojas de *P. ligularis*, al proponer dos de los compuestos presentes en el extracto evaluado como los responsables de la actividad antiinflamatoria de esta planta. Resulta importante mencionar que en el pico identificado como C.1, eluyen 2 saponinas más que no fueron aisladas por la poca cantidad que se obtuvo de la fracción donde se encontraban.

Los resultados obtenidos en los compuestos **1**, **3-5** y **7** presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al control. Esta diferencia se debe a que aumentan el delta de peso de las orejas evaluadas indicando una acción inflamatoria mayor que la del TPA, por ese motivo no fue posible calcular la inhibición del edema. Este resultado podría estar relacionado con un reporte previos de Ikeda et al en el 2007 quienes mencionan los efectos proinflamatorios de algunos triterpenos pentacíclicos, lo cual se puede deber a muchos factores involucrados en el fenómeno de la inflamación como lo son el óxido nítrico (NO), TNF- α (Factor de necrosis tumoral), aumento de la enzima mieloperoxidasa, entre otros. Igualmente, los compuestos terpenoidales obtenidos de la familia Euphorbiaceae y Thymelaeaceae también han mostrado ser proinflamatorios (Evans et al, 1983).

3.4. CONCLUSIONES

Se logró identificar a los compuestos **2** (ligularósido C) y **6** (Quercetina-3-O- β -glucopiranosido) como los principales responsables de la actividad antiinflamatoria del extracto acuso de hojas de *P. ligularis*. En este sentido, el presente trabajo contribuye de manera significativa a la validación del uso tradicional de esta planta y a la literatura científica al reportar por primera vez los compuestos involucrados en el efecto antiinflamatorio descrito.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

Empleando diferentes técnicas cromatográficas (HSCCC, HPLC, CC, XAD-2) se logró aislar 8 compuestos a partir de un extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*. Estos compuestos se identificaron como: ligularosido B (1), ligularósido C (2), ligularósido D (3), ligularósido A (4), kaempferol-3-O- β -glucopiranosido (5), quercetina-3-O- β -glucopiranosido (6), catequina (7) y crisina (8). Es importante resaltar que los ligularósidos B, C y D no se han reportado previamente en la naturaleza, así mismo los flavonoides monoglicosidados que se encontraron no se han reportado para esta especie y la crisina ya se había reportado en otras especies del género *Passiflora*.

Además, se evaluó la actividad antiinflamatoria del extracto crudo, la fracción butanólica y los compuestos aislados, identificando a los compuestos ligularósido C y quercetina-3-O- β -glucopiranosido como posibles responsables de la actividad antiinflamatoria encontrada en la fracción butanólica y en el extracto crudo.

4.2 Recomendaciones

Establecer la estereoquímica de la cadena lateral de los ligularosidos A-D

Continuar con el aislamiento de otros flavonoides y saponinas evidenciados en la fracción F1, obtenida por HSCCC de la fracción butanólica de *P. ligularis*.

De acuerdo con la revisión de las actividades biológicas de especies del género *Passiflora*, realizar más actividades para la fracción butanólica y los compuestos aislados de los cuales se presenta suficiente cantidad. Asimismo profundizar en el estudio de la actividad

antiinflamatoria de los compuestos promisorios con el fin de evaluar su mecanismo de acción.

Evaluar los cambios en los perfiles metabólicos entre diferentes cultivos de granadilla para establecer su aplicabilidad.

5. Bibliografía

- Afiyatullof, S., Kalinovsky, A., Antonov, A., Ponomarenko, L., Dmitrenok, P., Aminin, D., y otros. (2007). Isolation and structures of Erylosides from the Carribean Sponge *Erylus gofrilleri*. *J. Nat. Prod.*, 1871-1877.
- Ahn, K., Noh, E., Zhao, H., Jung, S., Kang, S., & Kim, Y. (2005). Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase II by *Platycodon grandiflorum* saponins via suppression of nuclear factor-kappaB activation in RAW 264.7 cells. *Life Sci.*, 2315-2318.
- Andes, U. d. (1994). Granadilla (*Passiflora ligularis*). *Análisis intersectorial del sector hortofrutícola para Colombia*, 176-178.
- Andrade, M., De Sousa, H., Luz, E., Geraldo, F., De Oliveira, M., Silva, V., y otros. (s.f.). Triterpenos do Tipo Lanostano Isolados de Corpos Frutíferos do Basidiomiceto *Daedalea aethalodes* (Polyporaceae). *32a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Brasil: Sociedade Brasileira de Química.
- Antonov, A., Kalinovsky, A., Stonik, V., Afiyatullof, S., Aminin, D., Dmitrenok, P., y otros. (2007). Isolation and Structures of Erylosides from the Carribean Sponge *Erylus formosus*. *J. Nat. Prod.*, 169–178.
- Aragón D.M, O. L. (2014). Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos acuosos de especies de *Passiflora* en el modelo de edema auricular inducido por TPA. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia y Universidad Federal de Santa Catarina.
- Barbalho, S. M., Damasceno, D. C., Machado Spada, A. P., Lima, I. E., Cressoni, A. A., Landgraf, G. E., y otros. (2011). Effects of *Passiflora edulis* on the Metabolic Profile of Diabetic Wistar Rat Offspring. *JOURNAL OF MEDICINAL FOOD*, 14, 1490–1495.
- Barbosa, P. R., Valvassori, S. S., Kappel, V. D., Matrins, M. R., Gavioli, E. C.,., & Reginatto, F. H. (2008). The Aqueous Extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* Reduce. *JOURNAL OF MEDICINAL FOOD*, 282–288.
- Baumann, E., Stoya, G., Völkner, A., & Richter, C. (2000). Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. *Acta Histochemica*, 21- 35.
- Benincáa, J., Montanhera, A., Zucolotto, S., Schenkel, E., & Frödea, T. (2007). Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. *Food Chemistry*, 1097–1105.
- Bhattaram VA, G. U. (2002). Pharmacokinetics and Bioavailability of Herbal Medicinal Products. *Phytomedicine*, 1 - 33.

- Birk, C., Provencia, G., Gosmanna, G., Reginatto, F., & Schenkel, E. (2005). TLC Fingerprint of Flavonoids and Saponins from Passiflora Species. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 25, 2285-2291.
- Bombardelli, E. B. (1975). Passiflorine, a new glycoside from Passiflora edulis. *Phytochemistry*, 2661–2665.
- Brown E, H. N. (2007). Evaluation of the anxiolytic effects of chrysin a Passiflora incarnata extract in the laboratory rat. *AANA. J.*, 75(5), 333–337.
- Brown, E., Hurds, N., McCall, S., & TE, C. (2007). Evaluation of the anxiolytic effects of chrysin, a Passiflora incarnata extract, in the laboratory rat. *Europe PubMed Central*, 333-337.
- Carvajal, L. M., Turbay, S., & Alvarez, L. (2014). RELATIONSHIP BETWEEN THE FOLK USES OF THE GRANADILLA PLANT (passiflora ligularis juss) AND ITS PHYTOCHEMICALCOMPOSITION. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*.
- Castro, P., Hoshino, A., & Da silva, J. M. (2007). Possible anxiolytic effect of two extracts of Passiflora quadrangularis L. in experimental models. *Phytotherapy Research.*, 21(5), 481-484.
- Chang, R., Wang, C., Zeng, Q., Guan, B., Zhang, W., & Jin, H. (2013). Chemical constituents of the stems of Celastrus rugosus. *Arch. Pharm. Res.*, 1291–1301.
- Chang, Y., & Su, J. (1998). Antioxidant activity of major anthocyanins. *Shipin Kexue*, 651–656.
- Chassagne, D. C. (1998). A cyanogenic glycoside from Passiflora edulis fruits. *Phytochemistry*, 49.
- Chassagne, D., & Crouzet, J. (1998). A cyanogenic glycoside from Passiflora edulis fruits. *Phytochemistry*, 757–759.
- Chassagne, D., Crouzet, J., Bayonove, C., & Baumes, R. (1997). Glycosidically bound eugenol and methyl salicylate in the fruit of edible Passiflora Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 45, 2685–2689.
- Cho, S., Park, S., & Kwon, M. (2003). Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF-kappaB pathway in lipopolysaccharide stimulated macrophage. *Mol Cell Biochem*, 153–160.
- Colomeu, T., Figueredo, D., Cazarin, C. B., Schumacher, N. S., Maróstica Jr, M. R., Meletti, y otros. (2014). Antioxidant and anti-diabetic potential of Passiflora alata Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NOD-mice). *International Immunopharmacology*, 18, 106- 115.
- Contreras, J., Calderón, L., Guerra, E., & García, B. (2011). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, 44, 2047- 2053.
- Coppens d'Eeckenbrugge, G. (2003.). Promesas de las pasifloras. *Memorias del X Seminario Nacional y IV Internacional sobre Especies Promisorias.*, (pág. 32P). Medellín.
- Coppens d'Eeckenbrugge, G. (2000). *Fruits from America*. Recuperado el 11 de Enero de 2015, de http://ciatweb.ciat.cgiar.org/ipgri/fruits_from_americas/frutales/cover.htm
- Correa, H., Valenzuela, A., Ospina, L. F., & Duque, C. (2009). Anti-inflammatory effects of the gorgonian Pseudopterogorgia elisabethae collected at the Islands of Providencia and San Andrés (SW Caribbean). *J Inflamm*, 10, 1- 10.
- Costa, G. M. (2013). *Estudo Químico de Espécies Brasileiras e Colombianas do Gênero Passiflora*. Universidade Federal de Santa Catarina: Tesis de Doctorado en Farmacia.
- De Marino, S., Iorizzi, M., Palagiano, E., Zollo, F., & Roussakis, C. (1998). Starfish Saponins. 55.1 Isolation, Structure Elucidation, and Biological Activity of the Steroid

- Oligoglycosides from an Antarctic Starfish of the Family Asteriidae. *Journal of Natural Products*.
- De Young, L. M., Kheilets, J. B., Bailaron, S. J., & Young, J. M. (1989). Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*, 26, 335-341.
- Dhawan K, D. S. (2004). Passiflora: as review update. *J Ethnopharmacol.*, 94:1-23.
- Dhawan, K., Dhawan, S., & Sharma, A. (2004). Passiflora: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 1-23.
- Dhawan, K., Kumar, S., & Sharma, A. (2001). Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. *Journal of Ethnopharmacology*, 165–170.
- Dinan, L., Harmatha, J., & Lafont, R. (2010). HPLC of steroids. En M. Waksmundzka-Hajnos, & J. Sherma, *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis* (pág. 690). Florida: Taylor & Francis group.
- (2001). *Drug Information for the health Care Professional*. Massachusetts: Rand Mc Nally.
- Edwin, E., Sheeja, E., Dhanabal, S. P., & Suresh, B. (2007). Antihyperglycemic Activity of *Passiflora mollissima* Bailey. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69(4), 570-571.
- Emmons, G. T., William, K., Schroepfer, W., & Schroepfer, J. (1989). IH and ¹³C NMR Assignments for Lanostan-3 β -01 Derivatives : Revised Assignments for Lanosterol . *MAGNETIC RESONANCE IN CHEMISTRY*, 1012-1024.
- Evans, F. J., & Taylor, S. E. (1983). *Pro-Inflammatory, Tumour-Promoting and Anti-Tumour Diterpenes of the Plant Families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae*. Londres: University of London.
- Felter, H. L. (1898). *King's American Dispensatory*.
- Fengqing, X., Cong, W., Liping, Y., Huairong, L., Weiwei, F., Chengting, Z., y otros. (2013). C-dideoxyhexosyl flavones from the stems and leaves of *Passiflora edulis* Sims. *Food Chemistry*, 136, 94-99.
- Ferreres, F., Sousa, C., Valentao, P., Andrade, P. B., Seabra, R. M., & Gil-Izquierdo, A. (2007). Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 10187-10193.
- Florez, J. (1998). *Farmacología humana*. Barcelona : Ediciones científicas y técnicas S.A
- Franco, L. (2006). *Estudio de la Actividad Antiinflamatoria de los Principios Activos de los Cálices de Physalis peruviana*. (U. N. Colombia, Ed.) Bogotá: Tesis de doctorado en ciencias farmacéuticas.
- Fröhlich, O., Duque, C., & Schreier, P. (1989). Volatile constituents of Curuba (*Passiflora mollissima*) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(2), 421- 425.
- Gautam, R., & Jachak, S. (2009). Recent developments in antiinflammatory natural products. *Medicinal Research Reviews*, 29, 767- 820.
- Gautam, R., & Jachak, S. (2009). Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Med. Res.Rev.*, 29, 767-820.
- Ghedira, K., & P. G. (2013). *Passiflora incarnata* L. : la passiflore officinale (Passifloraceae). *Phytothérapie*, 252-257.
- Giner-Larza, E., Mañez, S., Giner-Pons, R., Recio, C., & Rios, J. (2000). On the anti-inflammatory and anti-phospholipase A2 activity of extracts from lanostane-rich species. *Journal of Ethnopharmacology*, 61–69.
- Giner-Larza, E., Máñez, S., Giner-Pons, R., Recio, C., & Ríos, J. L. (2000). On the anti-inflammatory and anti-phospholipase A2 activity of extracts from lanostane-rich species. *Journal of Ethnopharmacology*, 61-69.

- Gómez, E., González, K., & Medina, J. (2011). Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 182 - 217.
- Gonzales, M. A., Lopera, W., & Arango, A. (2000). *Fundamentos de medicina, manual de terapéutica*. (Novena ed.). Corporación para investigaciones biológicas.
- Han, M.-S., Lee, I. K., Kim, Y.-S., Kim, J. T., Choe, K.-R., & Yun, B.-S. (2010). Flavonoids from Propolis Inhibit DNA Single Strand Single Strand. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem*, 53(4), 512-515.
- Han, Q., Wong, L., Yang, N., Qiao, C., Yiu, H., Ito, Y., y otros. (2008). A simple method to optimize the HSCCC two-phase solvent system by predicting the partition coefficient for target compound. *J. Sep. Sci.*, 1189 – 1194.
- Holm-Nielsen, L. P. (1988). Passifloraceae. *Flora del Ecuador*, 31: 124 p.
- Hongwei Lia, P. Z. (2011). Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* 'edulis' and *Passiflora edulis* 'flavicarpa'. *Journal of Ethnopharmacology*, 1085- 1090.
- Huang FC, C. W. (1988). Novel cytokine release inhibitors. Part I: triterpenes. *Biorg Med Chem Lett*, 1883 - 1886.
- Huang, S. (2006). *Rheumatology. Basics of therapy*. CMAJ.
- Ikeda, Y., Muakami, A., & Ohigashi, H. (2008). Ursolic acid: An anti- and pro-inflammatory. *Mol. Nutr. Food Res.*, 52, 26–42.
- Ingale, S. P., & Kasture, S. B. (2014). Antioxidant and antiparkinsonian activity of *Passiflora incarnata* leaves. *Orient Pharm Exp Med*, 14, 231-236.
- Insel, P. A. (1990). Analgesic-antipyretics and antiinflammatory agents. En P. Insel, *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (págs. 638- 664). Pergamon Press.
- Isaka, M., Chinthanom, P., Kongthong, S., Srichomthong, K., & Choeyklin, R. (2013). Lanostane triterpenes from cultures of the Basidiomycete *Ganoderma orbiforme* BCC 22324. *Phytochemistry*, 133–139.
- Isaka, M., Chinthanom, P., Sappan, M., Chanthaket, R., Luangsa-Ard, J., Prabpai, S., y otros. (2011). Lanostane and Hopane Triterpenes from the Entomopathogenic Fungus *Hypocrella* sp. BCC 14524. *Journal of Natural Products*, 2143–2150.
- Islam, M., Al-Amin, Mahboob, A., & Akter, S. (2012). Isolation of Quercetin-3-o-beta-d-glucopyranoside from the Leaves of *Azadirachta Indica* and Antimicrobial and Cytotoxic screening of the Crude Extracts. *Dhaka Univ. J. Sci*, 11-14.
- Itabashi, M., Segawa, K., Ikeda, Y., Kondo, S., Naganawa, H., Koyano, T., y otros. (1999). A new bioactive steroidal saponin, furcreastatin, from the plant *Furcraea foetida*. *Carbohydrate Research*, 57-62.
- IUPAC-IUB. (1989). The nomenclature of steroids. *Eur J Biochem*, 429-458.
- Jaimes, D. (2010). *Evaluación in vitro de Compuestos Presentes en Critoniella acuminata y Salvia rubescens Frente a Enzimas de Desgranulación Leucocitaria*. (U. N. Colombia, Ed.) Bogotá: Tesis de maestría en ciencias farmacéuticas.
- Jun, D., Yujuan, Z., Mengmeng, B., Hongwei, L., & Li, L. (2010). Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 148–153.
- Just, M., Recio, M., Giner, R. M., Cuéllar, M., Mañez, S., A.R., B., y otros. (1998). Anti-inflammatory activity of unusual lupane saponins from *Bupleurum fruticosens*. *Planta Medica*, 404- 407.
- Kakuno, T., Yoshikawa, K., & Arihara, S. (1992). TRITERPENOID SAPONINS FROM ILEX CRENATA FRUIT. *Phytochemistry*, 3553- 3557.
- Kang, J., Sung, M., Kawada, T., Yoo, H., Kim, Y., Kim, J., y otros. (2005). Soybean saponins suppress the release of proinflammatory mediators by LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cancer lett.*, 219-227. .

- Killeen, G. F., Madigan, C. A., Connolly, C., Walsh, G., Clark, C., Hynes, M. J., y otros. (1998). Antimicrobial saponins of *Yucca schidigera* and the implications of their in vitro properties for their in vivo impact. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3178- 3186.
- Klein, N., Gazola, A., De Lima, T., Schenkel, E., Nieber, K., & Butterweck, V. (2014). Assessment of sedative effects of *passiflora edulis* f. *flavicarpa* and *passiflora alata* extracts in mice, measured by telemetry. *Phytotherapy Research*, 706- 713.
- Klein, N., Gazola, A., Monteiro deLima, T., Schenkel, E., Nieber, K., & Butterweck, V. (2013). Assessment of Sedative Effects of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* and *Passiflora alata* Extracts in Mice, Measured by Telemetry. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*.
- Lee, D., Noh, H., Choi, J., Lee, K., Lee, M., Lee, J., y otros. (2013). Anti-Inflammatory Cycloartane-Type Saponins of *Astragalus membranaceus*. *Molecules*, 3725-3732.
- Li, D., Lee, E., Kang, S., Hyun, J., & Whang, W. (2002). Activity-Guided Isolation of Saponins from *Kalopanax pictus* with Anti-inflammatory Activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 900-903.
- Li, H., & Chen, F. (2007). Application of High Speed Countercurrent Chromatography to the isolation of Bioactive Natural Products. En S. Colegate, & R. Molyneux, *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination* (pág. 267). Taylor & Francis group.
- Lizasoain, I. L. (1997). Los fármacos en el control de la inflamación. Nuevas perspectivas de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos. En D. D.-R. Espinós, *Inflamación y enfermedad* (págs. 171- 183). Editorial médica panamericana.
- Lopez, G. K. (2011). *ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ALGUNAS ESPECIES DE Passiflora*. (U. N. Colombia, Ed.) Bogotá, Colombia: Tesis de Maestría.
- Lutomski, J. M. (1975). Pharmacochemical investigation of the raw materials from *Passiflora* genus 2. Pharmacochemical. *Planta Medica*, 27, 112–121.
- Lutomski, J. M. (1975). Pharmacological investigations on raw materials of the genus *Passiflora*. *Planta Medica*, 27, 381–384.
- Ma, J., Chen, Q., Lai, D., Sun, W., Zhang, T., & Yoichiro, I. (2010). . Separation and purification of triterpene saponins from roots of *radix phytolaccae* by high-speed countercurrent chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 563-571.
- Madoglio, F. A. (2011). *Investigação fitoquímica das partes aéreas de Passiflora alata*. Florianópolis.
- Mahattanatawee K, M. J. (2006). Total antioxidant activity and fiber content of select Florida-grown tropical fruits. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54: 7355-63.
- Manna, S., Mukhopadhyay, A., & Van, N. (1999). Silymarin supresses TNF- induced activation of NF-kB, c-jun N- terminal kinase, and apoptosis. *The journal of immunology*, 6800- 6809.
- Manrique, K. (2012). *Caracterización de Flavonoides C-glicosidados en el Extracto Acuoso de Hojas de Passiflora ligularis (granadilla)*. (U. N. Colombia, Ed.) Bogotá, Colombia: Tesis de pregrado.
- Martín, F. y. (1970.). The edible species of *Passiflora*. *Economical Botany*, 24, 333- 343.
- Martindale: The Extra Pharmacopoeia*. Royal Pharmaceutical Society,. (1996). Londres: Reynolds, J. E. F.
- Masteikova, R., Bernatoniene, J., & Velziene, S. (2008). ANTIRADICAL ACTIVITIES OF THE EXTRACT OF *PASSIFLORA INCARNATA*. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 577-583.

- Medina, J. H., Paladini, A., Wolfman, C., Levi, D. S., D., C., & Diaz, L. (1990). Chrysin (5, 7-di-OH-flavone) a naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors with anticonvulsant properties. *Biochem. Pharmacol.*, 40-10: 2227-2231.
- Mercadente, A., Britton, G., & Rodriguez, A. (1998). Carotenoids from yellow Passion fruit (*Passiflora*). *Journal of Agriculture and Food*, 46, 4102–4106.
- Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*, 673–751.
- Montanher, A., Zucolotto, S., Schenkel, E., & Fröde, T. (2007). Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. *J Ethnopharmacol.* , 281-288.
- Moreno, A. (2013). *Estudios químicos de saponinas presentes en el extracto acuoso de las hojas de Passiflora ligularis (granadilla)*. (U. N. Colombia, Ed.) Bogotá: Tesis de pregrado.
- Muñoz, A. (Julio de 2007). <http://cajamarcateorias.blogspot.com.co/>. Obtenido de <http://cajamarcateorias.blogspot.com.co/2007/07/enfermedades-en-granadilla.html>
- Naf, F. D. (1977). Structure and synthesis of two novel ionones identified in the purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Tetrahedron Letters*, 16, 1413–1416.
- Nakata, T., Taji, S., Yamada, T., & Tanaka, R. (2009). New Lanostane Triterpenoids, Inonotsutriols D, and E from *Inonotus Obliquus*. *Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences*, 53- 64.
- Nardi GM, S. J. (2007). Antioxidant and anti-inflammatory effects of products from *Croton celtidifolius* Bailon on carrageenan-induced pleurisy in rats. *Phytomedicine*, 115 - 122.
- Nassiris-Asl, M., Shariati-Rad, S., & Zamansoltani, F. (2007). Anticonvulsant effects of aerial parts of *Passiflora incarnata* extract in mice: involvement of benzodiazepine and opioid receptors. *BMC Complementary & alternative medicine*.
- Navarro, P., Giner, R., Recio, M., Máñez, S., Cerdá-Nicolas, M., & Ríos, J. (2001). In vivo anti-inflammatory activity of saponins from *Bupleurum rotundifolium*. *Life sciences*, 1199–1206.
- Navarro, S., Sandoval, A., & Forero, F. (2014). Potencial antioxidante y antimicrobiano de extractos acuosos e hidroalcohólicos de granadilla (*Passiflora ligularis*). *Acta Agronómica*, 63(3).
- Newman DJ, C. G. (2003). 2003. *J Nat Prod*, 1022 -1037.
- Nicolls, J., Birner, J., & Forsell, P. (1973). Passicol, an Antibacterial and Antifungal Agent Produced by *Passiflora* Plant Species: Qualitative and Quantitative Range of Activity. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, 110- 117.
- Nishioka, H., Moto, M., Sawa, T., Hamada, M., Naganawa, H., Takeuchi, T., y otros. (1989). Screening of phosphatidyl-inositol kinase inhibitors from *Streptomyces*. *J. Antibiot.*, 823-825.
- Nitz, S., Kollmannsberger, H., & Drawert, F. (1990). Determination of nonnatural flavors in sparkling fruit wines. Part 2. Enantiomeric gammalactones. *Chemical and Microbial Technology Lebensm*, 105- 110.
- Ocampo J, G. C. (2007). Diversity of Colombian Passifloraceae: biogeography and an updated list for conservation. *Biota Colombiana*, 8(1):1-45.
- Ocampo, J. (2013). Diversidad y distribución de las Passifloraceae en el departamento del Huila en Colombia. *Acta biol. Colomb*, 511-516.
- Ocampo, J. G. (2004). AFLPs analysis for the study of genetic relationships among cultivated *Passiflora* species of the subgenera *Passiflora* and *Tacsonia*. *Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture*, 48, 72-76.

- Ocampo, J. G. (2007). Diversity of Colombia Passifloraceae: biogeography and an updated list for conservation. *Biota*, 1-45. .
- Oda, K., Matsuda, H., Murakami, T., Katayama, S., Ohgitani, T., & Yoshikawa, M. (2000). Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. *Biological Chemistry*, 67- 74.
- Oga, S. d. (1984). Pharmacological trials of crude extracts of *Passiflora alata*. *Planta Medica*, 51, 303–306.
- Oka, H., & Ito, Y. (2005). Systematic selection of Solvent Systems for High Speed Countercurrent Chromatography. En J. Cazes, *Encyclopedia of chromatography* (págs. 461-469). U.S.A: Taylor & Francis .
- Oldham, K., & Bowen, P. (1998). Oxidative Stress in Critical Care: Is Antioxidant Supplementatio Beneficial? *Journal of the American Dietetic Association*(98), 1001-1008.
- Orsini, F., Pelizzoni, F., & Verotta, L. (1986). QUADRANGULOSIDE, A CYCLOARTANE TRITERPENE GLYCOSIDE FROM *Passiflora quadrangularis*. *Phytochemistry*, 25(1), 191- 193.
- Orsini, F., Pelizzoni, F., Ricca, G., & Verotta, L. (1987). Triterpene glycosides related to quadranguloside from *Passiflora quadrangularis*. *Phytochemistry*, 25, 1101-1105.
- Ortega T, C. M. (1996). Antiinflammatory activity of ethanolic extracts of plants used in traditional medicine in Ecuador. *Phytoter Res* .
- Osorio, C., Duque, C., & Fujimoto, Y. (2000). Oxygenated monoterpenoids from badea (*Passiflora quadrangularis*) fruit pulp. *Phytochemistry*, 97-101.
- Parra, N., Ocampo, J., & Hernandez, J. (2014). Caracterizacion y analisis de la variabilidad genética de la granadilla (*Passiflora ligularis* juss.) en Colombia empleando marcadores microsatélites. *Rev. Bras. Frutic*.
- Patel, S., Soni, H., Mishra, K., & Singhai, A. (2011). Recent updates on the genus *Passiflora*: A review. *Int. J. Res. Phytochem. Pharmacol.* , 1-16.
- Perez, E. D., López, A., & Calvo, M. (s.f.). *Bases farmacológicas y tratamiento de la inflamación*. España.
- Qiao, Y., Zhang, X.-m., & Qiu, M.-h. (2007). Two Novel Lanostane Triterpenoids from *Ganoderma Sinense*. *Molecules*, 2038-2046.
- Raffaelli, A., Moneti, G., Mercati, V., & Toja, E. (1997). Mass spectrometric characterization of flavonoids in extracts from *Passiflora incarnata*. *Journal of Chromatography A*, 223–231.
- Ramaiya, S. D., Bujang, J. S., & Zakaria, M. H. (2014). Assessment of Total Phenolic, Antioxidant, and Antibacterial Activities of *Passiflora* Species. *Hindawi Publishing Corporation*.
- Ramos, F. A., Castellanos, L., Lopez, C., Duque, C., Pacheco, R., & Guzman, A. (2010). An Orientin Derivative Isolated from *Passiflora* var. *mollissima*. *Latin American Journal of Pharmacy*, 29, 141- 143.
- Rayyan, S., Fossen, T., Solheim, H., & Andersen, Q. (2005). Isolation and Identification of Flavonoids, Including Flavone Rotamers, From The Herbal Drug 'Crataegi Folium Cum Flore' (Hawthorn). *Phytichemical Analysis* , 334-331.
- Reginato, F., Kauffmann, C., Schripsema, J., Guillaume, D., Gosmann, G., & Schenkel, E. (2001). Steroidal and Triterpenoidal Glucosides from *Passiflora alata*. *J. Braz. Chem. Soc*, 12(1), 32- 36.
- Reina E, R. F. (2013). Anti-inflammatory R-prostaglandins from Caribbean Colombian soft coral *Plexaura homomalla*. *J Pharm Pharmacol.*, 1643-52.

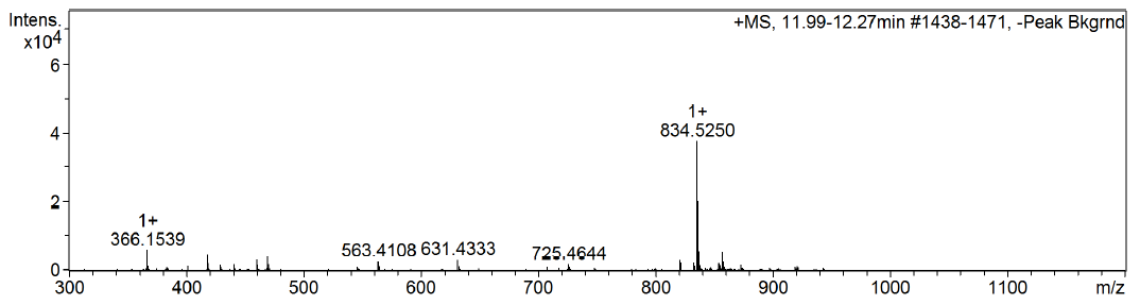
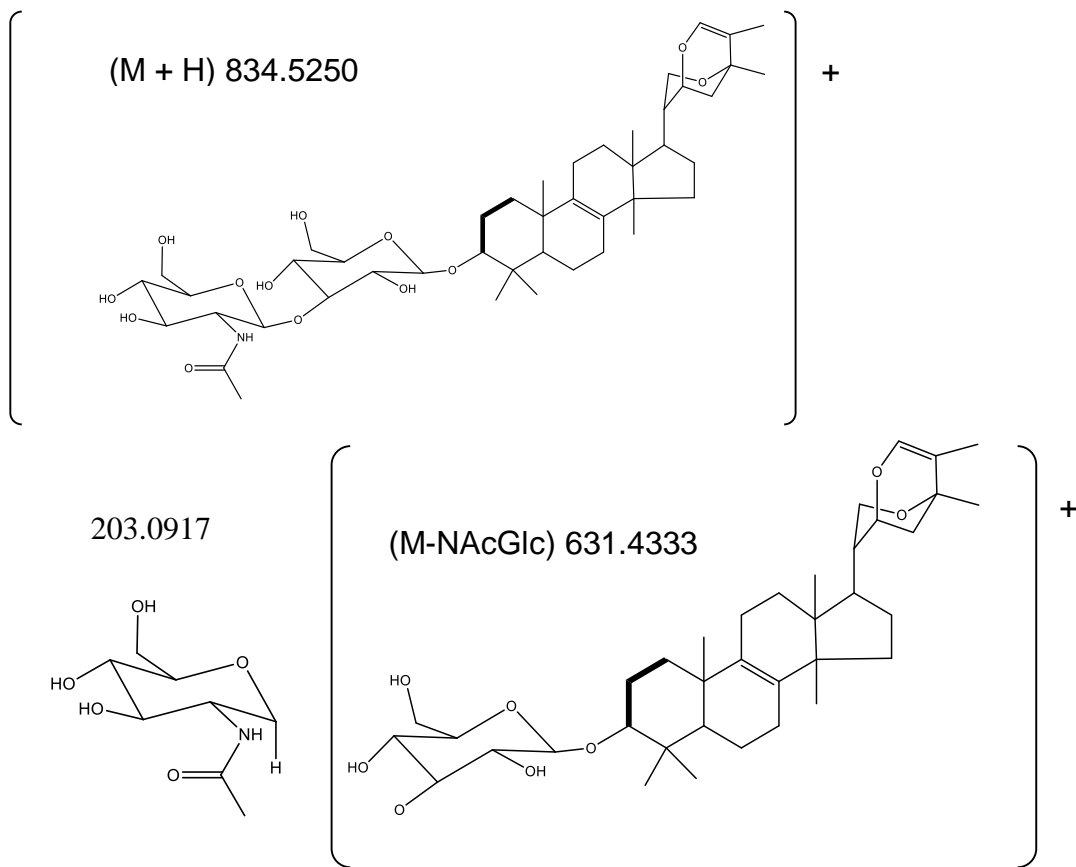
- Reina, E. (2011). *Estudio de bioprospección de octocorales de los géneros Eunicea y Plexaura del caribe colombiano, como fuente de metabolitos con actividad antiinflamatoria*. (T. d. Maestría, Ed.) Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Robbins, S., Cotran, L., & Kumar, V. (1998). *Patología estructural y funcional* (Sexta ed.). Mcgraw Hill.
- Sakalem, M. E., Negri, G., & Tabach, R. (2013). Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the Passiflora genus. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22, 1219-1232.
- Santangelo, C., Vari, R., & Scazzocchio, B. (2007). Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita*, 394–405.
- Sasikala, V., Saravanan, S., & Parimelazhagan, T. (2011). Analgesic and anti-inflammatory activities of Passiflora foetida L. *Asian Pac J Trop Med*, 600-603.
- Setty AR, S. L. (2005). Herbal Medications Commonly Used in the Practice of Rheumatology: Mechanisms of Action, Efficacy, and Side Effects. *Seminars Arthritis Rheum*, (págs. 773 - 784.).
- Shoi, S.-J., Tai, B., Cuong, N., Kim, Y., & Jang, D. (2012). Antioxidative and Anti-inflammatory Effect of Quercetin and Its Glycosides Isolated from Mampat (*Cratoxylum formosum*). *Food Sci. Biotechnol*, 21, 587-595.
- Silva, D., Freitas, A. M., Barros, F. N., Lins, K. O., Alves, A. P., Alencar, N. M., y otros. (2013). Polysaccharide isolated from Passiflora edulis: Characterization and antitumor. *Carbohydrate Polymers*, 87, 139- 145.
- Simirgiotis, M. J., Schmeda- Hirschmann, G., Bórquez, J., & Kennelly, E. J. (2013). The Passiflora tripartita (Banana Passion) Fruit: A Source of Bioactive Flavonoid. *C-Glycosides Isolated by HSCCC and Characterized by HPLC–DAD–ESI/MS/MS*, 18, 1672- 1692.
- Sirtori, C. R. (2001). Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. *Pharmacol Res*, 183 - 193.
- Sparg, S., Light, M. E., & Van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 219- 243.
- Strand, V., Kimberly, R., & Isaacs, J. D. (2007). Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future direction. *Nature Ver. Drug. Discov.*, 75- 92.
- Tapondjou, A., Miyamoto, T., Mirjolet, F., Guilbaud, N., & Lacaille-Dubois, M. (2005). Pursaethosides A–E, Triterpene Saponins from Entada pursaetha. *J. Nat. Prod*, 1185–1190.
- Tincani, A., Andreoli, L., Bazzani, C., Bosiso, D., & Sozzanib, S. (2007). Inflammatory molecules: A target for treatment of systemic autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.*, 7, 1-7.
- Ukiya, M., Akihisa, T., Yasukawa, K., Tokuda, H., Suzuki, T., & Kimura, Y. (2006). Anti-Inflammatory, Anti-Tumor-Promoting, and Cytotoxic Activities of Constituents of Marigold (*Calendula officinalis*) Flowers. *J. Nat. Prod.*, 1692-1696.
- Ulubelen, A., Oksuz, S., Mabry, T. J., Dellamonica, G., & Chopin, J. (1982). glycosylflavonoids from Passiflora pittieri, P. alata, P. ambigua and a Adenia manii. *Journal of Natural Products*, 45(6), 783.
- Vane, R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of aspirin like drugs. *Nat. New Biol.*, 232-235.
- Vikram, A., Jayaprakasha, G. K., Jesudhasan, P. R., Pillai, S., & Patil, B. (2010). Suppression of bacterial cell–cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 515- 527.
- Villalba, R., Gómez, J., & Parra, M. (2006). *Manual técnico cultivo de granadilla*. Huila: Litocentral Ltda.

-
- Wang, H., Gao, J., Kou, J., & Zhu, D. (2008). Anti-inflammatory activities of triterpenoid saponins from *Polygala japonica*. *Phytomedicine*, 321–326.
- Wang, L. K., Zheng, C.-J. L., Chen, G., Han, C., Chen, W., & Song, X. (2014). Two New Lanostane Triterpenoids from the Branches and Leaves of *Polyalthia oblique*. *Molecules*, 7621-7628.
- Ward, P. A. (2010). PART I. The Inflammatory Response – an Overview. En C. Serhan, P. A. Ward, & D. W. Gilroy, *Fundamentals of inflammation* (pág. 1). Reino Unido: Cambridge University Press.
- Welton, A., Tobias, L., & Fiedler-Nagy, C. (1986). *Effect of flavonoids on arachidonic acid metabolism*. (E. M. V Cody, Ed.) New York: ALAN R. LISS, INC.
- Wiseman, H. (2006). *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications*. .
- Woo KJ, J. Y.-k. (2004). Chrysin induced apoptosis is mediated through caspase activation and akt inactivation in U937 leukemia cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 325-334: 1215-.
- Wu CF, B. X. (2007). Differential effects of ginsenosides on NO and TNF- production by LPS-activated N9 microglia. *Int Immunopharmacol*, 313- 320.
- Xu, L., Wang, H., & Yuan, Z. (2008). Triterpenoid saponins with anti-inflammatory activity from *Codonopsis lanceolata*. *Planta medica*, 1412-1415.
- Yoon, J., & Baek, S. (2005). Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med J*, 585–596.
- Yoshikawa, K., Katsuta, S., Mizumori, J., & Arihara, S. (2000). Four Cycloartane Triterpenoids and Six Related Saponins from *Passiflora edulis*. *Journal of Natural Products*, 63, 1229–1234.
- Zanoli, P., Avallone, R., & Baraldi, M. (2000). Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin. *Fitoterapia*, 71-81.
- Zucolotto, S. M., Fagundes, C., Reginatto, F. H., Ramos, F. A., Castellanos, L., Duque, C., y otros. (2012). Analysis of C-glycosyl Flavonoids from South American *Passiflora* Species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochemical Analysis*, 23, 232-239.
- Zucolotto, S. M., Goulart, S., Montanher, A. B., Reginatto, F. E., Schenkel, E. P., & Fröde, T. S. (2009). Bioassay-Guided Isolation of Anti-Inflammatory C-Glycosylflavones from *Passiflora edulis*. *Planta Médica*, 75, 1-6.

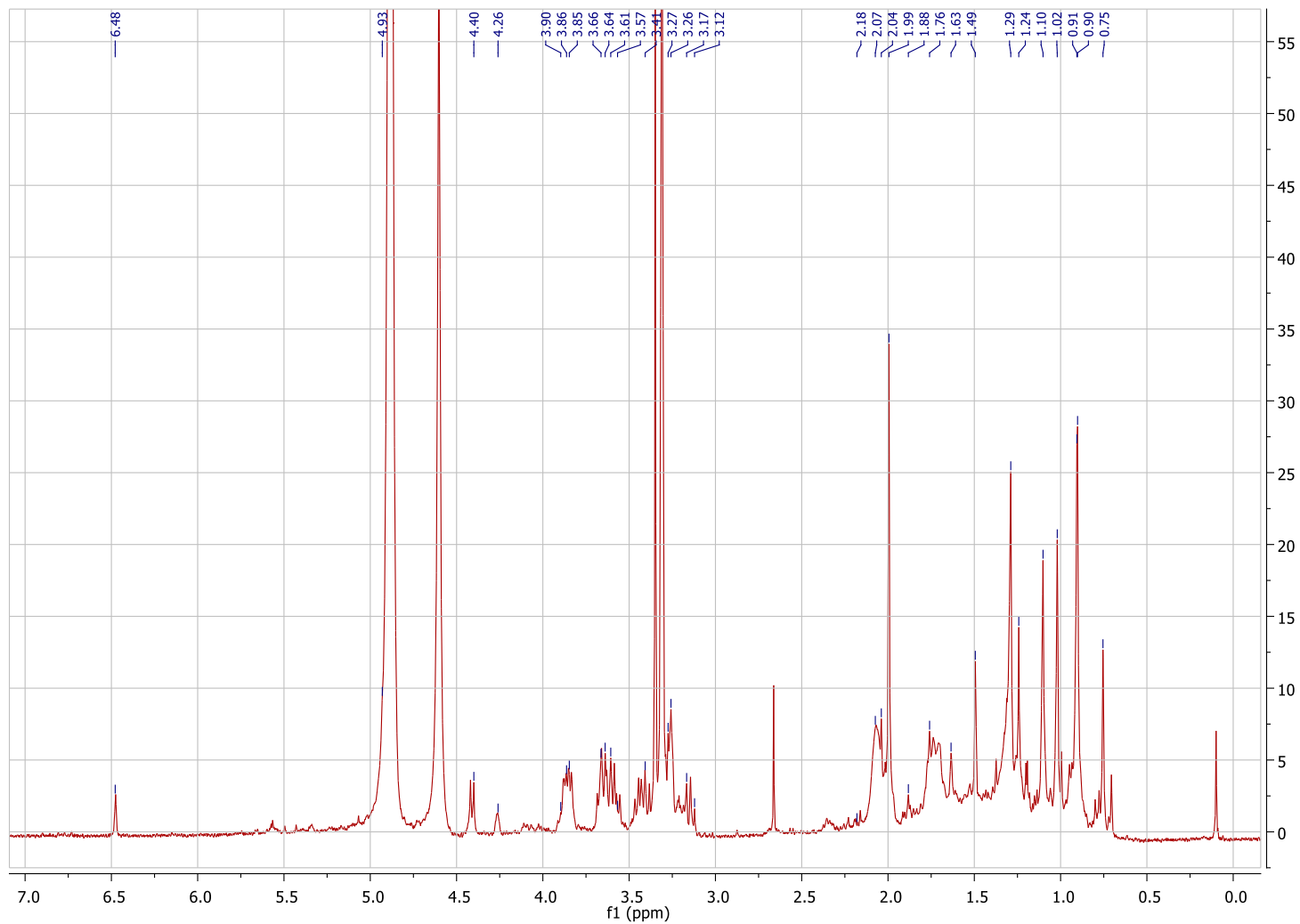
6.Anexos

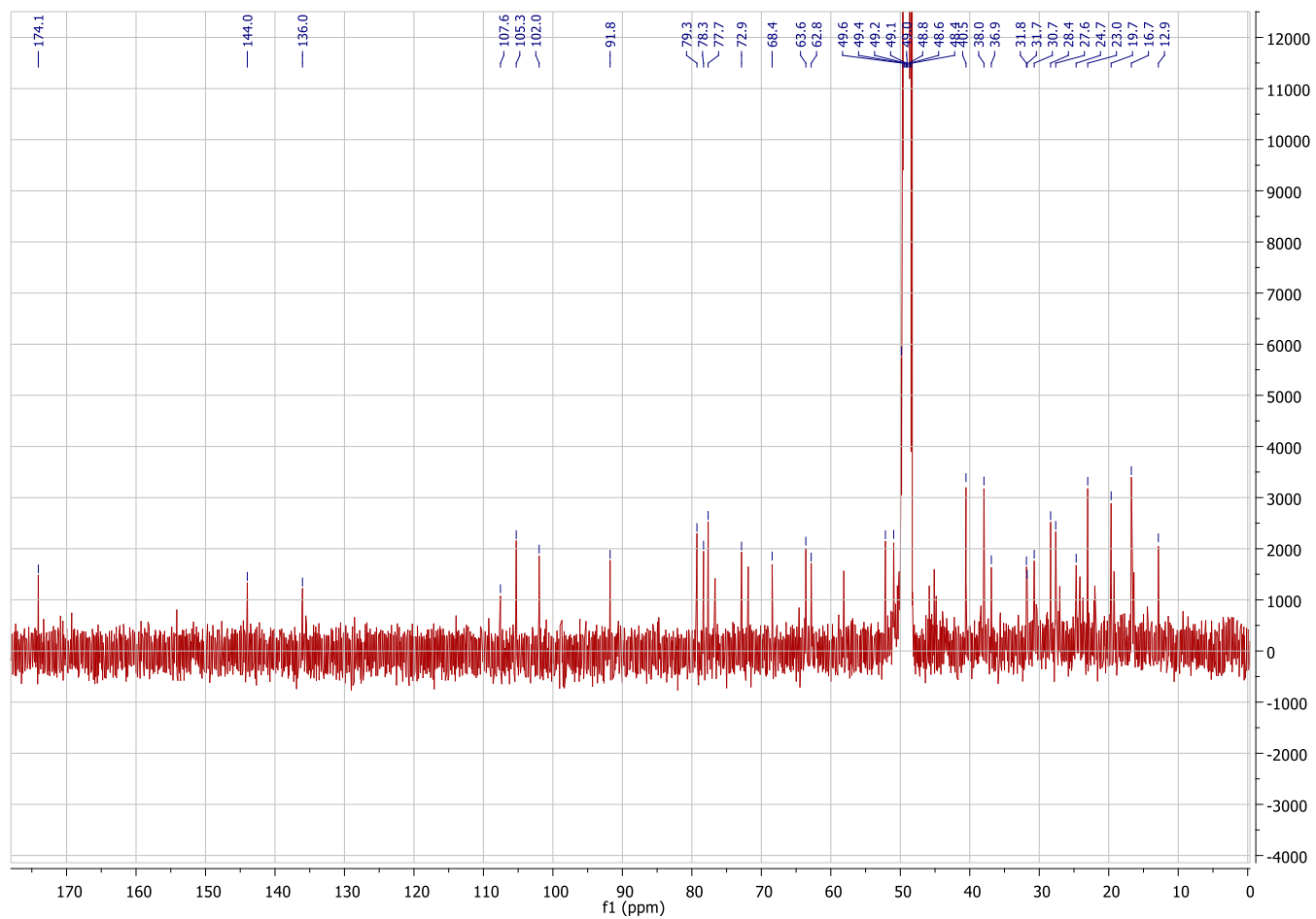
ANEXO 1: Mezclas de solventes utilizados para HSCCC de la fracción butanólica del extracto acuoso de *P. ligularis*

Sistema	SOLVENTES						
	Acetato de etilo	Butanol	Hexano	Agua	Cloroformo	Metanol	Isopropanol
1	5		1	5		1	
2	5		1	5		1.5	
3	5		1	5		2	
4	5		1	5		2.5	
5	5	0.5		5			
6	5	1		5			
7	5	2		5			
8	5	2.5		5			
9	5	3		5			
10	5			5			
11	3.5	1.0		4.4		1.1	
12				3	3	1	2
13				3	3	2	2
14				3	3	3	2
15				4	10	4	1
16				3	3	2	2
17				2	4	4	
18		40	1	20			
19		4	3	7			
20		5	3	10			

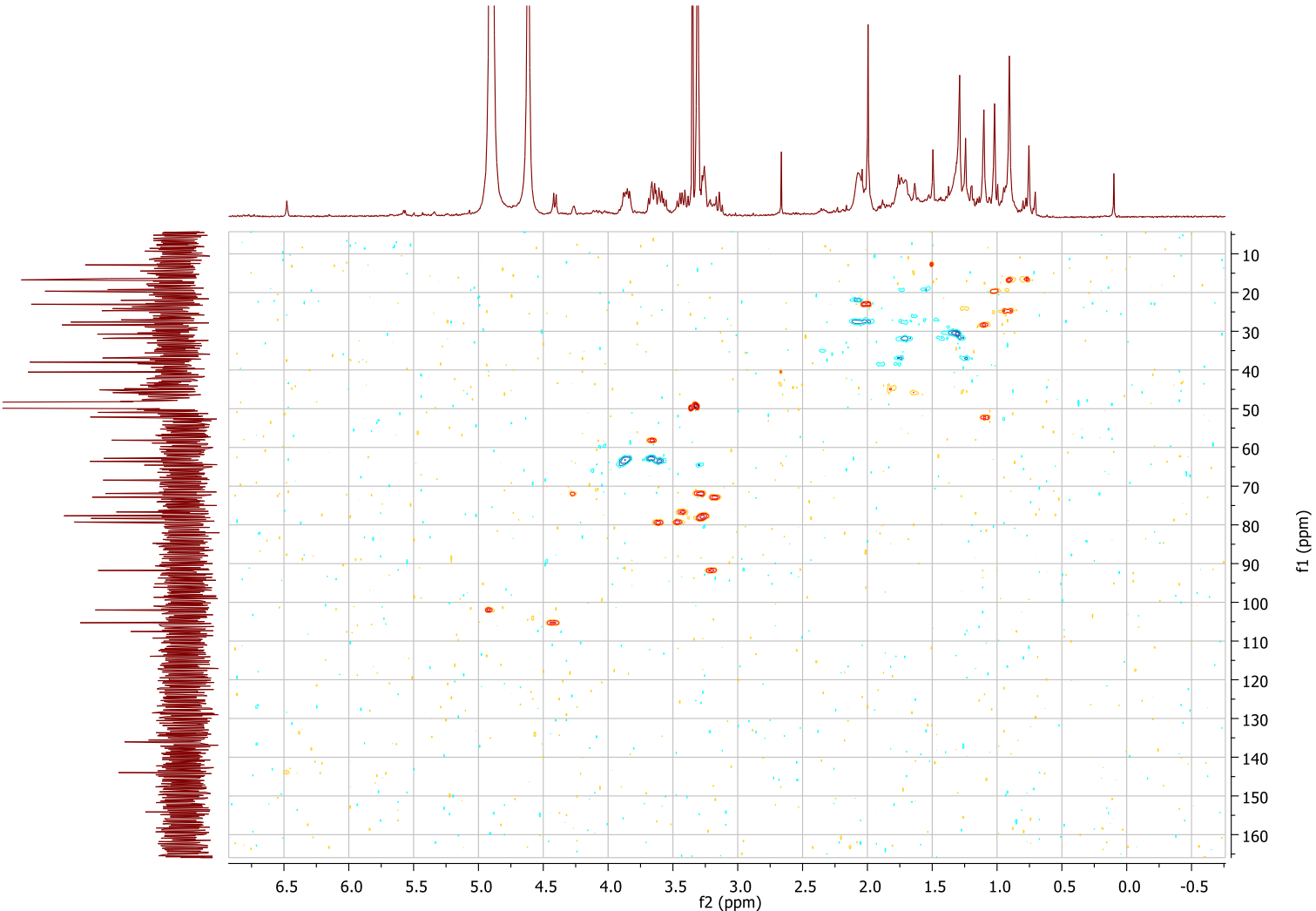
ANEXO 2: Espectro de masas del compuesto 1 en modo ESI (+)**Fragmentaciones de masas propuestas para el compuesto 1**

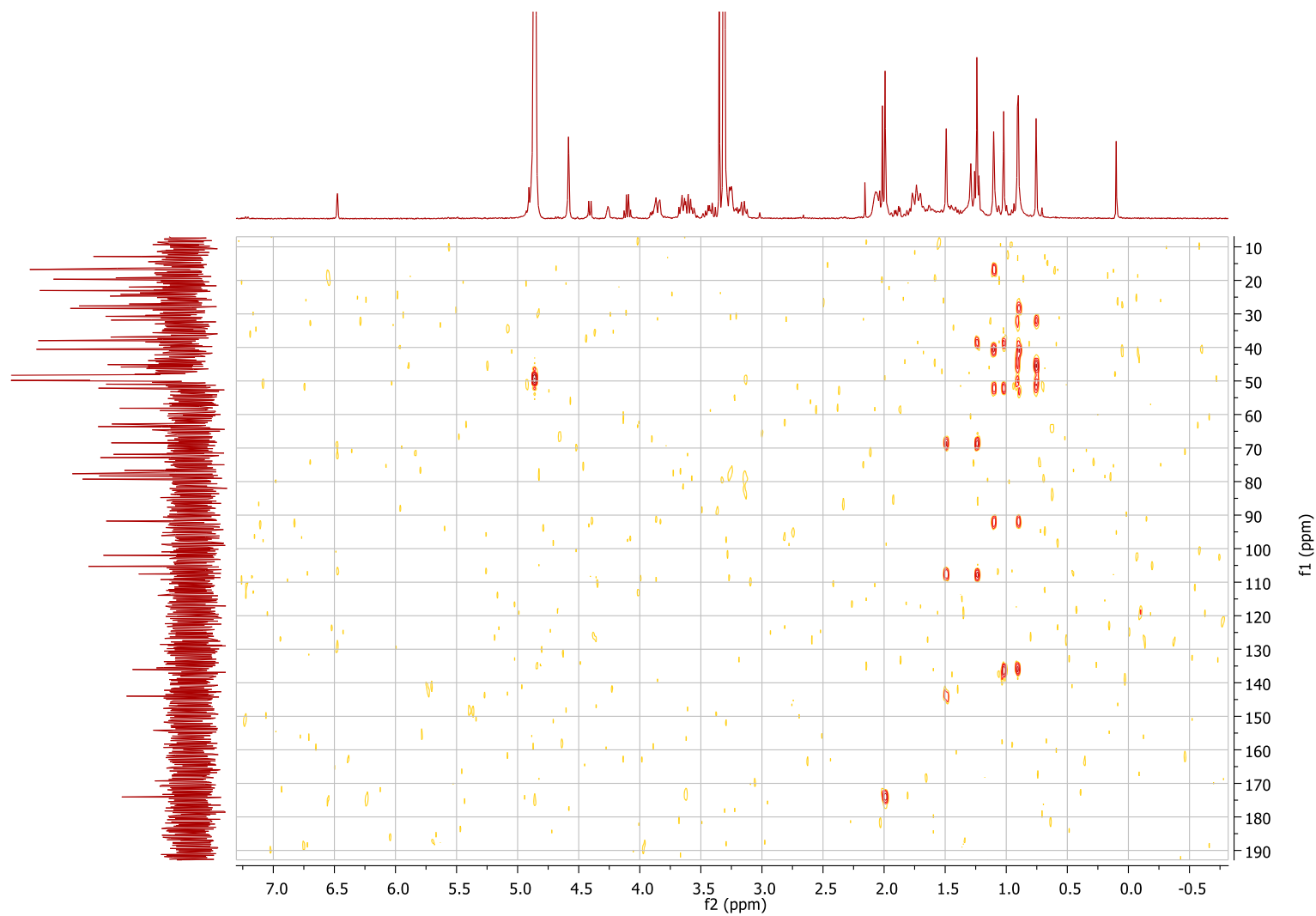
ANEXO 3: Espectro RMN-H del compuesto 1 en CD₃OD, 400MHz



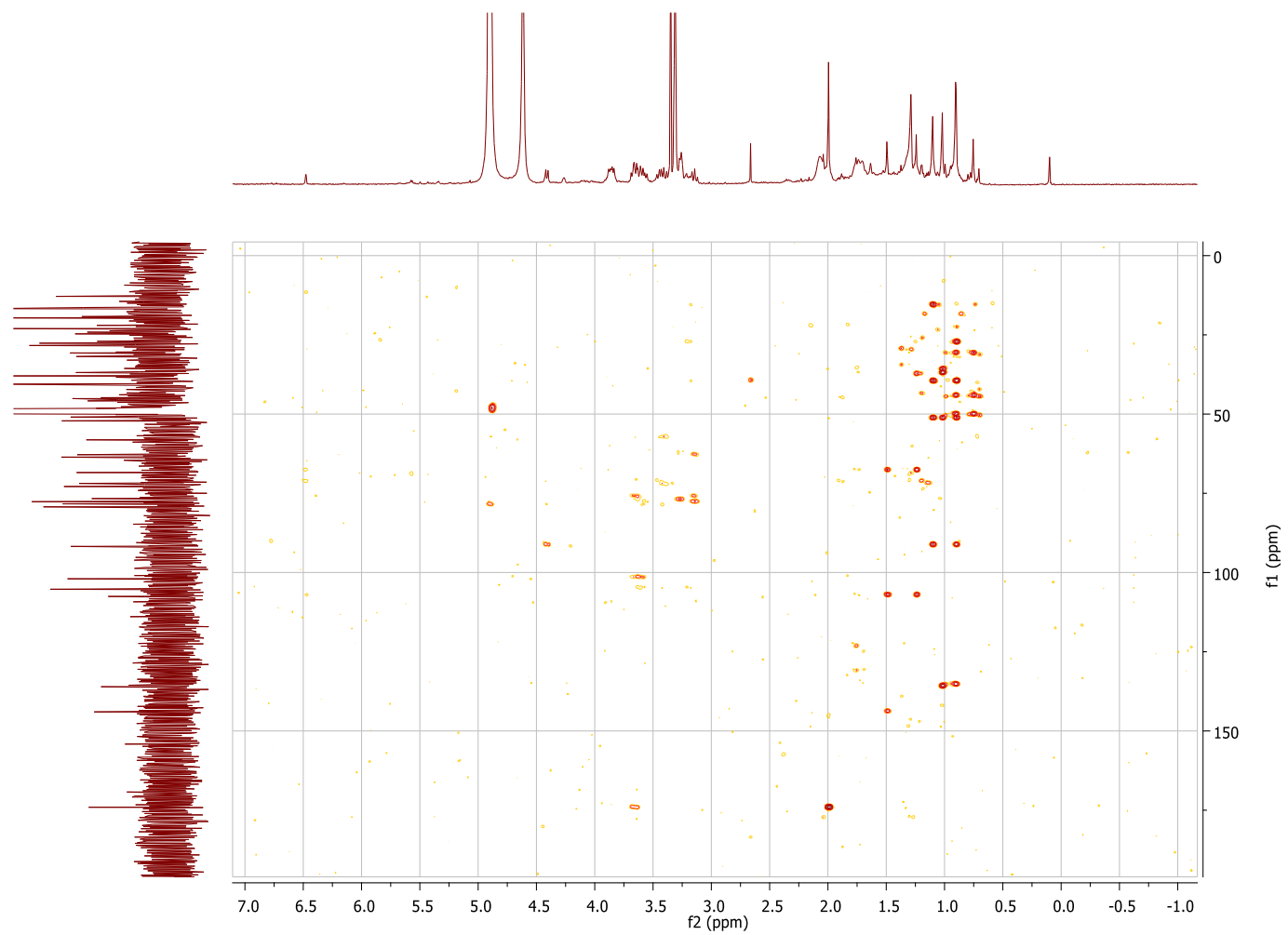
ANEXO 4: Espectro RMN-¹³C del compuesto 1 en CD₃OD, 100MHz

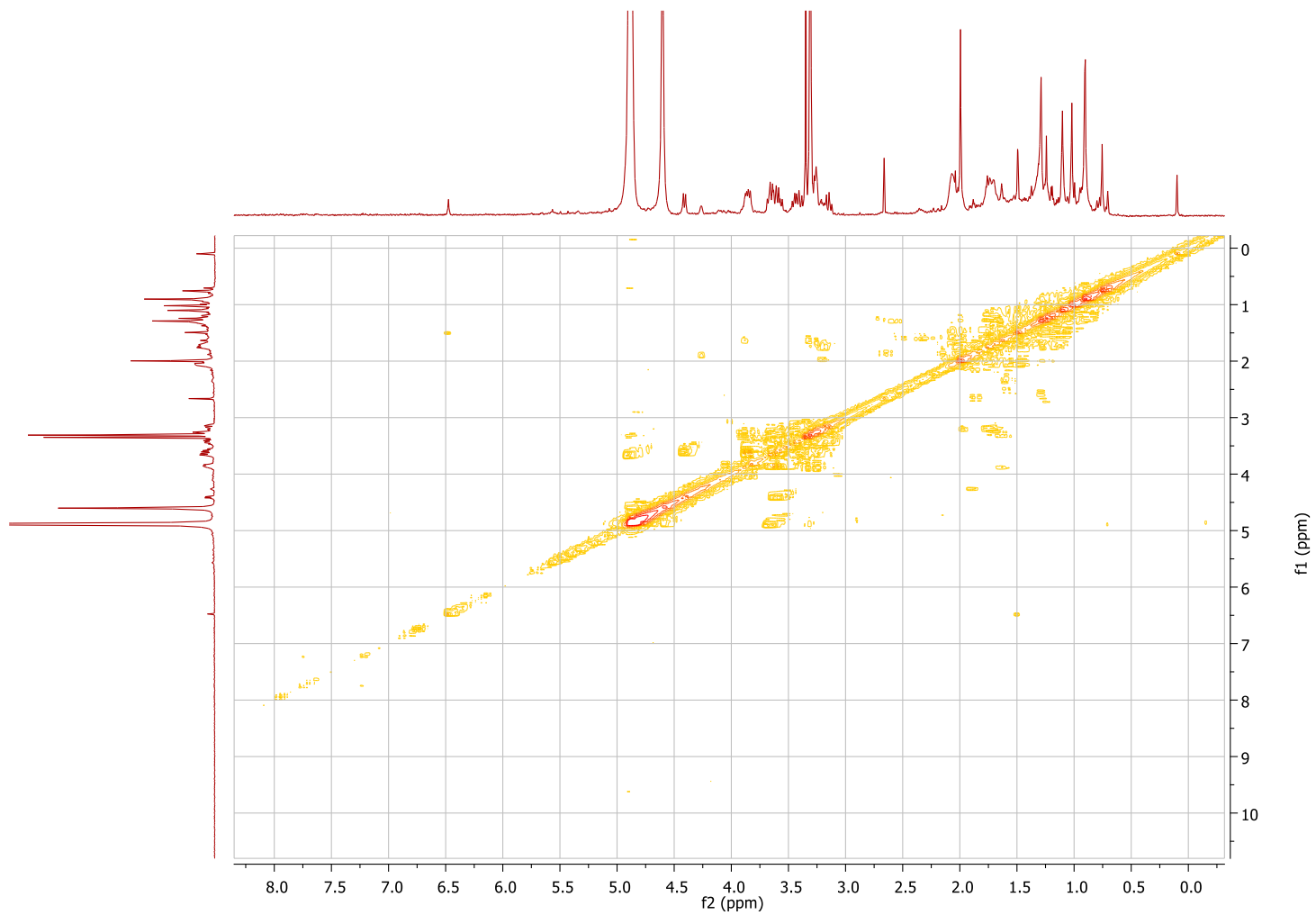
ANEXO 5 Espectro de HSQC del compuesto **1** CD₃OD 400MHz



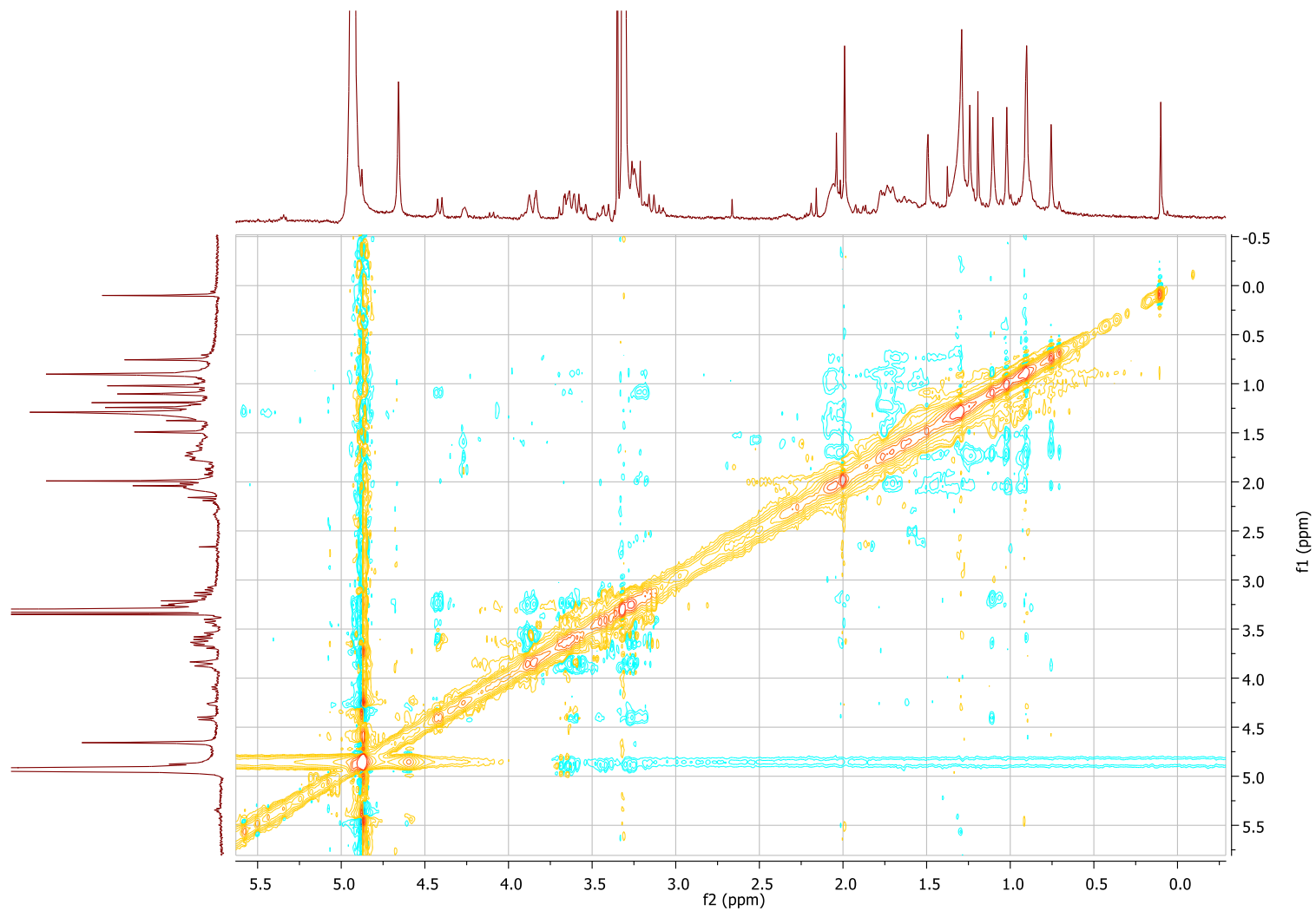
ANEXO 6a: Espectro de HMBC J= 10Hz del compuesto 1 CD₃OD 400MHz

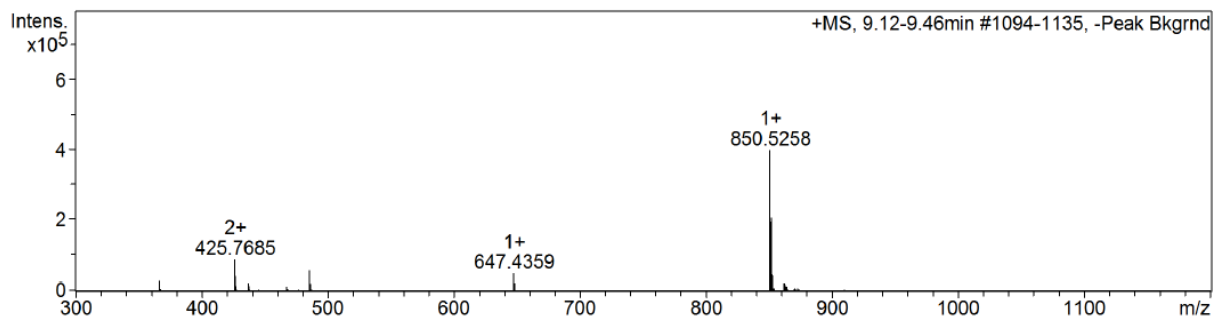
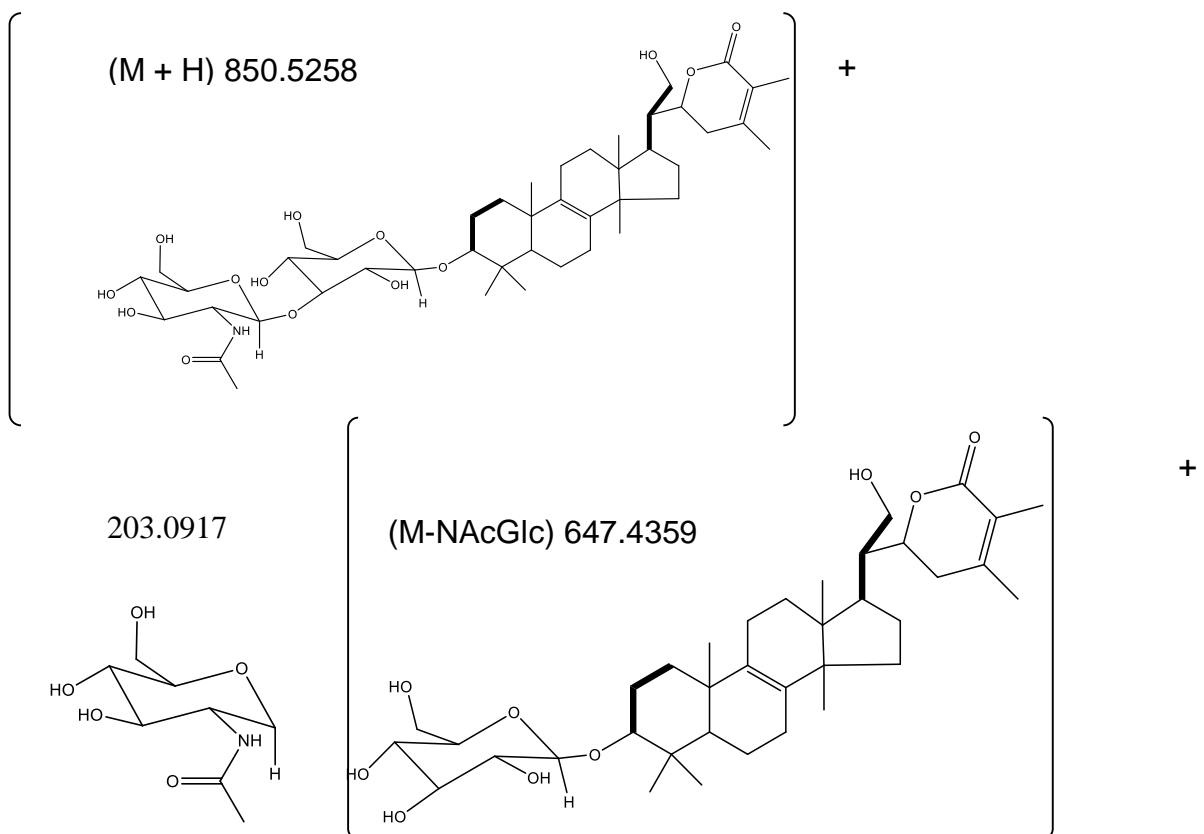
ANEXO 6b: Espectro de HMBC J= 5Hz del compuesto 1 CD₃OD 400MHz



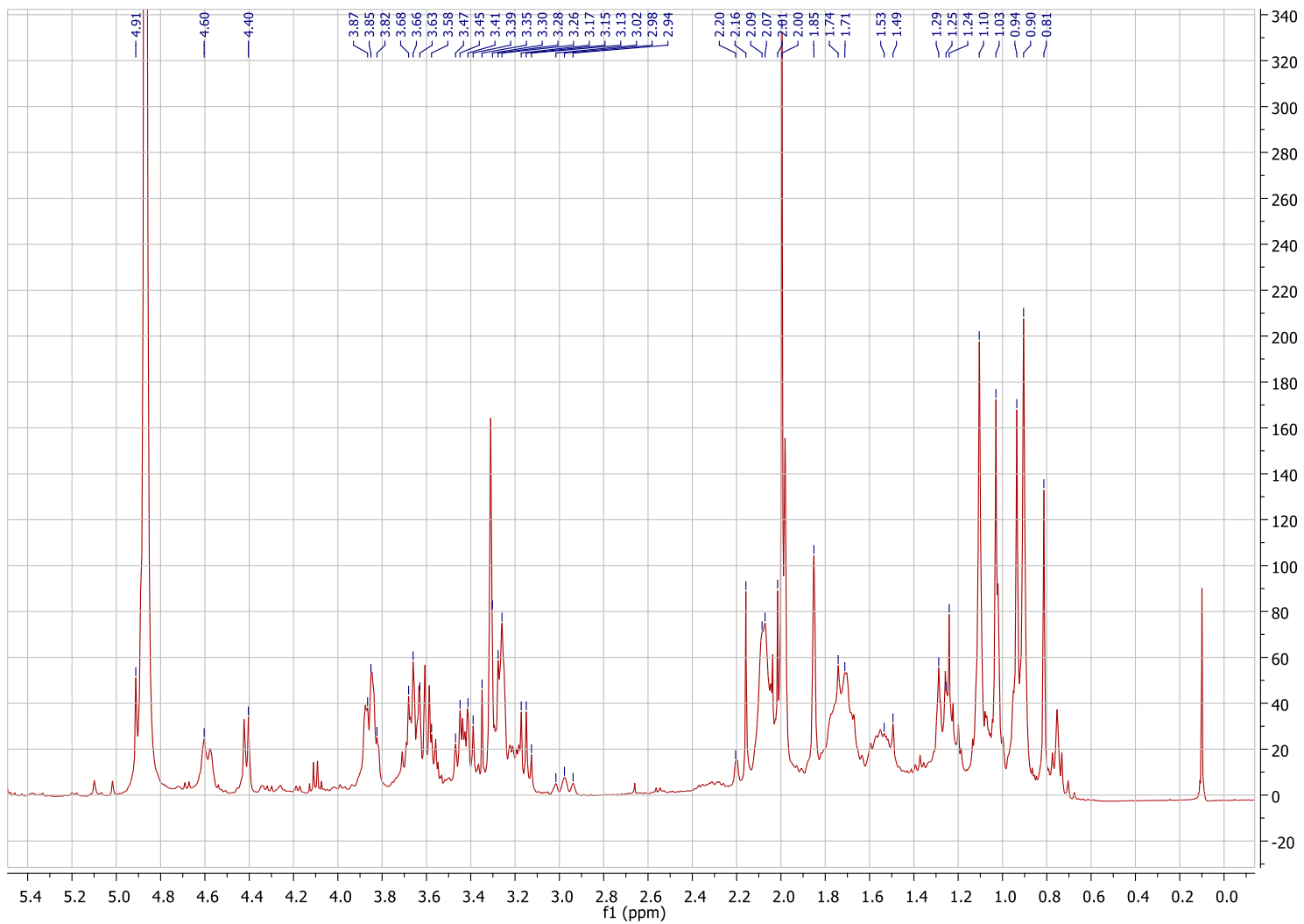
ANEXO 7: Espectro de COSY del compuesto1 CD₃OD 300MHz

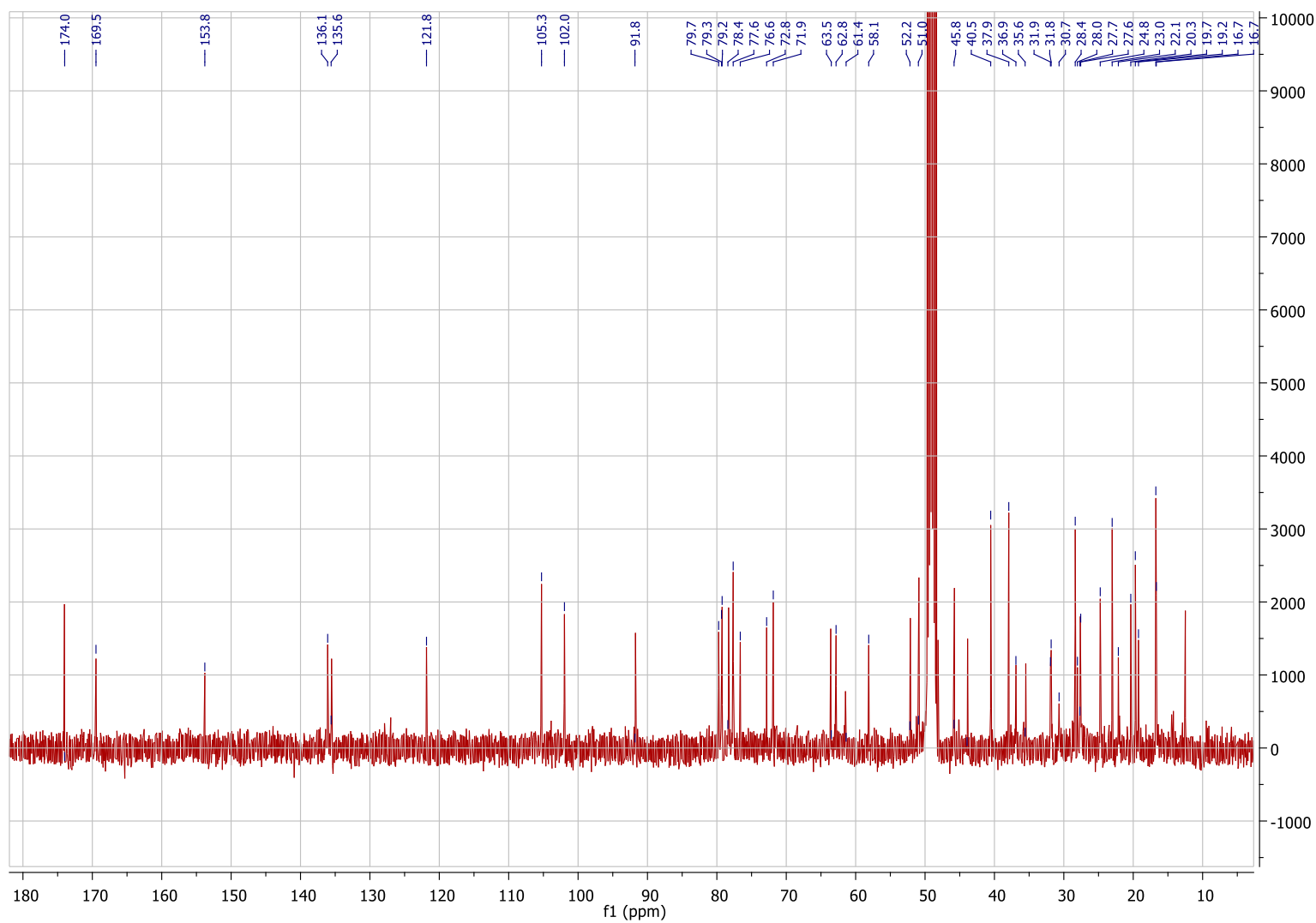
ANEXO 8: Espectro NOESY del compuesto **1** en CD₃OD, 300MHz



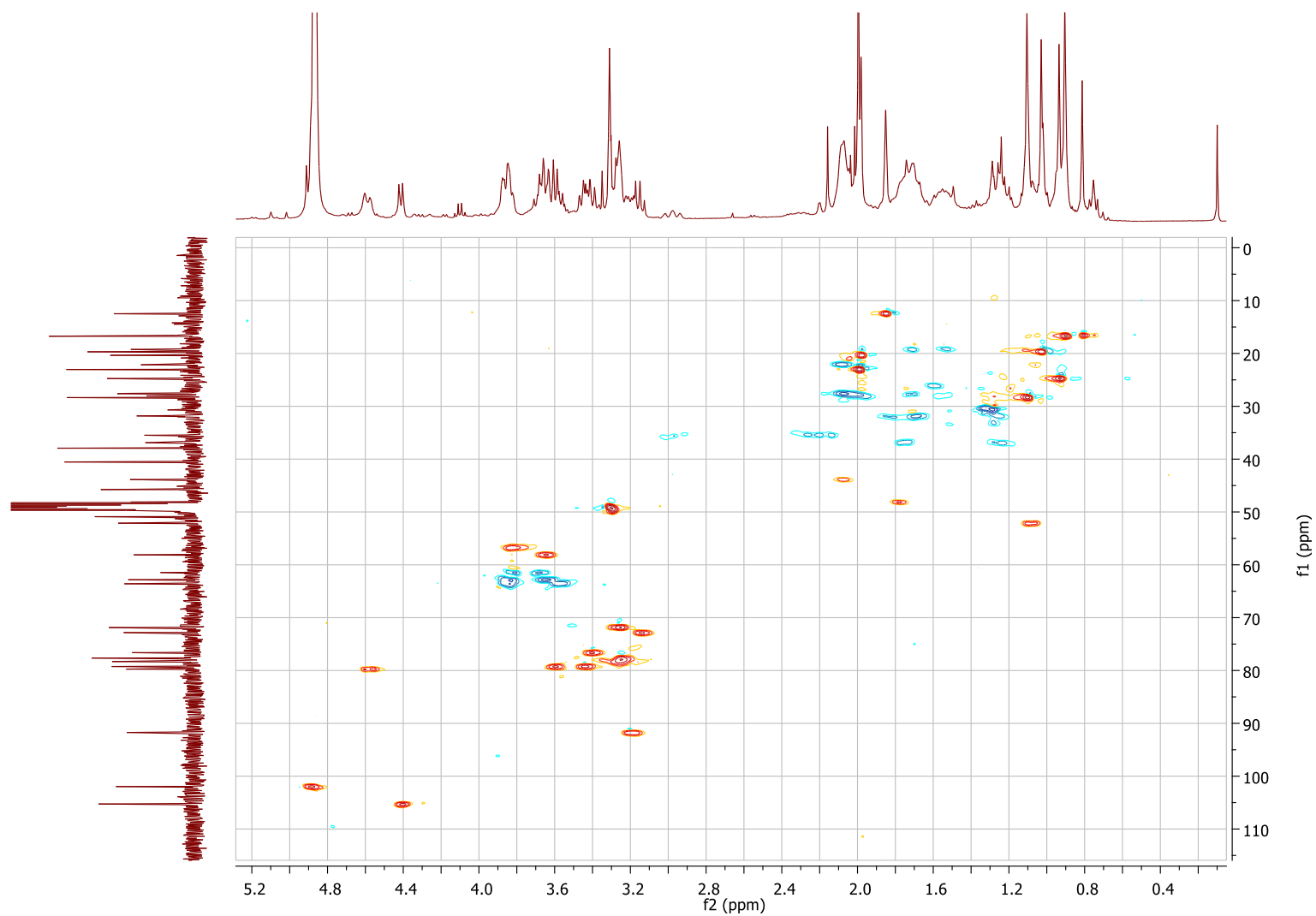
ANEXO 9: Espectro de masas del compuesto 2 en modo ESI (+)**Fragmentaciones de masas propuestas para el compuesto 1**

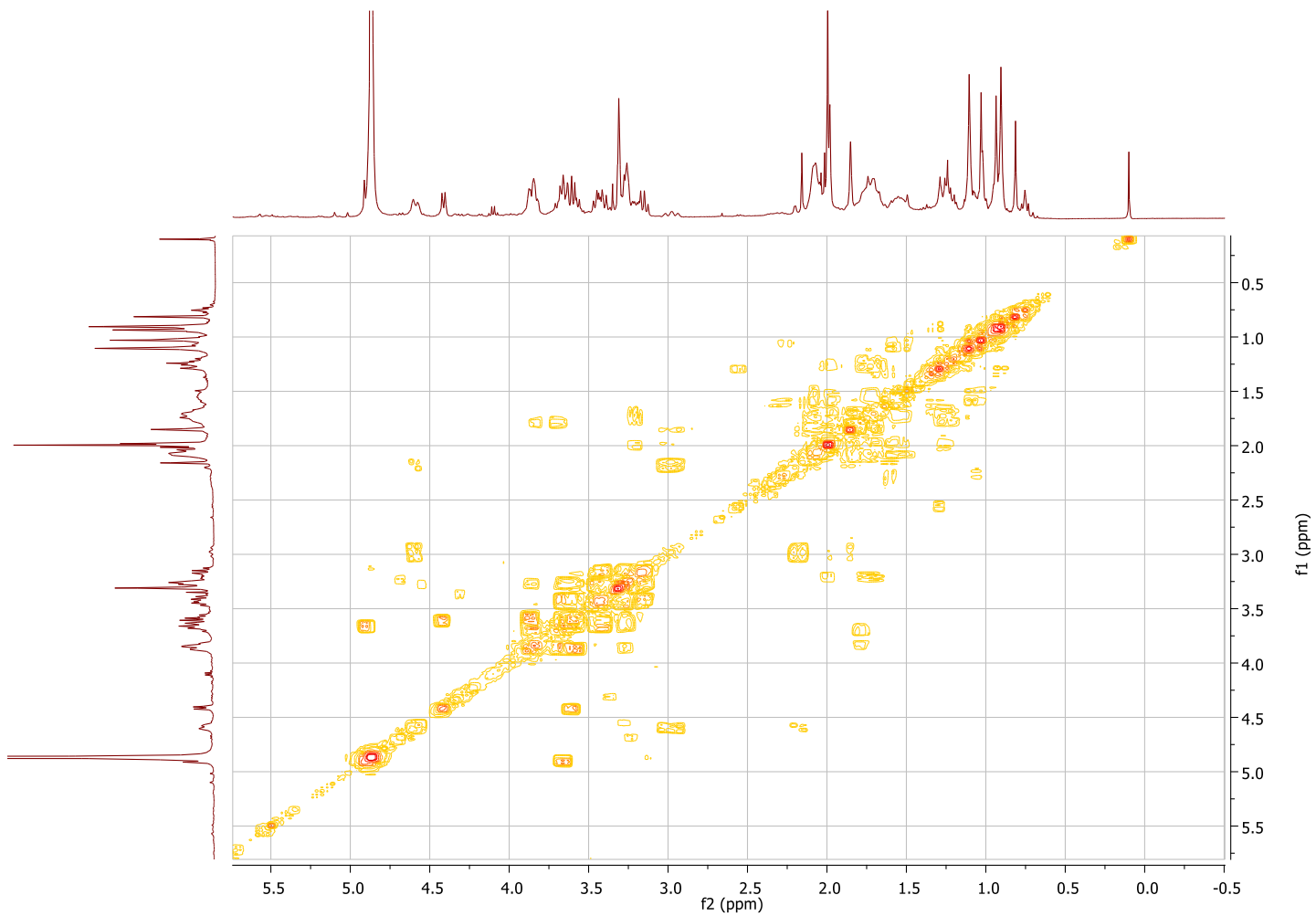
ANEXO 10: Espectro de RMN-H del compuesto 2 en CD₃OD, 400MHz



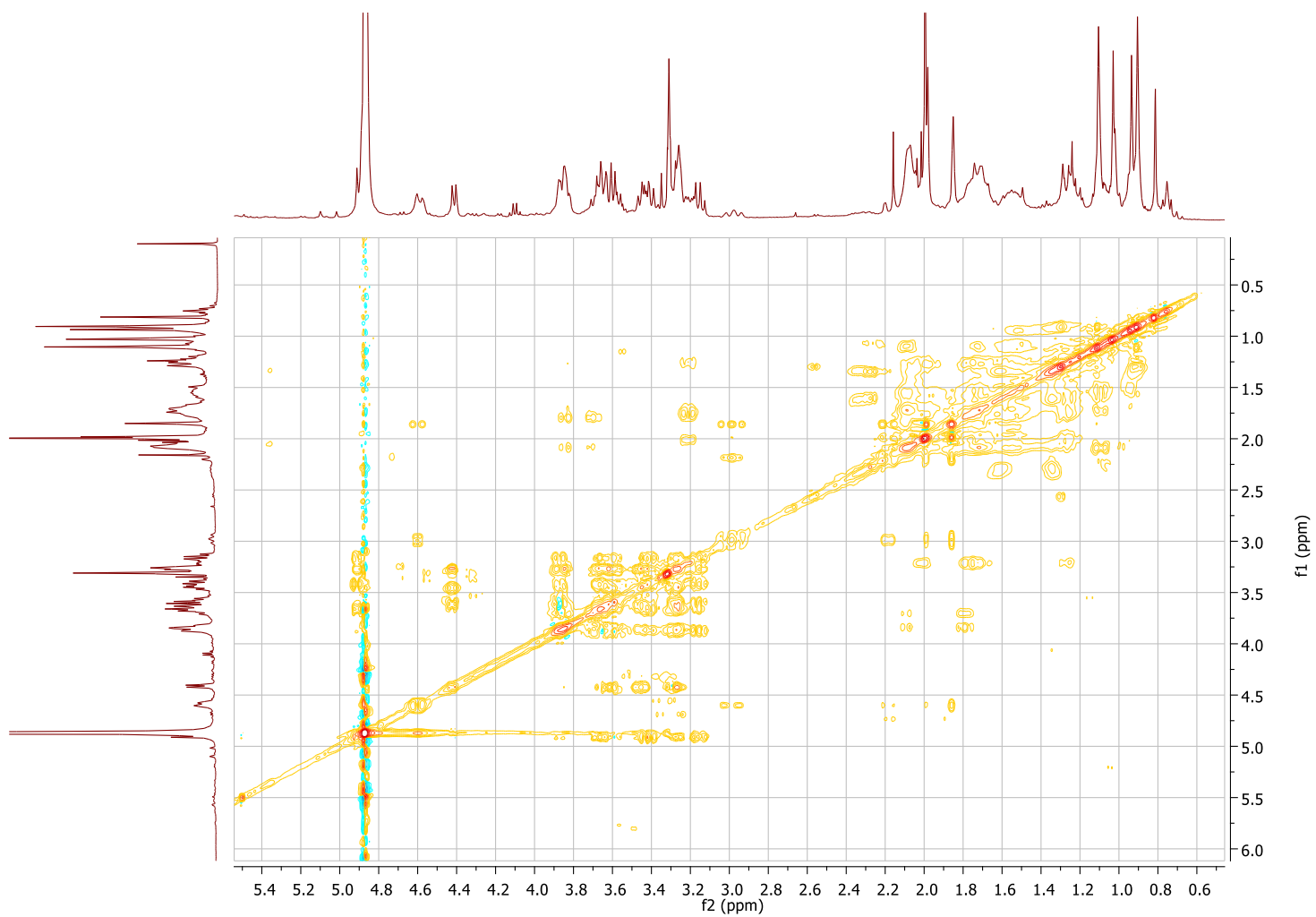
ANEXO 11: Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto **2** en CD_3OD , 100MHz

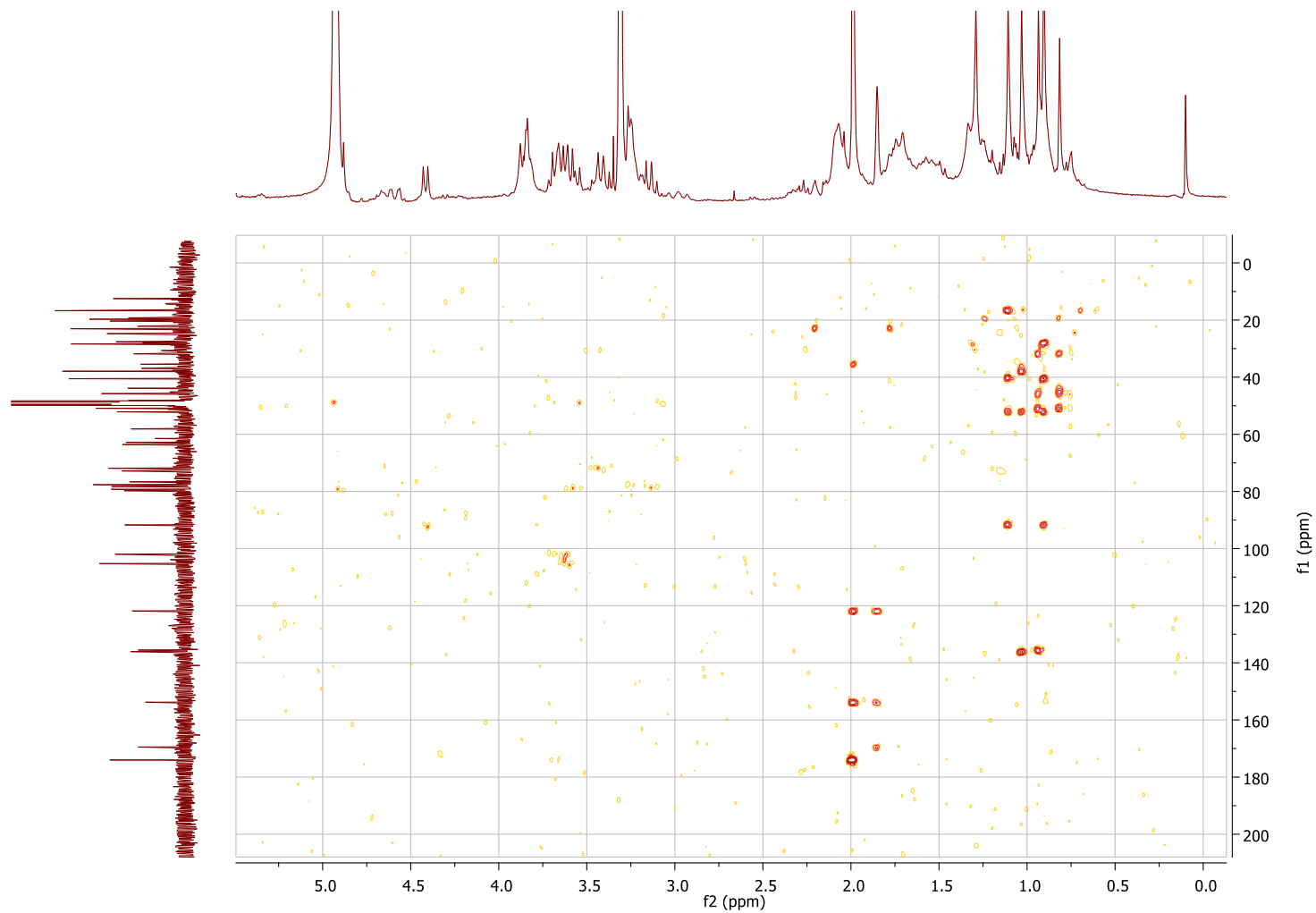
ANEXO 12: Espectro HSQC del compuesto **2** en CD₃OD, 300MHz



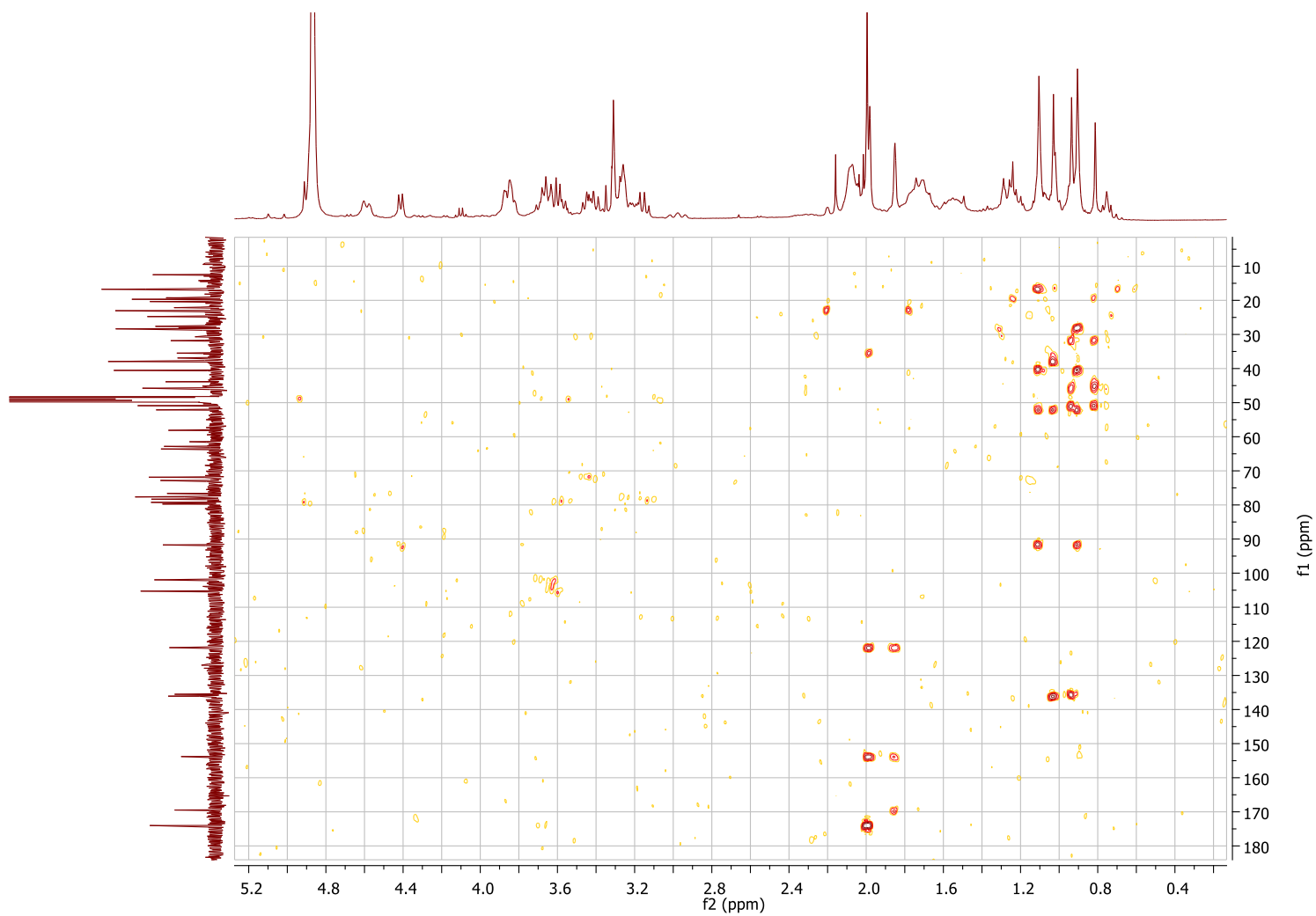
ANEXO 13: Espectro COSY H-H del compuesto **2** en CD₃OD, 300MHz

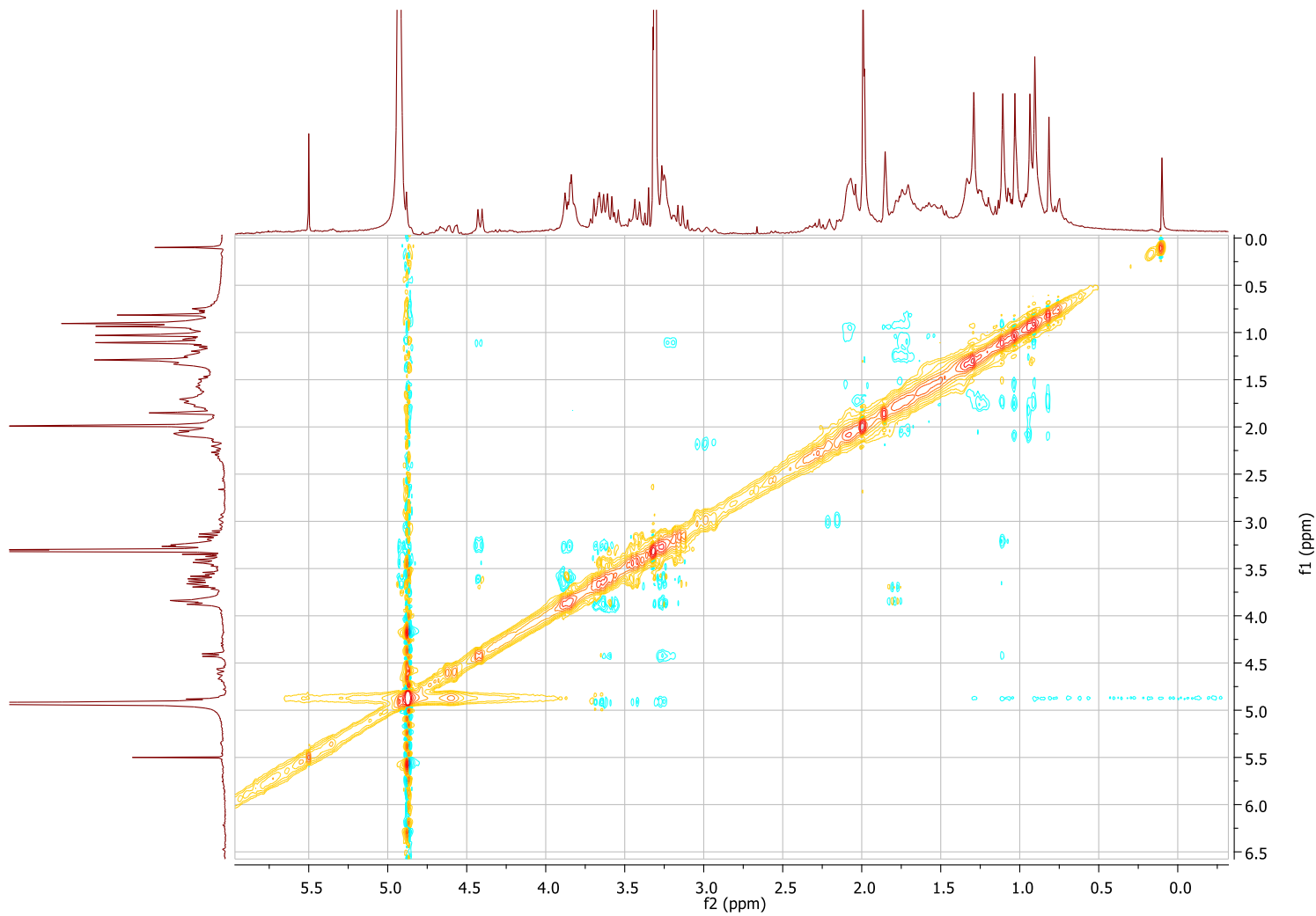
ANEXO 14: Espectro TOCSY del compuesto **2** en CD₃OD, 300MHz



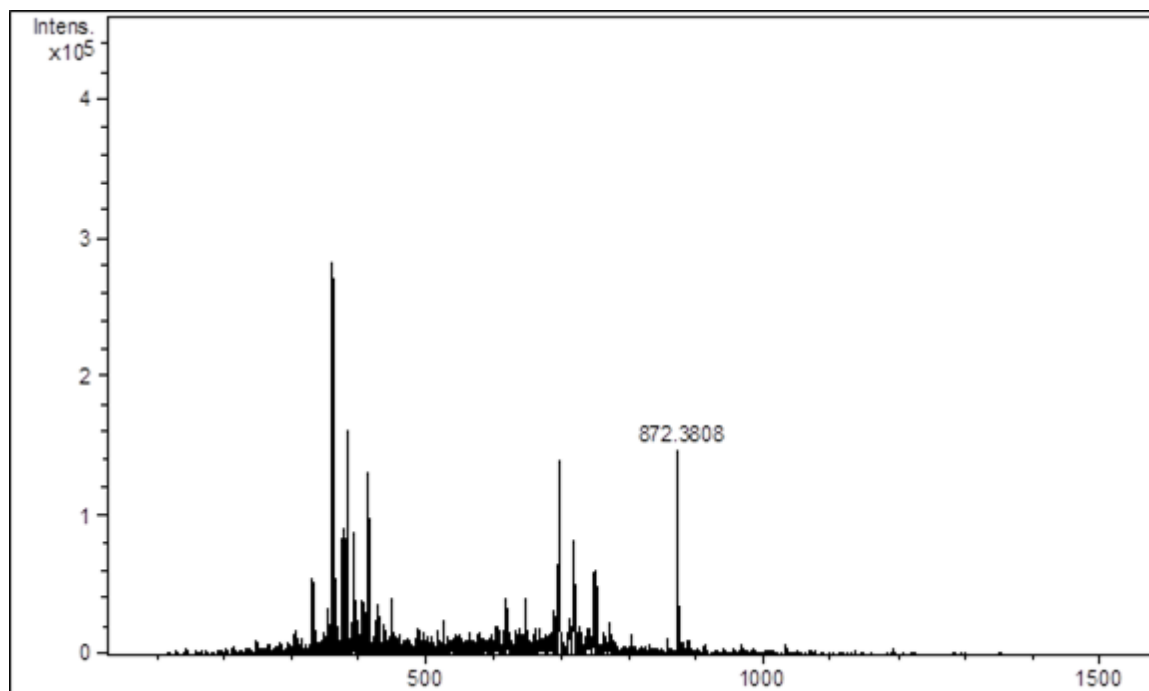
ANEXO 15A: Espectro HMBC del compuesto **2** en CD₃OD, 300MHz, $J = 5$ Hz

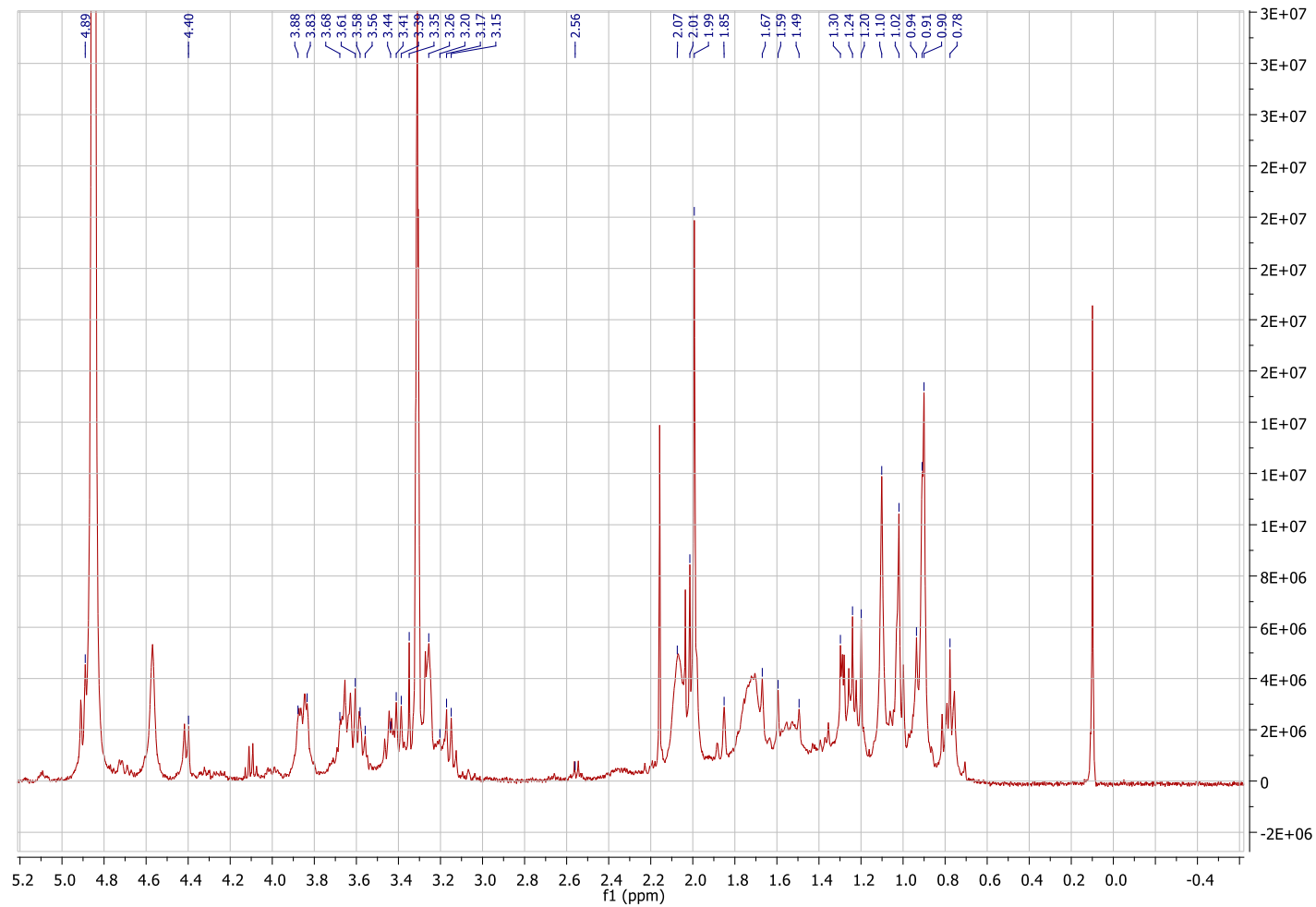
ANEXO 15B: Espectro HMBC del compuesto **2** en CD₃OD, 300MHz, J= 10Hz



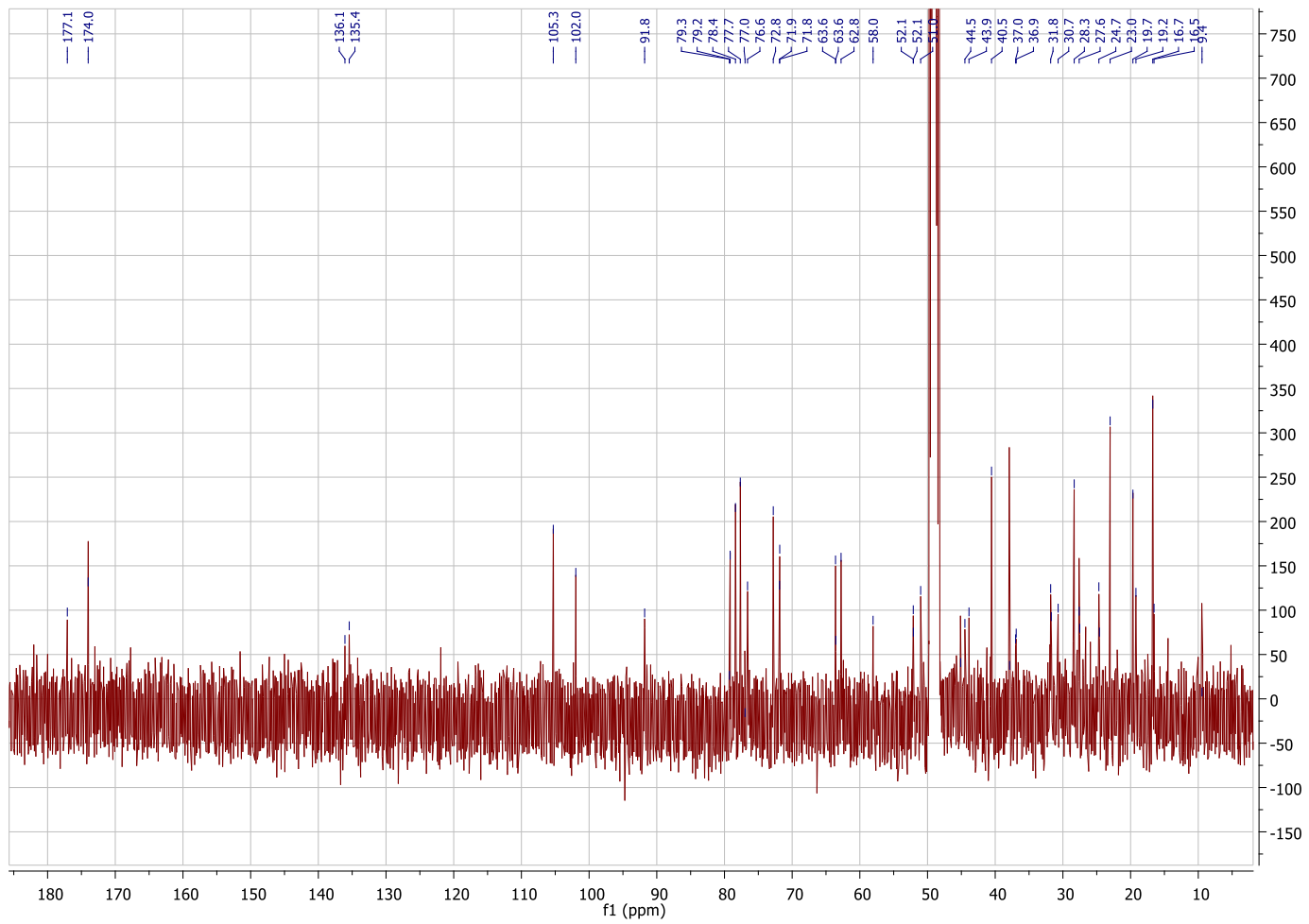
ANEXO 16: Espectro NOESY del compuesto **2** en CD₃OD, 300MHz

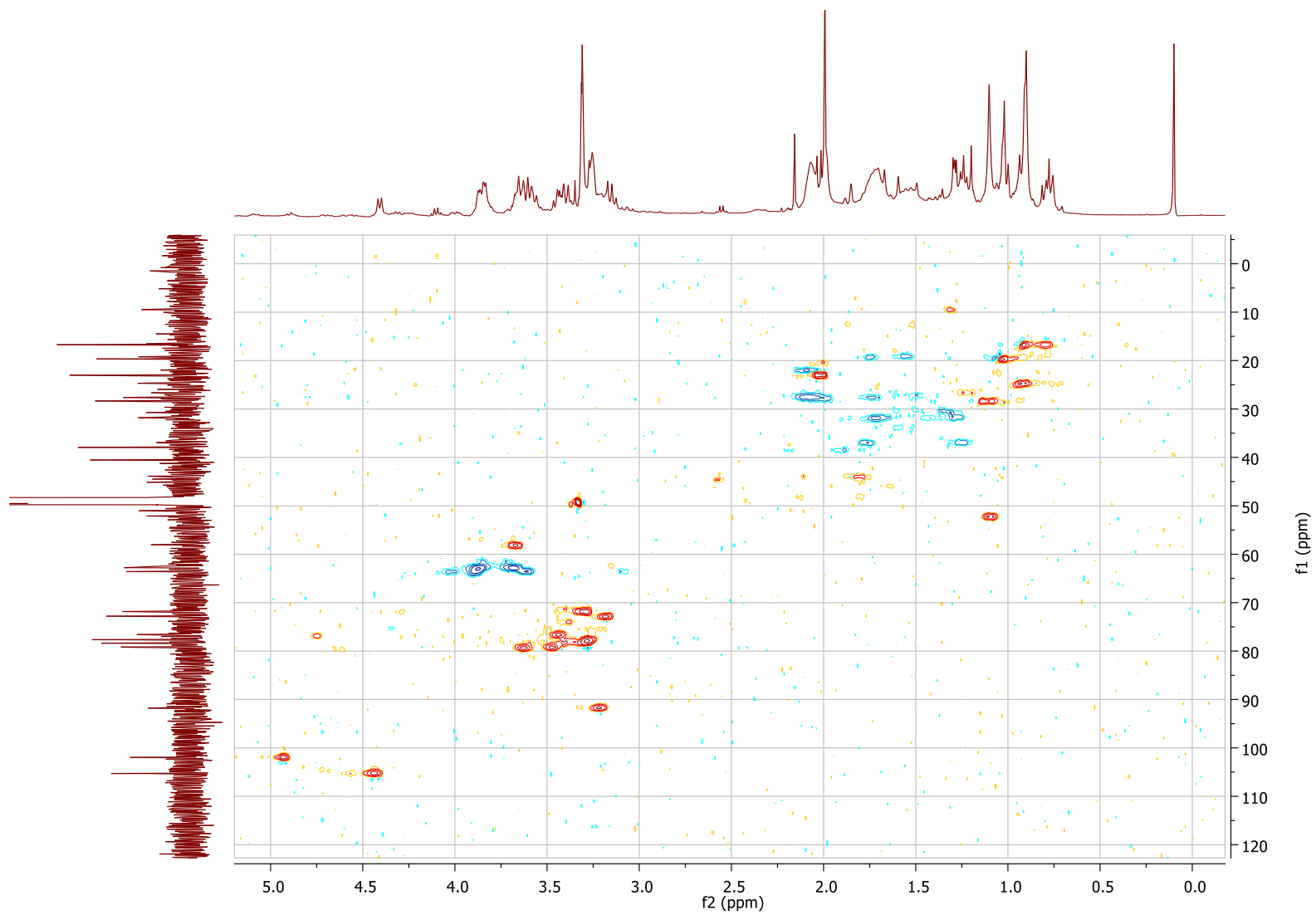
ANEXO 17: Espectro de masas del compuesto 3 en modo ESI-ITMS (+)



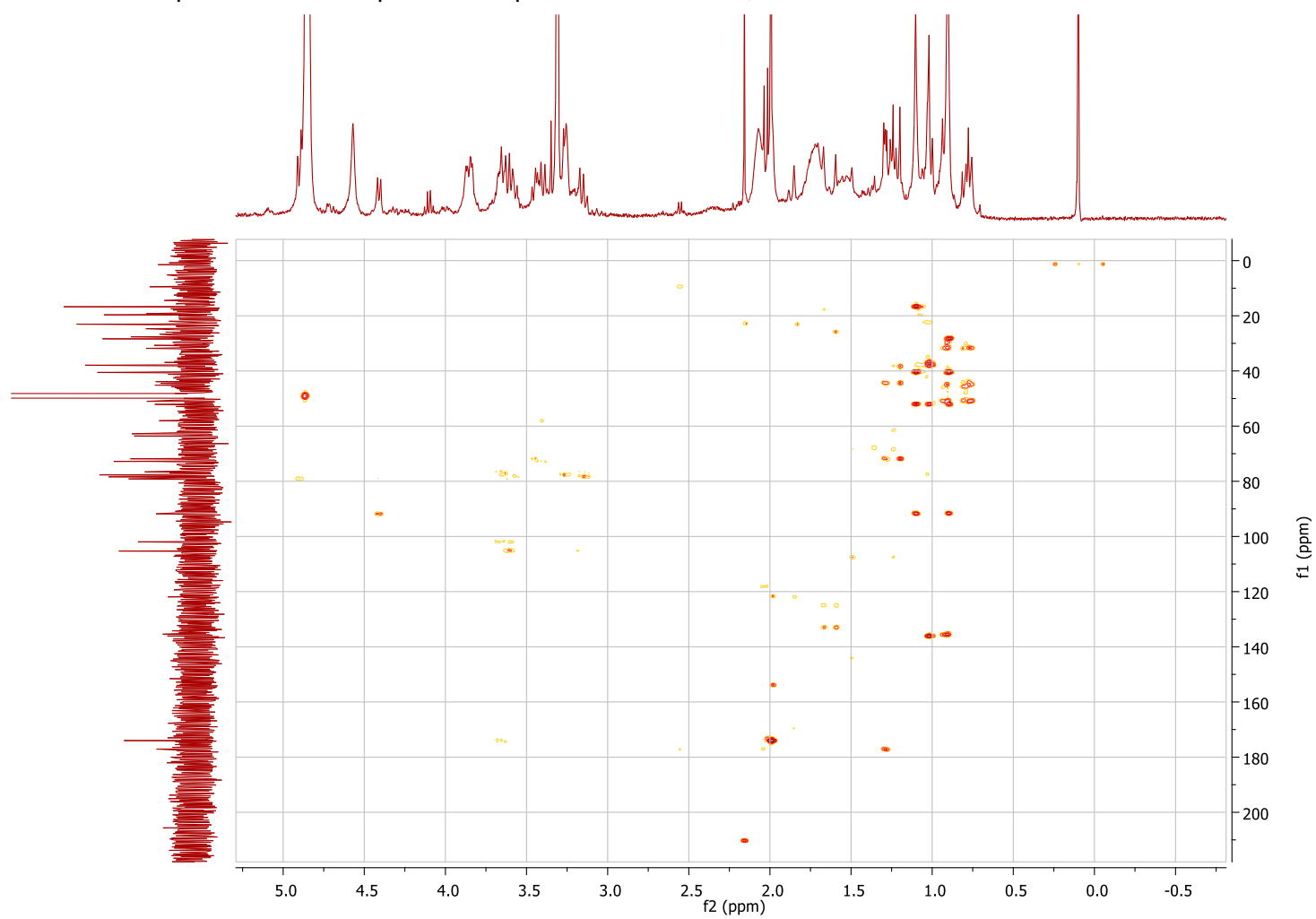
ANEXO 18: Espectro RMN-H del compuesto **3** en CD₃OD, 400MHz

ANEXO 19: Espectro RMN ^{13}C del compuesto **3** en CD_3OD , 400MHz

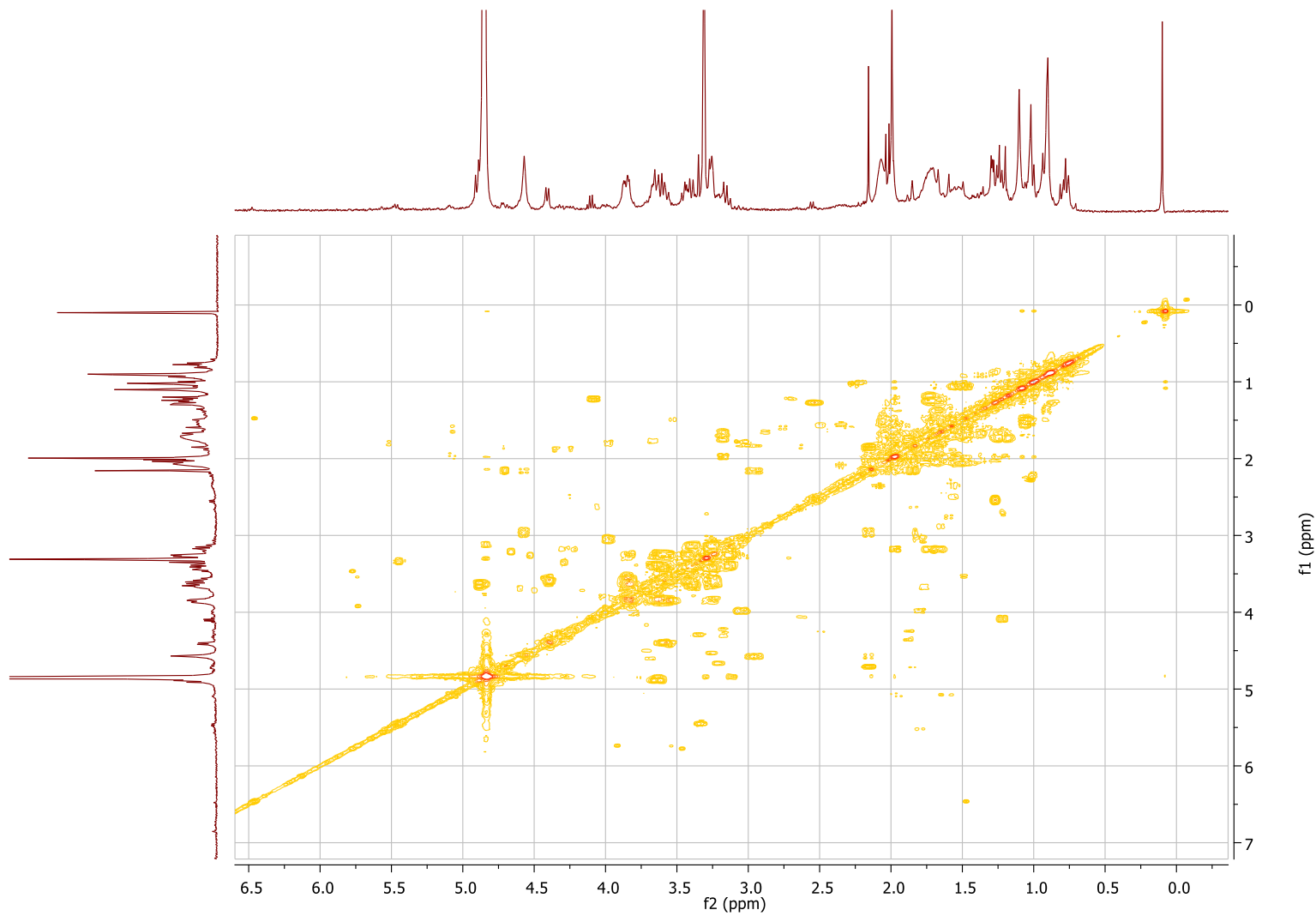


ANEXO 20: Espectro de HSQC del compuesto **3** en CD₃OD, 400MHz

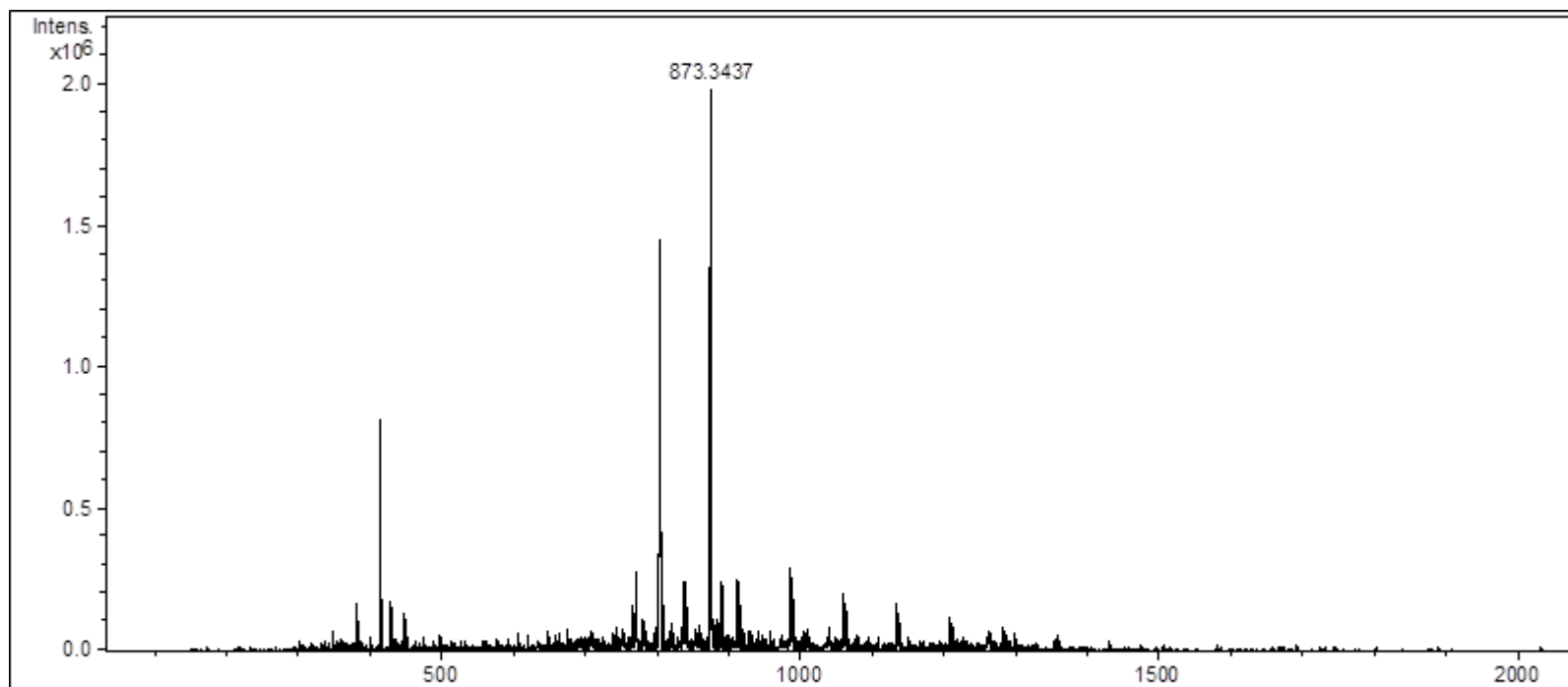
ANEXO 21: Espectro de HMBC para el compuesto 3 en CD₃OD, 400MHz

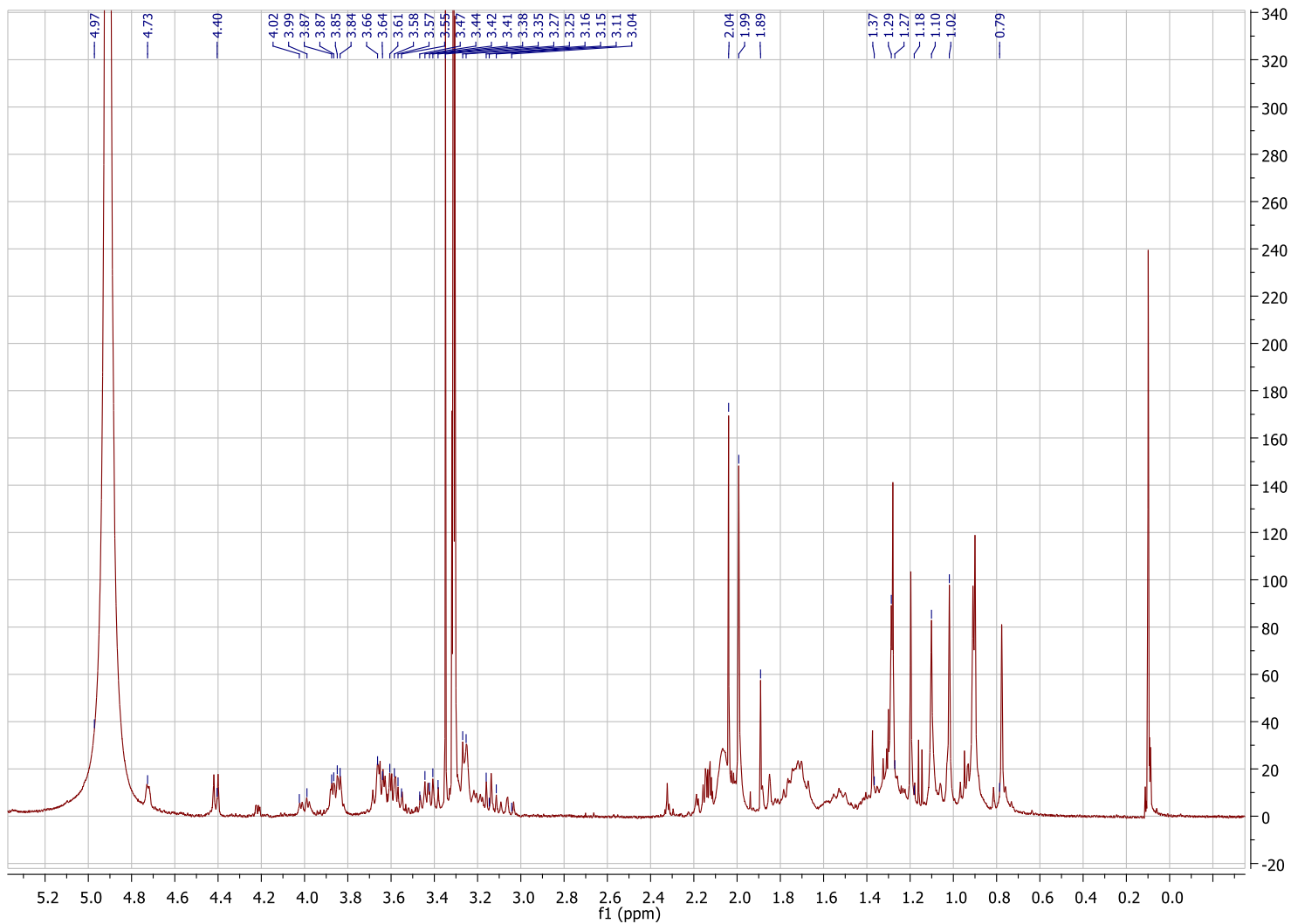


ANEXO 22: Espectro de COSY H-H del compuesto **3** en CD₃OD, 400MHz

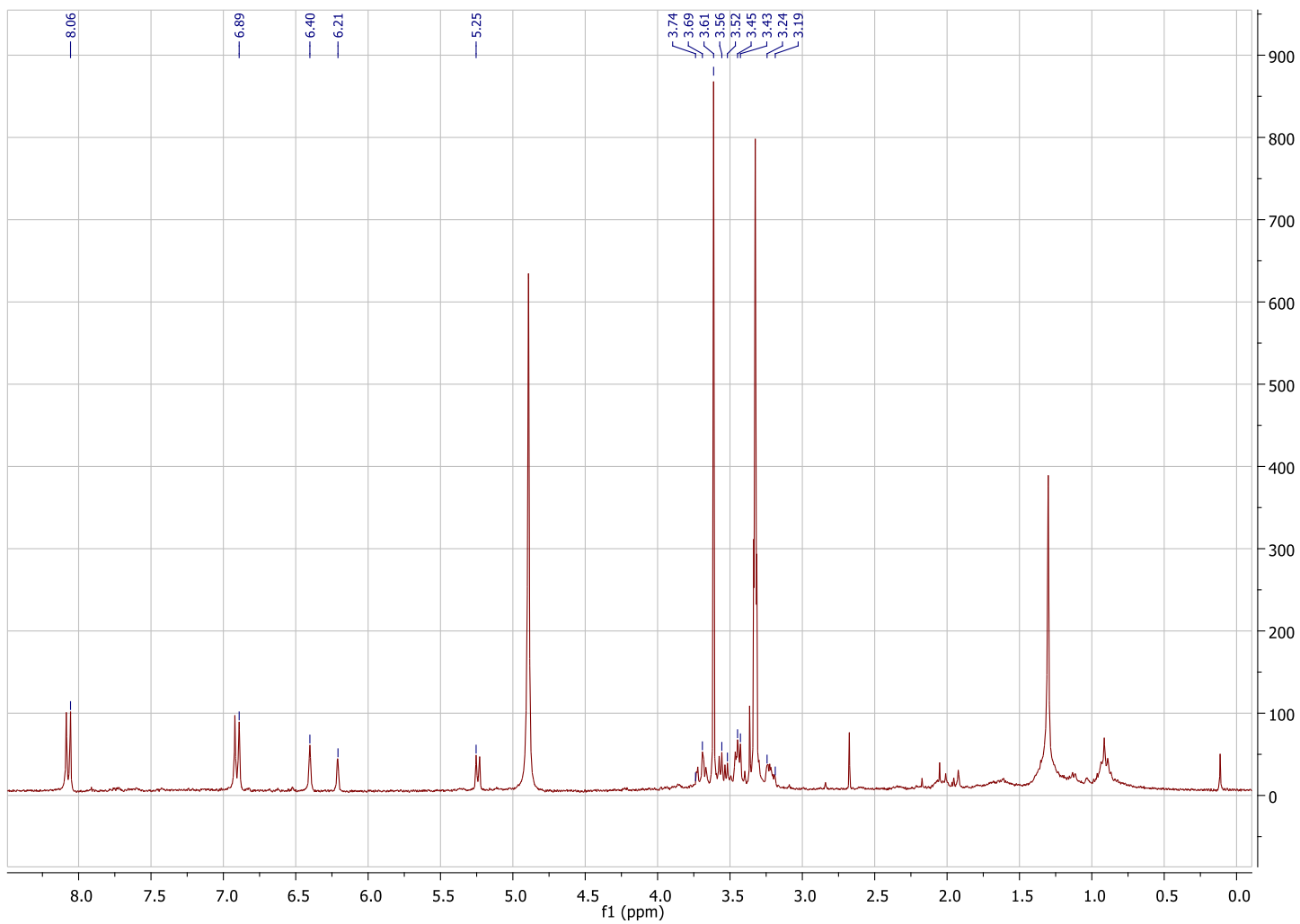


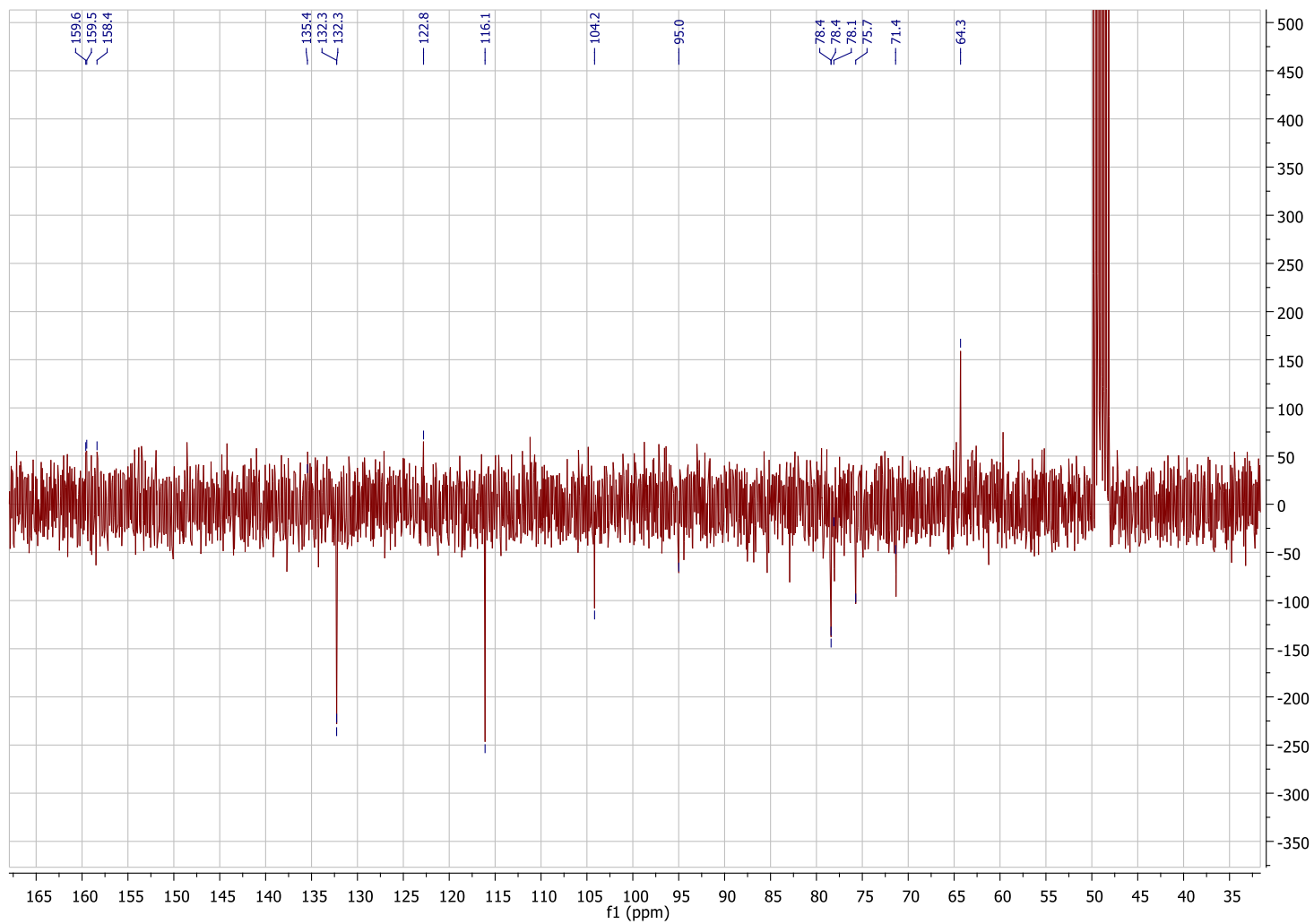
ANEXO 23: Espectro de masas del compuesto **4** en modo ESI-ITMS (+)



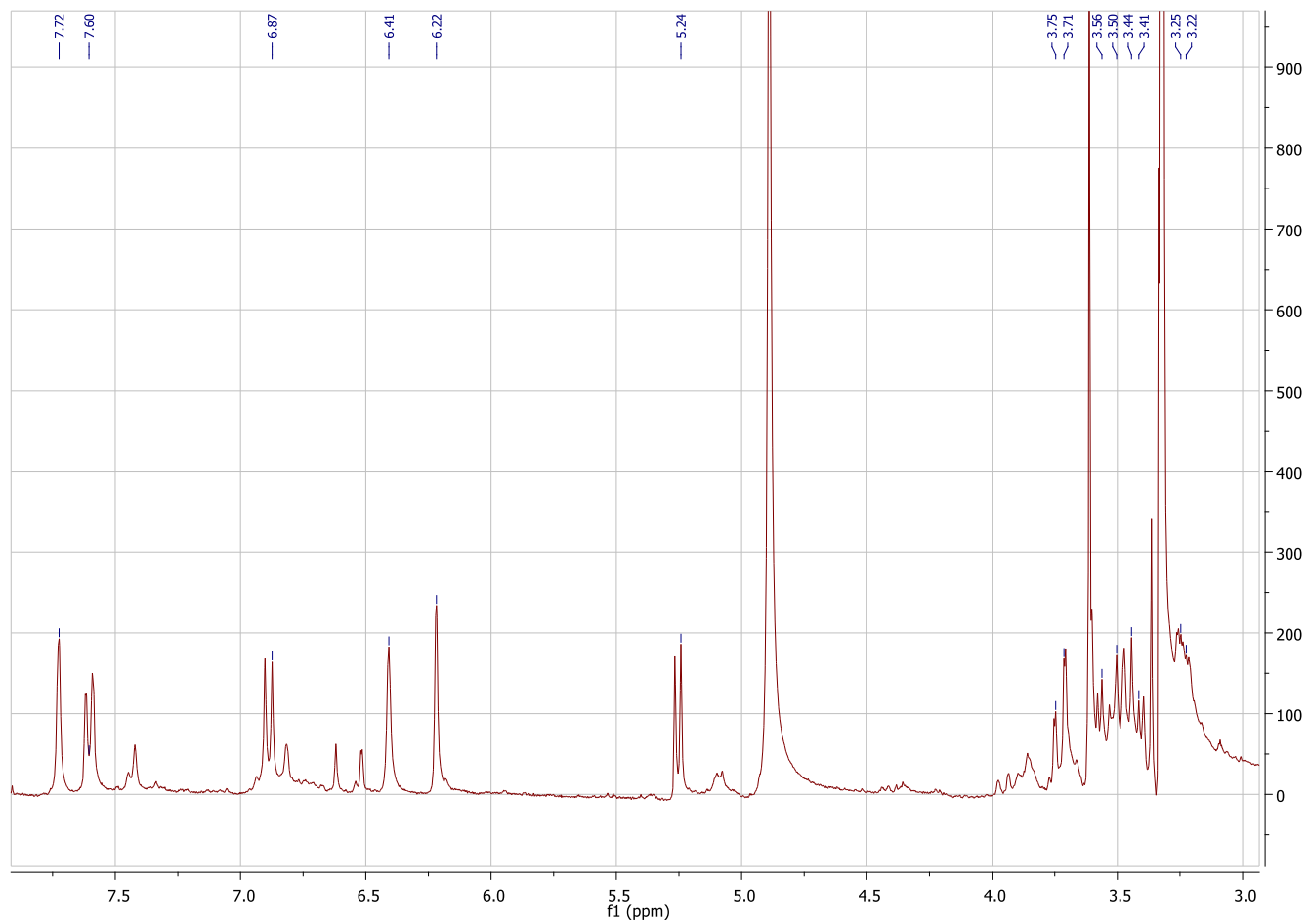
ANEXO 24: Espectro RMN-H del compuesto 4 en CD₃OD, 400MHz

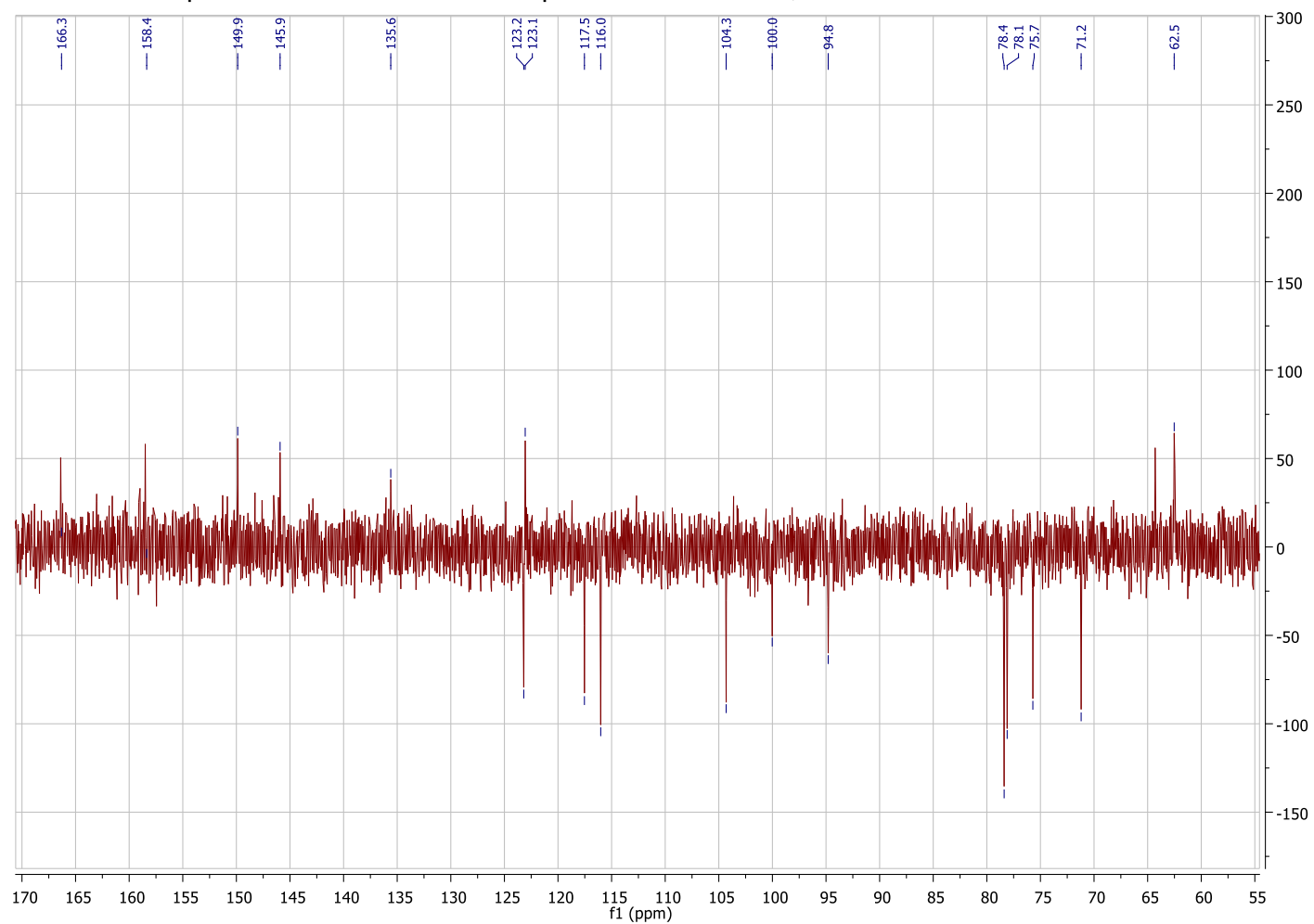
ANEXO 25: Espectro RMN-H del compuesto **5** en CD₃OD, 300MHz



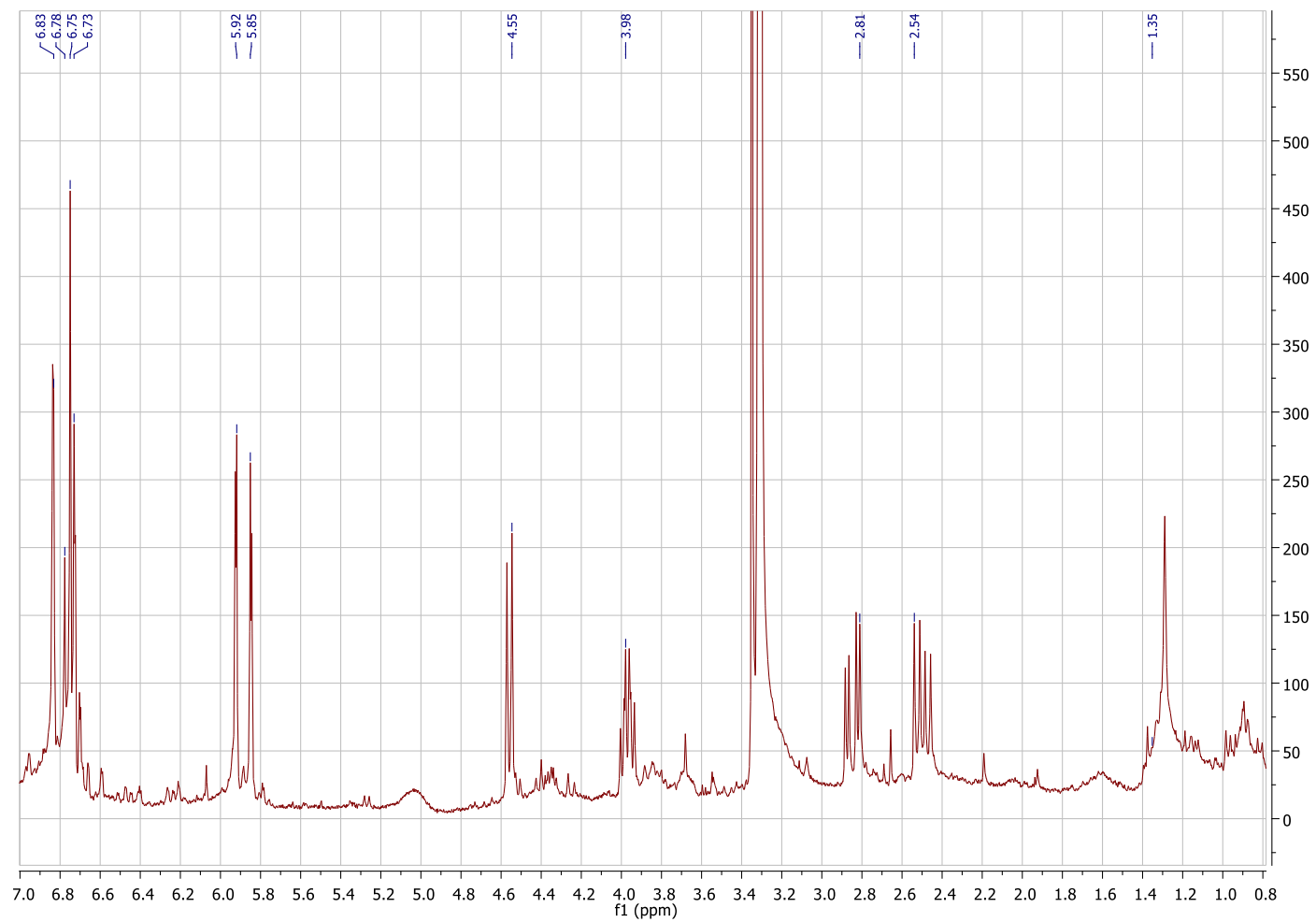
ANEXO 26: Espectro RMN-APT del compuesto **5** en CD₃OD, 75MHz

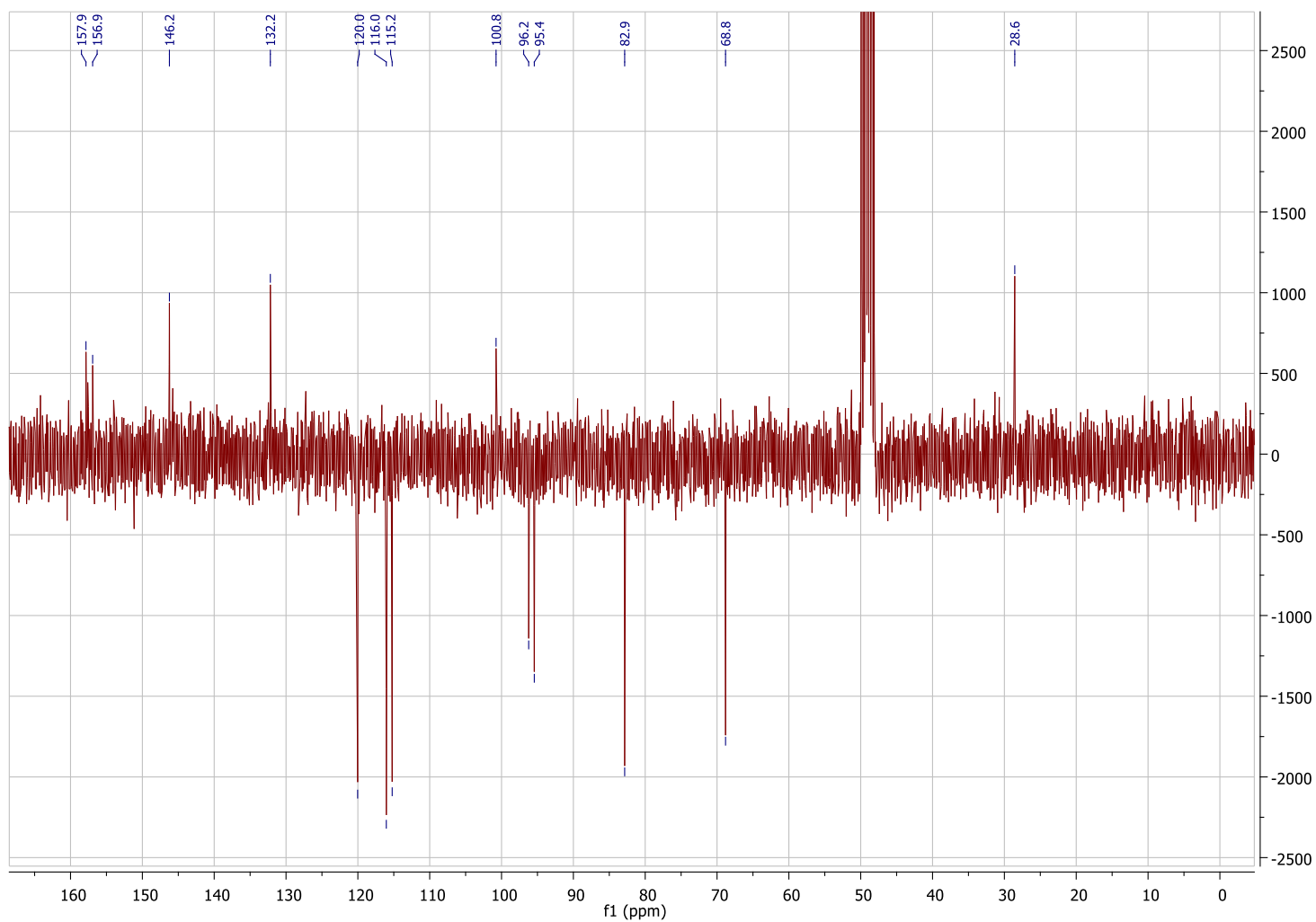
ANEXO 27: Espectro de RMN-H del compuesto **6** en CD₃OD, 300MHz



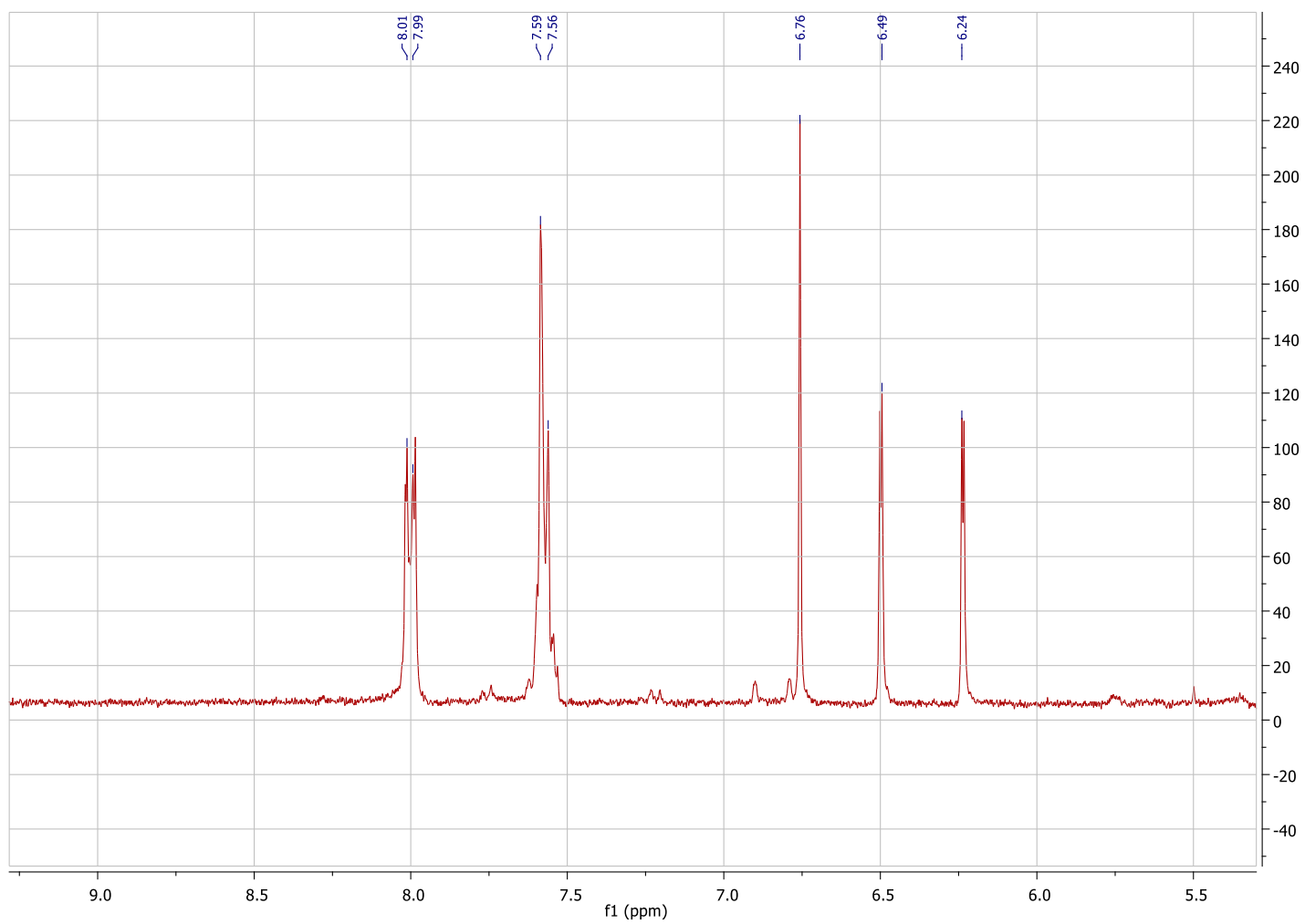
ANEXO 28: Espectro de RMN-APT del compuesto 6 en CD₃OD, 300MHz

ANEXO 29: Espectro de RMN-H del compuesto 7 CD₃OD 300MHz

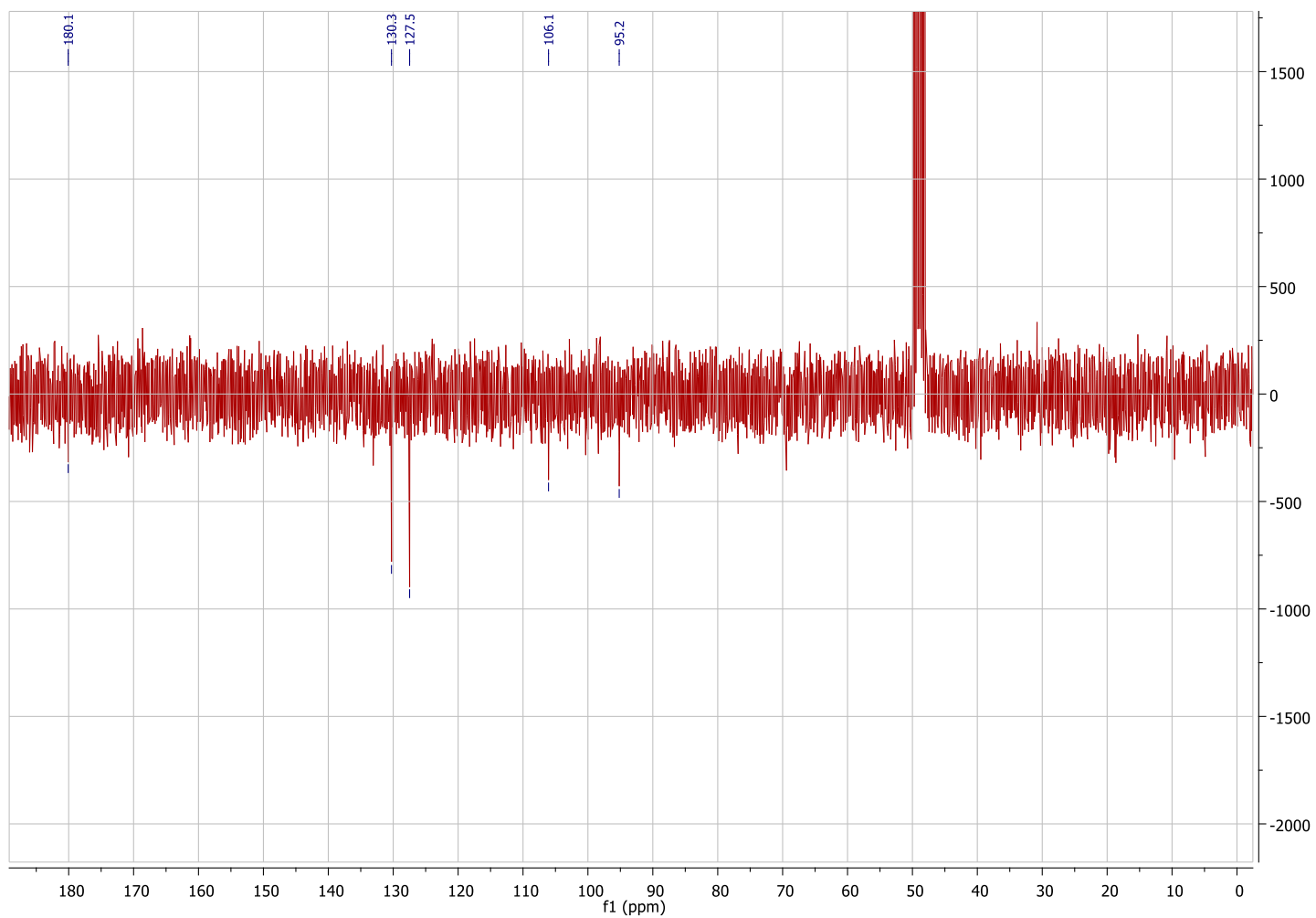


ANEXO 30: Espectro de RMN-APT del compuesto 7 CD₃OD 300MHz

ANEXO 31: Espectro RMN-H, compuesto **8** CD₃OD 300MHz



ANEXO 32: Espectro RMN-APT, compuesto **8** CD₃OD 300MHz



ANEXO 33: Carta de aprobación del comité de ética de la Universidad Nacional de Colombia



COMITÉ DE ÉTICA FACULTAD DE CIENCIAS

Bogotá, octubre 05 de 2015

Estudiante
Carolina Meneses Macías
Departamento de Química

Respetada Estudiante:

Atentamente le comunico que el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias, en reunión realizada el día 05 de octubre de 2015 (Acta 16), evaluó aspectos éticos del proyecto presentado por usted. Como resultado de esta revisión, el Comité considera que el proyecto **cumple** con los aspectos éticos básicos. Para los fines pertinentes, se transcriben las observaciones y el concepto final.

Proyecto: Saponinas y flavonoides de *Passiflora ligularis* y evaluación de su actividad antiinflamatoria.

Responsables: **Carolina Meneses Macías** (Tesis de Maestría en Ciencias-Química), Freddy Alejandro Ramos (Director de Tesis. Grupo: Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia, COL0004569) y Diana Marcela Aragón (Codirectora de Tesis. Grupo: Principios Bioactivos en Plantas Medicinales, COL0014832).

Observaciones:

En esta investigación se utilizarán pequeños animales de laboratorio, empleando el menor número de sujetos sin afectar la validez de los resultados. Se evaluará el efecto antiinflamatorio tópico en el modelo de edema auricular inducido por TPA en ratones.

El personal participante está debidamente entrenado y tiene experiencia en el cuidado y uso de animales de experimentación, así como en el reconocimiento y manejo del riesgo biológico. Se acatarán directrices contenidas en la Resolución 008430 de 1993 – MSP. La disposición de residuos biológicos se hará acorde con protocolos institucionales de gestión ambiental implementados en la Universidad Nacional de Colombia.

Los extractos en estudio se obtendrán a partir de plantas (n.v.: "granadilla") provenientes de cultivos comerciales, con lo cual no se afecta en forma negativa la biodiversidad de plantas silvestres por aspectos de colecta.

Los aspectos de Propiedad Intelectual se establecerán según los lineamientos del Acuerdo 008 de 2008 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional de Colombia.

Concepto: Aprobado.

LUIS FERNANDO OSPINA G.
Coordinador Comité de Ética