

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**ESTUDIO METABÓLICO DE HOJAS DE
Passiflora ligularis Juss Y SU RELACIÓN
CON LA ACTIVIDAD INHIBITORIA
SOBRE α -AMILASA Y α -GLUCOSIDASA**

Jhoan Gabriel Monzón Daza

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2019

ESTUDIO METABÓLICO DE HOJAS DE *Passiflora ligularis* Juss Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD INHIBITORIA SOBRE α -AMILASA Y α -GLUCOSIDASA

Jhoan Gabriel Monzón Daza

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias-Química

Director:

Dr. Sci. Leonardo Castellanos Hernández

Codirectora:

Dr. Sci. Diana Marcela Aragón Novoa

Línea de Investigación:

Productos Naturales

Grupos de Investigación:

Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia

(Departamento de Química)

Principios Bioactivos de Plantas Medicinales

(Departamento de Farmacia)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2019

Dedicado a mis abuelitos Margot y Emilio

“La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real. Es un viaje, nunca una llegada.”

Karl Raiumd Popper

Agradecimientos

Este documento es la síntesis del crecimiento académico y personal que durante estos dos años he tenido y del cual muchas personas directa o indirectamente hicieron parte. Agradezco a mi familia por estar conmigo en cada una de las pruebas que afronté y apoyar mi decisión de continuar en el mundo académico. Mis padres, mi hermana y mis abuelitos, son esos pilares que me han sostenido durante toda mi vida.

Por otro lado, no puedo olvidar a la familia que escogí (mis grandes amigos): Geny S, Silvia R, Liliana M, Lucía P, Julián S, Laura C, Mauricio M, Claudia C y la lista continúa. Ellos me demuestran cada día lo que es el amor verdadero, la lealtad y la confianza. Agradezco también a Esteban Suárez mi compañero de aventuras y de búsqueda de conocimiento, su paciencia y compañía hicieron de todo esto una bonita experiencia.

Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia y al departamento de Química. Al profesor Leonardo Castellanos por brindarme su conocimiento, tiempo, paciencia y apoyo durante el desarrollo de este proyecto y permitirme iniciar este camino en la ciencia. A los profesores Marcela Aragón, Freddy Ramos y Fabián López por cada uno de sus consejos y observaciones que permitieron la construcción de un proyecto y una formación interdisciplinar. Agradecemos a COLCIENCIAS por el financiamiento con el proyecto “Estudio de la actividad antidiabética de un extracto nanovehiculizado de hojas de *Passiflora ligularis* (granadilla)” (Contrato 836 de 2017). Por otro lado, agradecemos a FEDEPASSIFLORAS y a cada uno de los productores de los cultivos de granadilla visitados, por su amabilidad y ayuda con la obtención del material vegetal. Agradecemos al ministerio de ambiente por el permiso de investigación (Contrato de acceso a producto derivado “Bioprospeccion de especies de *Solanum*, *Passiflora*, *Physalis*, *Hypericum*, *Cecropia* e *Ilex* de Colombia” otrosí No. 3 al contrato marco de acceso a recursos genéticos y sus productos derivados No. 121 del 22 de enero de 2016, suscrito entre el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Universidad Nacional de Colombia)

Durante este trabajo entendí, aún más, la importancia del trabajo en equipo, por ello quiero agradecer a Michelle Sepúlveda quien me tuvo tanta paciencia durante este proceso y quien estuvo siempre para resolver mis dudas. A mi amiga Paola Rubiano por su compañía, consejos y frases de aliento. No puedo dejar de mencionar a mis compañeros del grupo de investigación “Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia”, Mateo, Lady, Albert, Juan, Carlos y Paola por enseñarme y estar siempre atentos a colaborar. De igual forma a Sandra Echeverri, Ivonne Valderrama, Diana Rey, María Isabel Cardona y mis demás compañeras del grupo de investigación en “Principios bioactivos de plantas medicinales” del departamento de Farmacia, gracias por las enseñanzas, el apoyo y por los momentos tan agradables que pasé en el laboratorio junto a ustedes.

Resumen

Especies del género *Passiflora* han sido objeto de múltiples investigaciones farmacológicas, dado que existen reportes de su uso en el tratamiento tradicional de diferentes patologías, una de ellas la diabetes mellitus. *Passiflora ligularis* Juss o “Granadilla” es una especie ampliamente cultivada en el territorio nacional, cuyo fruto ha demostrado poseer actividad en diferentes modelos farmacológicos de diabetes. Por otro lado, se han identificado compuestos en hojas con actividad inhibitoria sobre las glucosil-hidrolasas, enzimas necesarias para la digestión de carbohidratos y dianas farmacológicas en el tratamiento de esta enfermedad. Basados en dichas evidencias, en esta tesis de maestría se buscó estudiar el perfil metabólico de extractos polares de hojas de *P. ligularis*, e identificar, a través de un estudio metabólico, los metabolitos responsables de la actividad inhibitoria sobre estas enzimas involucradas en la digestión de carbohidratos. Finalmente, se buscó validar los resultados obtenidos mediante ensayos *in vitro* y estudios *in silico*.

Así, mediante el perfilado metabólico por RMN-¹H y HPLC-MS se identificaron **29** compuestos, 5 de los cuales corresponden a aminoácidos, 2 a carbohidratos, 4 a ácidos orgánicos, 3 a compuestos misceláneos, 1 saponina y 14 compuestos polifenólicos; entre estos últimos, los flavonoides tipo *O*-glicósido derivados de quercetina y crisina son los más abundantes. Se estudiaron hojas de 8 parcelas de cultivo ubicadas en los municipios de Anolaima, Algeciras, Junín; éstas fueron almacenadas bajo refrigeración o a temperatura ambiente. Los extractos obtenidos a partir de 25mg de hojas se ensayaron sobre los modelos de inhibición de α -glucosidasa presente en el extracto de intestino de rata y α -amilasa pancreática porcina, obteniéndose inhibiciones de entre el 5 y el 50%; y de entre el 5 y 95%, respectivamente.

El estudio metabólico por RMN-¹H permitió establecer que la condición de almacenamiento es la variable que mayor impacta en los cambios del perfil metabólico de los extractos, específicamente cambios asociados con la composición de carbohidratos. Por otro lado, no se evidenció efecto del sitio o la edad de cultivo en la diferenciación de los perfiles metabólicos.

Los análisis por OPLS-DA revelaron que los cambios en la actividad biológica se explicarían por variaciones en compuestos de tipo saponina, polifenol y aminoácido.

Estudios *in silico* tipo acoplamiento molecular, entre los compuestos identificados como posibles responsables de los cambios de actividad inhibitoria, y las estructuras rígidas de las enzimas α -amilasa pancreática porcina y la subunidad *N*-terminal de la α -glucosidasa humana, permitieron identificar que los compuestos: ligularósido C (**15**), quercetina-3-*O*-glucósido (**17**), luteolina-7-*O*-glucósido (**17a**), kaempferol-3-*O*-glucósido (**19**), y apigenina-7-*O*-glucósido (**19a**), son los que generarían complejos con el sitio activo de la α -amilasa de forma más efectiva para inhibirla. En el caso de la α -glucosidasa, los compuestos quercetin-3-*O*-(6''-malonil)-glucósido (**18**), apigenina-7-*O*-glucósido (**19a**), kaempferol-3-*O*-(6''-malonil)-glucósido (**21**) e isoramnetin-3-*O*-(6''-malonil)-glucósido (**22**) fueron los que presentaron mejores resultados.

Por otro lado, se determinaron *in vitro* los valores de IC_{50} de los compuestos glutamina (**3**), crisina (**14**), ligularósido C (**15**), catequina (**16**), quercetina-3-*O*-glucósido (**17**), kaempferol-3-*O*-glucósido (**19**) y crisin-7-*O*-(6''-acetil)-glucósido (**28**), para cada una de las enzimas estudiadas. De esta forma, se estableció que los compuestos con valores de IC_{50} inferiores o levemente superiores a los presentados por el control positivo acarbosa, que para α -amilasa pancreática porcina fue de 234 μ M, fueron los compuestos ligularósido C (409.80 μ M), quercetina-3-*O*-glucósido (31.04 μ M) y kaempferol-3-*O*-glucósido (33.45 μ M), indicando que presentan una potencia mayor o cercana a la del control positivo. Respecto a la inhibición de la α -glucosidasa presente en el extracto de intestino de rata, el compuesto quercetina-3-*O*-glucósido presentó un valor de IC_{50} de 15.37 μ M, que es inferior al presentado por el control positivo acarbosa (156.6 μ M).

Todo este estudio mostró que las variaciones en la actividad inhibitoria sobre glucosilhidrolasas por parte de los extractos polares de hojas *Passiflora ligularis* Juss se pueden explicar por cambios en la concentración y/o expresión de compuestos polifenólicos y saponinas, aspecto confirmado mediante estudios *in silico* e *in vitro*.

Palabras clave: Granadilla, flavonoides, saponinas, metabolómica, análisis multivariado, *docking*.

Abstract

Species of *Passiflora* genus have been investigated under pharmacological research, due to reports of their use in the traditional treatment of several diseases, such as diabetes. *Passiflora ligularis* Juss or “Granadilla” is widely cultivated in the national territory, its fruit has shown bioactivity in certain pharmacological models of diabetes. On the other hand, in its leaves have been identified compounds with inhibitory activity against glucosyl-hydrolases, which are enzymes essential for carbohydrates digestion and pharmacological targets for the treatment of diabetes. According to this evidence, in this master thesis, it was studied the metabolic profile of polar extracts obtained from *P. ligularis* leaves. It was also identified by means of a metabolomic study the metabolites responsible for the inhibitory activity against enzymes involved in carbohydrates digestion. Subsequently, the validity of the results was sought by *in vitro* assays and *in silico* studies.

Thus, and as a result of the metabolic profiling by NMR-¹H and HPLC-MS, 29 compounds were identified, 5 of which corresponded to amino acids, 2 to carbohydrates, 4 to organic acids, 5 to miscellaneous compounds, 1 saponin and 14 polyphenolic compounds, between them, O-glycosidic flavonoids derived from quercetin and chrysin are the most abundant. Leaves from 8 crops located in the municipalities of Anolaima, Algeciras, and Junín were studied; Those were stored under refrigeration or at room temperature. The extracts obtained from 25mg of leaves were assayed on the inhibition model of the α -glucosidase present in rat intestine extract and porcine pancreatic α -amylase, obtaining inhibition in percentages between 5-50% and between 5 -95%, respectively.

The NMR-¹H metabolomic study allowed to establish that the storage condition is the variable with higher impact in the changes observed in metabolic profiles among the extracts specifically changes related to carbohydrates composition. Otherwise, there was no effect of the crop location and age in the differentiation among the metabolic profiles. The OPLS-DA analyses revealed that changes in the biological activity could be explained by variation in saponin-type, polyphenol-type, and aminoacid-type compounds.

In silico studies, molecular docking type, among the compounds identified as possibly responsible for the changes in the bioactivity, and the rigid structures of the enzymes pancreatic porcine α -amylase and the *N*-terminal subunit of the human α -glucosidase, allowed to identify that the compounds: ligularoside C (**15**), quercetin-3-*O*-glucoside (**17**), luteolin-7-*O*-glucoside (**17a**), kaempferol-3-*O*-glucoside (**19**) and apigenin-7-*O*-glucoside, are the ones which would better interact with the active site of the α -amylase to inhibit it. In the case of α -glucosidase, the compounds quercetin-3-*O*-(6''-malonyl)-glucoside (**18**), apigenin-7-*O*-glucoside (**19a**), kaempferol-3-*O*-(6''-malonyl)-glucoside (**21**) and isorhamnetin-3-*O*-(6''-malonyl)-glucoside (**22**) were the ones with better scores.

On the other hand, for each studied enzyme the IC_{50} values of the compounds glutamine (**3**), chrysin (**14**), ligularoside C (**15**), catechin (**16**), quercetin-3-*O*-glucoside (**17**), kaempferol-3-*O*-glucoside (**19**) and chrysin-7-*O*-(6''-acetyl)-glucoside were determined. Thus, it was established that the compounds with lower or slightly higher IC_{50} values than the determined for the positive control acarbose, which was 234 μ M for the pancreatic porcine α -amylase, were the compounds ligularoside C (490.80 μ M), quercetin-3-*O*-glucoside (31.04 μ M) and kaempferol-3-*O*-glucoside (33.45 μ M), indicating that they are more or almost equal potent than the positive control. Regarding the inhibition of the α -glucosidase present in the rat intestine extract, the compound quercetin-3-*O*-glucoside showed an IC_{50} value of 15.37 μ M, which is lower than the one showed by acarbose (156.6 μ M).

The whole study showed that variations in the glucosyl-hydrolases inhibitory activity of the polar extracts of leaves of *Passiflora ligularis* Juss can be explained by changes in concentration and or expression of polyphenolic compounds and saponins. This fact was confirmed by *in silico* and *in vitro* studies.

Keywords: Granadilla, flavonoids, saponins, metabolomic, multivariate analysis, *docking*.

Contenido

| | Pág |
|--|-----------|
| Resumen | IX |
| Lista de figuras | XV |
| Lista de tablas | XX |
| Introducción | 1 |
| 1. Capítulo 1: Estado del arte | 5 |
| 1.1 Diabetes mellitus | 5 |
| 1.1.1 Generalidades..... | 5 |
| 1.1.2 Tratamiento..... | 7 |
| 1.1.3 Glucosil-hidrolasas como dianas terapéuticas..... | 8 |
| 1.2 Fitoterapia en el tratamiento de la Diabetes | 12 |
| 1.2.1 Drogas con actividad hipoglicemiante | 12 |
| 1.2.2 Actividad hipoglicemiante del género <i>Passiflora</i> | 13 |
| 1.2.3 <i>Passiflora ligularis</i> Juss: Generalidades farmacológicas, botánicas y fitoquímicas. 16 | 16 |
| 1.3 Trabajos desarrollados en la actualidad en la Universidad Nacional sobre <i>Passiflora ligularis</i> Juss..... | 23 |
| 1.4 Conclusiones | 24 |
| 1.5 Bibliografía..... | 26 |
| 2. Capítulo 2: Perfil metabólico de hojas de <i>Passiflora ligularis</i> Juss y su relación con la actividad inhibitoria sobre las enzimas α-amilasa y α-glucosidasa. | 31 |
| 2.1 Introducción | 33 |
| 2.2 Resultados y discusión | 34 |
| 2.2.1 Perfilado metabólico (<i>fingerprinting</i>) de hojas de <i>Passiflora ligularis</i> Juss. | 37 |
| 2.2.2 Evaluación de la inhibición de glucosil-hidrolasas de interés en la búsqueda de compuestos con actividad hipoglicemiante..... | 60 |
| 2.2.3 Relación entre el " <i>fingerprint</i> " metabólico de hojas de <i>P. ligularis</i> con el sitio de recolección y condición de almacenamiento..... | 67 |
| 2.2.4 Relación entre el " <i>fingerprint</i> " metabólico de hojas de <i>P. ligularis</i> y la actividad inhibitoria sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa. | 74 |
| 2.3 Conclusiones..... | 82 |
| 2.4 Materiales y Métodos..... | 84 |
| 2.4.1 Reactivos y equipos | 84 |
| 2.4.2 Material vegetal | 84 |
| 2.4.3 Procesamiento de las muestras | 85 |
| 2.4.4 Análisis metabólico por RMN. | 86 |
| 2.4.5 Análisis, aislamiento e identificación de flavonoides | 87 |
| 2.4.6 Ensayos de inhibición enzimática | 89 |
| 2.5 Bibliografía..... | 93 |

| | |
|---|------------|
| 3. Capítulo 3: Estudios <i>in silico</i> y evaluación <i>in vitro</i> de la actividad inhibitoria de compuestos identificados en hojas de <i>Passiflora ligularis</i> Juss sobre las enzimas α-amilasa y α-glucosidasa. | 99 |
| 3.1 Introducción | 102 |
| 3.2 Resultados y discusión | 104 |
| 3.2.1 Selección de las estructuras 3D para las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa | 104 |
| 3.2.2 Pre-procesamiento de los archivos de las estructuras proteicas para el acoplamiento molecular. | 106 |
| 3.2.3 Preparación de las estructuras de los ligandos | 107 |
| 3.2.4 Determinación y validación del protocolo de acoplamiento molecular | 114 |
| 3.2.5 Acoplamiento molecular y huellas digitales de interacción proteína-ligando (<i>Protein-ligand interaction fingerprint, PLIF</i>) entre los compuestos aislados de hojas de <i>Passiflora ligularis</i> Juss y las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa | 119 |
| 3.2.6 Ensayos de actividad inhibitoria sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa de fracciones y compuestos identificados en hojas de <i>Passiflora ligularis</i> Juss. | 137 |
| 3.3 Conclusiones | 142 |
| 3.4 Materiales y Métodos | 144 |
| 3.4.1 Reactivos y equipos | 144 |
| 3.4.2 Selección de las estructuras 3D para las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa | 144 |
| 3.4.3 Pre-procesamiento de los archivos de las estructuras proteicas para el acoplamiento molecular | 144 |
| 3.4.4 Preparación de las estructuras de los ligandos | 145 |
| 3.4.5 Determinación y validación del protocolo de acoplamiento molecular | 145 |
| 3.4.6 Acoplamiento molecular y huellas digitales de interacción proteína-ligando (<i>Protein-ligand interaction fingerprint, PLIF</i>) entre los compuestos aislados de hojas <i>Passiflora ligularis</i> Juss y las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa. | 146 |
| 3.4.7 Ensayos de actividad inhibitoria sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa de fracciones y compuestos identificados en hojas de <i>Passiflora ligularis</i> Juss | 147 |
| 3.5 Bibliografía | 148 |
| 4. Conclusiones y Recomendaciones Generales | 151 |
| A. ANEXO: INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA CAPÍTULO 2 | 154 |
| B. ANEXO: INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA CAPÍTULO 3 | 161 |

Lista de figuras

| | Pág. |
|--|-------------|
| Figura 1.1: Mecanismos de hidrólisis de las glucosil-hidrolasas a) inversor de la estereoquímica b) retenedor de la estereoquímica..... | 10 |
| Figura 1.2: Reacciones empleadas en bioensayos de glucosil-hidrolasas intestinales. a) hidrólisis del almidón azul catalizada por la α -amilasa, b) hidrólisis del pNPG catalizada por la α -glucosidasa. Se presentan las longitudes de onda establecidas para la determinación de la actividad enzimática..... | 11 |
| Figura 1.3: Estadios de crecimiento y ciclos superpuestos durante el cultivo de <i>Passiflora ligularis</i> Juss..... | 19 |
| Figura 1.4: Estructuras de agliconas identificadas de la hidrólisis del extracto acuoso de la pulpa de <i>P. ligularis</i> a) 3-metil-but-3-en-1-ol, b) 3-oxo- α -ionol y c) salicilato de metilo..... | 21 |
| Figura 1.5: Flavonoides encontrados en muestras de Anolaima Cundinamarca-Colombia a) quercetin-3-O-glucósido, b) kaempferol-3-O-glucósido c) (-)-catequina, d) crisina..... | 21 |
| Figura 1.6: Saponinas asiladas del extracto acuoso de hojas de <i>P. ligularis</i> Juss..... | 22 |
| Figura 2.1: a) Cultivos de <i>Passiflora ligularis</i> Juss muestreados. Códigos asignados con base a la ubicación (C, H, J) y número de parcela (1-4): C parcelas ubicadas en el municipio de Anolaima-Cundinamarca, J parcelas ubicadas en el municipio de Junín-Cundinamarca; y H parcelas ubicadas en el municipio de Algeciras-Huila. b) Resumen gráfico de la distribución de las muestras de hojas de <i>P. ligularis</i> en los grupos experimentales de acuerdo con la ubicación del cultivo y la condición de almacenamiento..... | 36 |
| Figura 2.2: Espectros de RMN ^1H (MD6, 400 MHz) de extractos de hojas <i>Passiflora ligularis</i> Juss, codificados de acuerdo a la ubicación del cultivo (C, H, J), al número de parcela (1-4), a la condición de almacenamiento de las hojas (A: almacenadas a temperatura ambiente, R: almacenadas bajo refrigeración a -76°C) y al número de la muestra (1-10). Los espectros azul y verde corresponden a dos muestras provenientes de diferente municipio y almacenadas bajo refrigeración (J1R3 y C1R4). Los espectros en rojo y naranja corresponden a dos muestras recolectadas en la misma parcela pero almacenadas bajo diferentes condiciones (H1R2 y H1A3)..... | 37 |

- Figura 2.3:** Cromatograma a 340 nm (línea azul) y ELSD (línea negra) de un extracto de *Passiflora ligularis*. Se observa que los compuestos mayoritarios del extracto no corresponden a flavonoides.....46
- Figura 2.4** Cromatogramas a 267 nm (línea azul) y 340 nm (línea negra) de la muestra C1R5, recolectada en Anolaima y preservada por refrigeración. Se observa la presencia de una gran cantidad de polifenoles (**14, 16-28**)..... 47
- Figura 2.5:** Cromatogramas a 340nm (línea azul) y ELSD (línea negra) de las fracciones **a)** F4 rica en saponinas, y sin presencia de flavonoides; y **b)** F5 rico en flavonoides, y sin presencia de saponinas.....48
- Figura 2.6:** Cromatogramas de extractos polares de hojas de *P. ligularis*. **a)** Cromatograma a 340nm (línea azul) y cromatograma ELSD. **b)** TIC obtenido del análisis por HPLC-MS con modo de detección negativo. Se indican los compuestos más abundantes en los cromatogramas.....58.
- Figura 2.7:** Fotografía de la placa de Elisa de un bioensayo de inhibición de la α -glucosidasa presente en el extracto enzimático de polvo de intestino de rata. Se presentan las zonas de 100% de actividad enzimática (ausencia de inhibidor), muestras con presencia de inhibidor (acarbossa o extractos) y sus respectivos blancos. El color amarillo indica la hidrólisis del sustrato dNPG por parte de la α -glucosidasa murina, indicando una baja inhibición por parte del extracto de hojas de grandilla.....61
- Figura 2.8:** Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de la enzima α -glucosidasa (extracto enzimático de intestino de rata) por parte de extractos polares de hojas de *P. ligularis*. Se presentan gráficos de barras con sus respectivos errores estándar (S.E.M). Las muestras se agrupan de acuerdo a la parcela de origen: **a)** Parcela C1, **b)** parcela C2, **c)** parcela H1, **d)** parcela H2, **e)** parcela H3, **f)** parcela H4, **g)** parcela J1 y **h)** parcela J2. AC: acarbossa. En todos los casos las muestras marcadas con * se refieren a muestras no disponibles.....63
- Figura 2.9.** Bioensayo de inhibición de la α -amilasa. Se presentan las zonas de 100% de actividad enzimática (ausencia de inhibidor), muestras con presencia de inhibidor (acarbossa o extractos) y sus respectivos blancos. La coloración azul indica actividad enzimática.....64.
- Figura 2.10:** Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de la enzima α -amilasa. **a)** parcela C1, **b)** parcela C2, **c)** parcela H1, **d)** parcela H2, **e)** parcela H3, **f)** parcela H4, **g)** parcela J1 y **h)** parcela J2. AC: acarbossa, * muestra no disponible.....66
- Figura 2.11:** Análisis de componentes principales (PCA) de los datos de RMN de los extractos de hojas de *P. ligularis*. **a)** *score plot* clasificando las muestras de acuerdo a la condición de almacenamiento (puntos verdes: muestras almacenadas a temperatura ambiente; puntos azules: muestras almacenadas bajo refrigeración; puntos rojos: réplicas de control de calidad), **b)** *score plot* clasificando de acuerdo al municipio de recolección incluyendo todas las muestras (puntos violetas: muestras recolectadas en el

municipio de Algeciras; puntos naranjas: muestras recolectadas en el municipio de Anolaima; puntos azul celeste: muestras recolectadas en el municipio de Junín).....69.

Figura 2.12: Análisis de componentes principales (PCA) de los datos de RMN de los extractos de hojas de *P. ligularis* almacenadas bajo refrigeración. **a)** *score plot* clasificando de acuerdo al municipio de recolección muestras almacenadas en refrigeración (puntos violetas: muestras recolectadas en el municipio de Algeciras; puntos naranjas: muestras recolectadas en el municipio de Anolaima; puntos turquesa: muestras recolectadas en el municipio de Junín), **b)** *score plot* de las muestras clasificando de acuerdo a la edad del cultivo (puntos amarillos: 1 año; puntos turquesa: 2 años; puntos verdes: 4 años; puntos rojos: 7 años).....71

Figura 2.13: Análisis de proyecciones ortogonales de estructuras latentes discriminante (OPLS-DA) usando como variable discriminante la condición de almacenamiento. **a)** *score plot* mostrando la separación entre muestras refrigeradas (R) y almacenadas a temperatura ambiente (A) **b)** *S-plot* presentando los valores de desplazamiento químico que caracterizan cada agrupación.....73

Figura 2.14: Espectros de RMN ^1H (MD6, 400 MHz) de extractos de hojas *Passiflora ligularis* Juss, provenientes de la misma parcela de cultivo pero sometidos a diferente condición de almacenamiento. El espectro en verde a una muestra refrigerada y en azul a una muestra almacenada a temperatura ambiente. Se observa una clara disminución en la intensidad de señales en la zona de hidrógenos de carbohidratos.....74

Figura 2.15: Análisis de proyecciones ortogonales de estructuras latentes discriminante (OPLS-DA) usando como variable discriminante la inhibición de la actividad enzimática de la α -glucosidasa presente en el extracto de intestino de rata: **a)** “*score plot*” mostrando la separación entre muestras activas (A) y no activas (A), **b)** Curva ROC con un AUC de 0.976 que indica la correcta clasificación de las muestras y **c)** Resultado del test de permutación para el modelo OPLS-DA.....76.

Figura 2.16: *S-plot* del análisis multivariado OPLS-DA entre el perfil metabólico de hojas de *P. ligularis* y la inhibición de la α -glucosidasa. Se presentan los valores de desplazamiento químico significativos para las muestras clasificadas como activas en la parte positiva del gráfico. Los rangos de desplazamiento de RMN se representan en colores diferentes.....77.

Figura 2.17: Análisis de proyecciones ortogonales de estructuras latentes discriminante (OPLS-DA) usando como variable discriminante la inhibición de la actividad enzimática de la α -amilasa pancreática porcina: a) “*score plot*” mostrando la separación entre muestras activas (A) y no activas (A), b) Resultado del test de permutación para el modelo OPLS-DA y c) Curva ROC con un AUC de 0.950 que indica la correcta clasificación de las muestras.....79

Figura 2.18: *S-plot* del análisis multivariado OPLS-DA entre el perfil metabólico de hojas de *P. ligularis* y la inhibición de la α -amilasa. Se presentan los valores de desplazamiento químico significativos para las muestras clasificadas como activas en la parte positiva del gráfico.....81

- Figura 3.1:** Estructura del *pseudo*-hexasacárido co-cristalizado con la α -amilasa pancreática porcina en la estructura PDB 1HX0.....105
- Figura 3.2:** Estructuras 3D procesadas mediante la herramienta “*Protein preparation wizard*” del Software MAESTRO 11.5¹² de las enzimas empleadas para los estudios de acoplamiento molecular. **a)** Estructura α -amilasa pancreática porcina código PDB 1HX0, **b)** Estructura subunidad *N*-terminal de la α -glucosidasa intestinal humana código PDB 2QMJ. Los sitios de unión del ligando se esquematizan mediante superficie de van der Waals.....106
- Figura 3.3:** Estructuras de las cadenas laterales de las saponinas identificadas por Meneses *et al.* en hojas de *Passiflora ligularis* **a)** ligularósido C (**15**) **b)** ligularósido A y D (**30** y **31**)¹⁴. **c)** ligularósido B (**29**)..... 113
- Figura 3.4:** Representación gráfica de las coordenadas de la rejilla centrada en el ligando de la estructura 1HX0 visualizadas en MAESTRO 11.5.....114
- Figura 3.5:** Superposición de la conformación del ligando *pseudo*-hexasacárido derivado de acarbosa co-cristalizado en el sitio activo de la enzima 1HX0 (estructura gris) y de otra conformación (estructura verde). **a)** Antes al proceso de acoplamiento, **b)** posterior al proceso de acoplamiento empleando los parámetros P3 descritos en la tabla 3.4.....116
- Figura 3.6:** Representación gráfica de las coordenadas de la rejilla centrada en el ligando de la estructura 2QMJ visualizadas en MAESTRO 11.5.....117.
- Figura 3.7:** Superposición de la conformación del ligando acarbosa co-cristalizado en el sitio activo de la enzima 2QMJ (estructura gris) y de otra conformación (estructura verde). **a)** Antes al proceso de acoplamiento, **b)** posterior al proceso de acoplamiento empleando los parámetros P2 descritos en la tabla 3.5.....119.
- Figura 3.8:** Representación gráfica del sitio de unión de los ligandos **a)** *pseudo*-hexasacárido derivado de acarbosa, **b)** compuesto ligularósido C **15.1**, **c)** compuesto quercetina-3-*O*-glucósido **17** y **d)** compuesto luteolina-7-*O*-glucósido **17a**, en la estructura de la α -amilasa pancreática porcina, mostrando los aminoácidos de contacto (a 4 Å). Se observan interacciones de puentes de hidrógenos (línea punteada naranja) con aminoácidos claves en la catálisis de hidrólisis y estabilización del sustrato.....126.
- Figura 3.9:** Matriz de interacciones entre la α -amilasa pancreática porcina estructura 1HX0 y los ligandos estudiados, incluyendo los controles sinigrina y *pseudo*-hexasacárido derivado de acarbosa. En el eje horizontal se encuentra la posición del aminoácido y en el eje vertical los ligandos, se enmarcan los aminoácidos de la triada catalítica. La coloración indica que se encontró algún tipo de interacción entre el aminoácido y el ligando; y varía de acuerdo a la posición del aminoácido en la proteína. En el

recuadro en la parte derecha del gráfico se esquematiza el conteo de interacciones del ligando con los residuos de aminoácidos.129

Figura 3.10: Representación gráfica del sitio de unión de los ligandos **a)** acarbosa, **b)** quercetin-3-O-(6"malonil)glucósido (**18**) **c)** apigenina-7-O-glucósido (**19a**), y **d)** isoramnetin-3-O-(6"malonil)glucósido (**22**), en la estructura la subunidad *N*-terminal de la glucomaltasa humana, mostrando los aminoácidos de contacto (a 4 Å). Se observan interacciones de puentes de hidrógenos (línea punteada naranja) con aminoácidos claves en la catálisis de hidrólisis y estabilización del sustrato.....134.

Figura 3.11: Matriz de interacciones entre la subunidad *N*-terminal de la glucomaltasa intestinal humana estructura 2QMJ y los ligandos identificados en hojas de *P.ligularis*, sinigrina y pseudo-hexasacárido derivado de acarbosa. En el eje horizontal se encuentra la posición del aminoácido y en el eje vertical los ligandos, se enmarcan los aminoácidos de la triada catalítica. La coloración indica que se encontró algún tipo de interacción entre el aminoácido y el ligando..... 135

Figura 3.12: **a)** Cromatogramas a 340nm del extracto acuoso (línea rosa), fase acuosa remanente (línea azul) y fase orgánica (línea negra) de las muestras H1A1. **b)** perfil RMN de extracto acuoso (línea naranja), fase acuosa remanente (línea verde) y fase orgánica (línea azul) de las muestras C1A7.....138

Lista de tablas

| | Pág. |
|---|-------------|
| Tabla 1.1: Reportes de actividad hipoglicemiante de especies del género <i>Passiflora</i> | 14 |
| Tabla 1.2: Usos etnofarmacológicos reportados por agricultores del departamento del Huila-Colombia..... | 16 |
| Tabla 1.3: Demanda agroecológica del cultivo de granadilla (<i>Passiflora ligularis</i> Juss) en Colombia..... | 20 |
| Tabla 2.1: Datos de cultivos de <i>Passiflora ligularis</i> Juss muestreados..... | 35 |
| Tabla 2.2: Desplazamientos químicos (δ_H en metanol- d_4 - KH_2PO_4 en D_2O a pH 6.0) y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los metabolitos identificados en hojas de <i>P. ligularis</i> . Se incluyen datos de los espectros bidimensionales (COSY y HMBC)..... | 40. |
| Tabla 2.3: Compuestos fenólicos identificados en las hojas de <i>P. ligularis</i> mediante el análisis de los datos de HPLC-MS/MS y RMN 1H | 50 |
| Tabla 2.4. Soluciones a empleadas en el ensayo Inhibición de inhibición de alfa-amilasa..... | 90 |
| Tabla 2.5: Soluciones a empleadas en el ensayo Inhibición de inhibición de alfa-glucosidasa de intestino de rata..... | 91 |
| Tabla 3.1: Estructuras de α -amilasa pancreática porcina co-cristalizada con acarbosa obtenidas del PDB..... | 104 |
| Tabla 3.2: Listado de metabolitos de hojas de <i>P. ligularis</i> usados en el estudio de acoplamiento molecular frente a las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa. Se tuvo en cuenta la protonación al pH de trabajo de los ensayos de inhibición enzimática..... | 107 |
| Tabla 3.3: Diastereoisómeros modelados para los compuestos 15, 29-31 . Se describe la estereoquímica absoluta de cada uno de los centros quirales presentados en la figura 3.3..... | 113 |
| Tabla 3.4: Parámetros de la rejilla empleada en el protocolo de validación del <i>docking</i> para la enzima α -amilasa. Las condiciones de P3 son las que mejor permiten reproducir las medidas experimentales. El ligando corresponde a pseudo-hexasacárido derivado de acarbosa..... | 115 |
| Tabla 3.5: Parámetros de la rejilla empleado en ensayos de validación del protocolo de <i>docking</i> para la enzima α -glucosidasa. Las condiciones de P2 son las que mejor permiten reproducir las medidas experimentales. El ligando corresponde a acarbosa..... | 118 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 3.6: Datos del acoplamiento molecular y análisis de similitud de interacción ligando-proteína entre la α -amilasa pancreática porcina 1HX0 y los ligandos identificados en hojas de <i>P. ligularis</i> , pseudo-hexasacárido derivado de acarbosa, sinigrina y compuesto 32 | 122 |
| Tabla 3.7: Datos del acoplamiento molecular y análisis de similitud de interacción ligando-proteína entre la subunidad <i>N</i> -terminal de la glucomaltasa humana 2QMJ y los ligandos identificados en hojas de <i>P. ligularis</i> , sinigrina, acarbosa y compuesto 32 | 131 |
| Tabla 3.8: Porcentajes de inhibición enzimática del extracto acuoso, fracciones acuosas y butanólicas remanentes de algunas muestras incluidos en el análisis tipo OPLS-DA..... | 138 |
| Tabla 3.9: Actividad inhibitoria frente a las enzimas α -glucosidasa, presente en el extracto de intestino de rata; y α -amilasa pancreática porcina de algunos compuestos identificados en hojas de en hojas de <i>Passiflora ligularis</i> Juss..... | 139 |

Lista de Símbolos y abreviaturas

| Símbolo | Término |
|---------------------|--|
| A ₁₀₀ | Absorbancia 100% actividad enzimática |
| A _{B100} | Absorbancia del blanco de 100% actividad |
| A | Absorbancia muestra |
| A _{Bm} | Absorbancia blanco de la muestra |
| AC | Acarbosa |
| AcOEt | Acetato de etilo |
| AcOH | Ácido acético |
| CCD | Cromatografía en capa delgada |
| COSY | <i>Correlation Spectroscopy</i> |
| d | Doblete |
| dd | Doble doblete |
| D ₂ O | Óxido de deuterio |
| DMI | Diabetes mellitus tipo I |
| DMII | Diabetes mellitus tipo II |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| ESI | <i>Electrospray ionization</i> |
| HMBC | <i>Heteronuclear Correlation through Multiple Bond Coherence</i> |
| HMDB | <i>Human Metabolome Database</i> |
| HPLC-DAD | <i>High Performance Liquid Chromatography-Diode-array Detector</i> |
| HPLC-MS | <i>High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> |
| HRESIMS | <i>High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i> |
| HSQC | <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> |
| Hz | <i>Herz</i> |
| J | Constante de acoplamiento (Hz) |
| M | Multiplete |
| m/z | Relación masa cara |
| MeCN | Acetonitrilo |
| MeOH | Metanol |
| MeOD-d ₄ | Metanol deuterado |
| MVDA | <i>Mutivariate Data Analysis</i> |
| OPLS | <i>Orthogonal Partial Least Squares</i> |
| OPLS-DA | <i>Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis</i> |
| PCA | <i>Principal Components Analysis</i> |
| PHAC | <i>Pseudo-hexasacárido derivado de acarbosa</i> |
| PPA | <i>Porcine pancreatic alpha-amylase</i> |
| pNPG | <i>p-Nitrofenil α-D-glucopiranosido</i> |

| Símbolo | Término |
|----------------|--|
| <i>ppm</i> | Partes por millón |
| RA | Reactivo analítico |
| RMN | Resonancia Magnética Nuclear |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| s | Singlete |
| SI | Sinigrina |
| t | Triplete |
| TPA | 12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol-13-acetato |
| UV | Ultravioleta |
| δ | Desplazamiento químico |
| λ | Longitud de onda |

Introducción

La diabetes mellitus (DM) es una de las patologías metabólicas con mayor impacto en los sistemas de salud a nivel mundial, dado el gran número de pacientes que actualmente padecen la enfermedad, y sus cifras de incidencia en aumento ¹. En este contexto, la validación del uso de recursos biológicos como las plantas medicinales, y la búsqueda de compuestos bioactivos a partir de ellas, son una estrategia interesante para la obtención de tratamientos complementarios y de fácil acceso,² que además generen mayor adherencia al tratamiento.

Existe una gran diversidad de especies que conforman el arsenal terapéutico para el tratamiento de la enfermedad en la medicina tradicional de diferentes culturas². En el continente americano, las plantas del género *Passiflora* han sido utilizadas en preparaciones empleadas con diferentes fines terapéuticos, incluyendo el tratamiento de desórdenes metabólicos como la diabetes³. Además, Este género resulta de importancia para la región dado el gran número de especies que lo conforman, muchas de las cuales son endémicas y algunas poseen importancia a nivel económico por el cultivo de su fruto con fines alimenticios³. Por otra parte, el hecho de que se encuentren publicados estudios de eficacia en modelos *in vivo* e *in vitro* de diabetes⁴⁻⁷, de extractos obtenidos de hojas de diferentes especies del género, representa información de partida para la búsqueda del potencial uso de estas especies en el desarrollo de productos fitoterapéuticos y en la obtención de compuestos bioactivos.

En Colombia se han registrado 162 especies de *Passiflora*⁸, entre ellas se destaca la granadilla (*Passiflora ligularis* Juss) por su alta aceptación en los mercados de frutas y por su uso en la tradición etnofarmacológica de algunas zonas del país como el departamento del Huila⁹. Adicionalmente, ésta ha sido objeto de investigaciones direccionadas a establecer su posible actividad hipoglicemiante en modelos *in vivo* e *in vitro*, valorando la actividad inhibitoria de extractos del fruto sobre enzimas involucradas en la digestión de carbohidratos^{10,11}. Estudios fitoquímicos de hojas de *P. ligularis* han establecido la presencia de compuestos polifenólicos

como la crisina, (-)-catequina, quercetina-3-*O*-glucósido y kaempferol-3-*O*-glucósido en hojas¹². Estas hojas son usualmente tratadas como un subproducto de cultivo; pero podrían usarse como fuente de estos metabolitos, que han mostrado actividad inhibitoria sobre glucosil-hidrolasas intestinales como la α -glucosidasa^{13,14}.

Por otro lado, no sólo la identificación de los compuestos bioactivos es trascendental para validar el uso terapéutico de una especie; sino que también es necesario determinar las posibles variaciones en la presencia o concentración de dichas moléculas en los extractos de especímenes recolectados en diferentes regiones o desarrollo fenológico¹⁵. Es allí donde la metabolómica, una de las ciencias “ómicas” más recientes, se ha posicionado como una herramienta clave para valorar estos posibles cambios, puesto que permite analizar de forma integral el perfil metabólico de una muestra, omitiendo los pasos de fraccionamiento que podrían impactar en la estabilidad de los metabolitos presentes, y hacer más largo y menos confiable el análisis^{16,17}.

En este sentido, y como continuación de los trabajos previos, de los grupos de investigación involucrados en esta tesis, sobre la composición química y la actividad biológica de la especie *Passiflora ligularis* Juss, en esta tesis de maestría se planteó como objetivo general establecer el perfil metabólico de hojas de Granadilla, colectadas en cultivos de diferentes regiones del país, y correlacionar dichos perfiles con la actividad inhibitoria de los extractos polares sobre las enzimas la α -amilasa y la α -glucosidasa. Para esto se emplearon estudios metabolómicos no dirigidos por RMN, y métodos estadísticos multivariados que permitiera identificar metabolitos asociados a la actividad biológica valorada. Los compuestos asociados a esta actividad fueron sometidos a ensayos *in vitro*, e *in silico*, haciendo uso de *docking* molecular, con el fin de validar los resultados obtenidos del estudio metabómico.

El presente documento está organizado por capítulos auto contenidos, cada uno de los cuales fue redactado con un formato tipo artículo. El primer capítulo corresponde al estado del arte, en el cual se describen generalidades fisiopatológicas de la diabetes, la actividad hipoglicemiante de especies del género *Passiflora*, haciendo énfasis en la especie *Passiflora ligularis*. También se discuten los reportes de composición química de esta especie, y la relación entre los metabolitos encontrados y los reportes de actividad hipoglicemiante. El segundo capítulo discute los resultados del perfilado metabólico de los extractos polares de hojas de granadilla, y su correlación con la actividad inhibitoria de estos mismos extractos sobre las enzimas de estudio. El análisis multivariado permitió identificar algunos compuestos

responsables de la actividad valorada. Finalmente, en el tercer capítulo se discuten los resultados de la validación de los compuestos identificados como bioactivos, en el capítulo anterior, tanto por estudios *in silico* como estudios *in vitro*.

1. Capítulo 1: Estado del arte

La revisión bibliográfica realizada en este primer capítulo de la tesis se compone de tres secciones. En la primera se presentan generalidades fisiopatológicas y epidemiológicas de la diabetes mellitus, haciendo énfasis en las glucosil-hidrolasas α -glucosidasa y α -amilasa y su papel como dianas terapéuticas. Luego, se describe el papel de la fitoterapia en el tratamiento de la enfermedad, y se listan reportes de evaluación de la actividad hipoglicemiante de especies del género *Passiflora*. Se hace énfasis en las características botánicas y fenológicas de la especie *Passiflora ligularis* Juss; presentando los estudios de caracterización fitoquímica, y etnofarmacológica, para terminar con los estudios *in vitro* e *in vivo* sobre la actividad biológica de compuestos y extractos de esta especie. Finalmente, se resumen los trabajos de investigación relacionados con esta especie que se están realizando en la actualidad de la Universidad Nacional.

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Generalidades

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónica que se caracteriza por altas concentraciones plasmáticas de glucosa, producto de la convergencia de múltiples factores fisiopatológicos y ambientales propios de un individuo¹⁸. La diabetes se clasifica en tres tipos: diabetes mellitus tipo 1 (DMI), diabetes mellitus tipo 2 (DMII), y diabetes gestacional. De forma general, la diferencia entre los tipos de diabetes es la producción de insulina, la cual disminuye de forma abrupta desde estadios iniciales de la DMI, mientras que en la DMII disminuye de

forma paulatina con el progreso de la enfermedad. A la diabetes mellitus tipo 2 se le atribuye el 90% de los casos a nivel mundial¹.

La prevalencia mundial de esta enfermedad es de aproximadamente 8,5%, siendo los países del denominado “primer mundo” los que presentan las cifras más altas. En Colombia, para el 2012 la prevalencia de la diabetes mellitus tipo 2 fue del 7.4% para hombres, y para las mujeres fue del 8.7%. En el caso de la diabetes mellitus tipo 1, las cifras no se encuentran actualizadas y se estipuló una incidencia de 3,8 por cada cien mil menores de 15 años ¹⁹.

La diabetes mellitus tipo 1 se caracteriza por la destrucción de las células β de los islotes de Langerhans en el tejido pancreático, lo que genera un déficit en la producción de insulina. Esta patogénesis se ha correlacionado con eventos de tipo autoinmune, desencadenados por alteraciones genéticas, o con factores externos como rotavirus, anticuerpos de la madre, entre otros ¹⁸. En la diabetes mellitus tipo 2 se genera una resistencia tisular a la acción de la insulina producida por el cuerpo, lo que conlleva a un aumento en las concentraciones plasmáticas de glucosa tras la ingesta de alimentos. Los individuos que padecen de este tipo de diabetes presentan una tasa normal en la producción de insulina, la cual va disminuyendo con el progreso de la enfermedad. La aparición de la enfermedad está asociada con múltiples factores genéticos y ambientales, dentro de estos últimos, hábitos como las dietas hipercalóricas y el sedentarismo son los que poseen mayor correlación en las cifras de prevalencia ¹⁸. En el caso de la diabetes mellitus gestacional la intolerancia a la glucosa se presenta durante la gestación o posterior al parto, producto de las alteraciones hormonales que alteran la sensibilidad a la insulina por parte de los tejidos ²⁰. En la mayoría de casos la resistencia a la insulina desaparece con el paso del tiempo, aunque se han registrado casos en que la enfermedad es permanente²⁰.

Las complicaciones de la hiperglicemia, consecuencia de la diabetes, desencadenan alteraciones en el balance osmótico y el estrés oxidativo, producto del aumento en la actividad de ciertas enzimas, y vías de señalización intra y extracelulares. Se ha correlacionado la hiperactividad de la aldosa-reductasa, el aumento en la producción de prostaglandina E2 y tromboxano, la disminución de la óxido nítrico sintasa y la glicosilación de proteínas; con los cambios micro y macrovasculares que generan cuadros clínicos asociados a la retinopatía, nefropatía y neuropatía diabética ²¹.

1.1.2 Tratamiento

El tratamiento de la diabetes mellitus tiene como objetivo general disminuir la incidencia de las complicaciones de los estados hiperglicémicos, manteniendo las concentraciones plasmáticas de glucosa dentro de los rangos establecidos como saludables por organizaciones de referencia, como la Asociación Americana de Diabetes²². El tratamiento convencional para pacientes con DMI se basa en la administración de insulina, junto con el seguimiento constante de los niveles de glicemia para evitar tanto estados hipoglicémicos como hiperglicémicos²³. En el caso del tratamiento de la DMII, se combina la farmacoterapia con la modificación de la dieta, y el aumento de la actividad física, esto genera un mejor balance entre la ingesta y el uso de sustratos energéticos como carbohidratos, lípidos y proteínas²⁴. Para la diabetes gestacional la farmacoterapia se limita a la administración de metformina o insulina, y al continuo control de la ingesta calórica²⁰. A continuación, se presenta una breve descripción de los mecanismos de acción de fármacos empleados en el tratamiento convencional de la diabetes:

- **Insulina:** La insulina es una hormona que se administra a pacientes con DMI, o DMII en estadios avanzados. Su acción genera la fusión del transportador de glucosa (GLUT)-4 con las membranas de células de diferentes tejidos. Esto se da gracias a cascadas de señalización desencadenadas por la unión a su receptor. De esta forma se incrementa la captación de glucosa y su utilización como sustrato energético²³.
- **Sulfonilureas:** Son fármacos administrados por vía oral cuyo mecanismo de acción se basa en su unión al receptor específico de sulfonilureas en las células β pancreáticas o canal de potasio (K^+) dependiente de ATP. Esto genera una disminución en el flujo de K^+ del interior de la célula al medio; lo que conlleva a un aumento de las concentraciones de Ca^{2+} por apertura de los canales de Ca^{2+} dependiente de voltaje. Dado que gran cantidad de proteínas son sensibles al Ca^{2+} , se genera una cascada de señales que finaliza con la exocitosis de los gránulos que contienen insulina. En este grupo se encuentran los fármacos glibenclamida y tolbutamida²⁴.
- **Biguanidinas:** Estos fármacos disminuyen la producción de glucosa mediante la inhibición del proceso de gluconeogénesis. También aumentan la translocación del receptor tirosina quinasa de insulina, y del transportador de glucosa (GLUT)-4 en las membranas celulares generando mayor sensibilidad del tejido a ésta. La metformina y la fenformina son fármacos de este grupo ²⁴. Interesantemente, la primera se sintetizó

partiendo de biguanidinas producidas por la especie vegetal *Galega officinalis*, de amplio uso en la medicina tradicional europea²⁵.

- **Tiazolidinedionas:** Son fármacos que se unen al receptor activado por los proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR- γ), localizados mayoritariamente en células del tejido graso y del tejido vascular. Las tiazolidinedionas aumentan la sensibilidad a la insulina en el músculo, hígado y tejido graso, indirectamente. La rosiglitazona y pioglitazona son fármacos registrados de esta familia²⁴.
- **Glinidinas:** Fármacos como la mitiglinida y la nateglinida tienen un mecanismo de acción similar a las sulfonilureas, ya que despolarizan las membranas de las células β pancreáticas. Esta despolarización, producto de cambios en las concentraciones de iones, desencadena la liberación de insulina por parte del páncreas ²⁴.
- **Inhibidores de las glucosil-hidrolasas:** Inhiben la acción de enzimas hidrolíticas como la maltasa, isomaltasa y la glucoamilasa a nivel intestinal; produciendo una menor ruptura de carbohidratos de alto y bajo peso molecular, con una subsecuente disminución en el contenido de glucosa neto absorbido. Tienen mayor efecto a nivel postprandial en comparación con su efecto en estado de ayuno. La acarbosa, y el miglitol son medicamentos aprobados de uso clínico con este mecanismo ²⁴.

En esta tesis estamos interesados en este último tipo de inhibidores, por lo que se profundiza sobre esta diana terapéutica a continuación:

1.1.3 Glucosil-hidrolasas como dianas terapéuticas

- **Función y estructura**

Las carbohidrasas o glucosil-hidrolasas hacen parte de una familia de enzimas involucradas en procesos de ruptura de enlaces glucosídicos en diferentes tipos de carbohidratos como di, oligo y polisacáridos; siendo este procesamiento relevante en gran cantidad de procesos biológicos. Estas enzimas se agrupan en aproximadamente 115 familias, de acuerdo al grado de similitud en la secuencia de aminoácidos; dicha información se encuentra almacenada y clasificada en bases de datos como CAZy (*Carbohydrate Active enZyme*)²⁶.

Los sitios catalíticos de este tipo de enzimas son altamente conservados, sólo ciertos residuos de aminoácidos del sitio activo participan en la hidrólisis. No obstante, se presentan excepciones como en el caso de enzimas dependientes de NAD^+ en los que se hace necesaria la presencia de un coenzima²⁶. Los dos mecanismos catalíticos más comunes son el inversor y el retenedor de la estereoquímica del carbono anomérico del sustrato. En el mecanismo inversor dos residuos de aminoácidos actúan como ácido y base de Brønsted-Lowry. El residuo básico permite la desprotonación de una molécula de agua del medio, este anión desplaza a una unidad de carbohidrato a través de un ataque nucleofílico al carbono anomérico por la cara opuesta al enlace glucosídico. La remoción del protón del residuo ácido por parte del anión de glucosa liberada, estabiliza a este grupo saliente y completa el ciclo catalítico ([figura 1.1a](#))²⁷.

Por otra parte, en el mecanismo retenedor dos residuos están involucrados, uno que posee carácter nucleofílico y otro con carácter de ácido de Brønsted-Lowry. El residuo nucleofílico ataca a la glucosa en el carbono anomérico por la cara opuesta del enlace; al igual que en el caso anterior la glucosa actúa como grupo saliente removiendo el protón del residuo ácido para estabilizarse. El residuo ácido, ahora ionizado, desprotona una molécula de agua del medio, por lo que se genera un nuevo nucleófilo que desplaza al residuo nucleofílico previamente enlazado al sustrato; la estereoquímica del carbono anomérico del sustrato se mantiene debido a que la cara disponible para el ataque nucleofílico es en la que se encontraba en enlace glicosídico ([Figura 1.1b](#))²⁷.

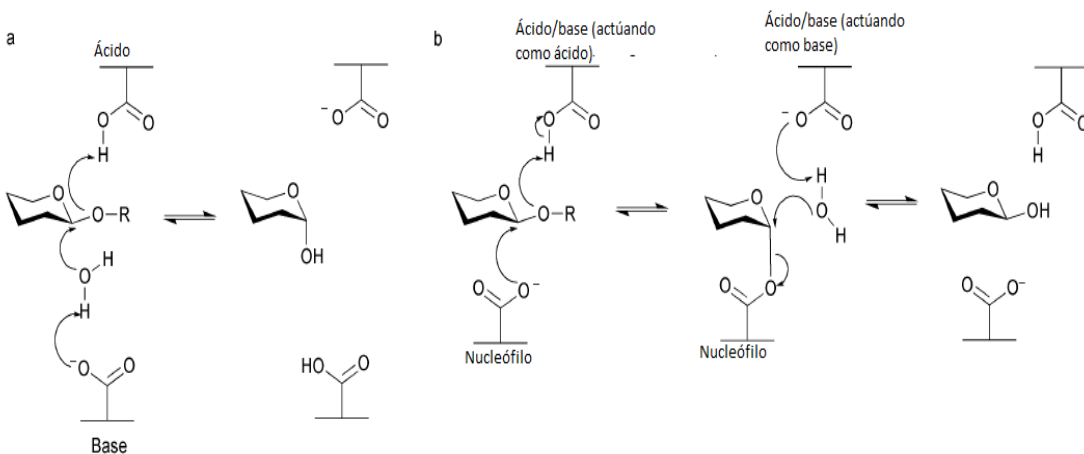


Figura 1.1: Mecanismos de hidrólisis de las glucosil-hidrolasas a) inversor de la estereoquímica b) retenedor de la estereoquímica²⁷.

Puesto que el mecanismo catalítico implica ataques nucleofílicos y reacciones ácido base, los tipos de aminoácidos que poseen dichas características son los aminoácidos de carácter ácido. En la familia de glucosil-hidrolasas, el par catalítico puede estar conformado por dos residuos de ácido glutámico o un residuo de ácido aspártico y uno de ácido glutámico²⁷. La presencia de un tercer residuo ácido es importante para la actividad de las enzimas, puesto que permite la orientación adecuada del sitio activo al formar un puente de hidrógeno con una molécula de agua²⁸. Este asunto se discutirá a mayor profundidad en el capítulo 3.

• Evaluación de la actividad enzimática

Los ensayos desarrollados para determinar la actividad catalítica de las glucosil-hidrolasas, se basan en la cuantificación directa de los monosacáridos u oligosacáridos liberados tras la hidrólisis o en la cuantificación de un compuesto enlazado a un azúcar, que será liberado por la hidrólisis enzimática, esto a través de métodos electroquímicos o colorimétricos²⁹. En el primer caso se determinan los cambios en potencial, o de corriente eléctrica, en el medio de reacción, tras la oxidación del carbohidrato liberado por la enzima³⁰. En el otro tipo de ensayos, se determina la absorbancia de una molécula en la región del espectro visible, producto de la hidrólisis del enlace glicosídico²⁹.

Para la evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos de hojas de *P. ligularis* Juss sobre glucosil-hidrolasas intestinales, se seleccionaron dos modelos ampliamente descritos y

empleados en diversas investigaciones relacionadas con la búsqueda de compuestos con potencial uso terapéutico de fuentes naturales. Estos son la inhibición de α -amilasa pancreática (purificada) empleando como sustrato almidón azul³¹, y la inhibición de α -glucosidasa, obtenida a partir de un extracto acetónico de intestino de rata, y usando el 4-nitrofenil α -D-glucopiranosido (pNPG) como sustrato³². En la [figura 1.2](#) se presentan las reacciones involucradas en los ensayos, por lo que una inhibición de la actividad enzimática, por parte cualquier compuesto o extracto activo, conllevará a una disminución de la producción del colorante medido a través de la absorbancia a 600 nm y 405 nm, respectivamente.

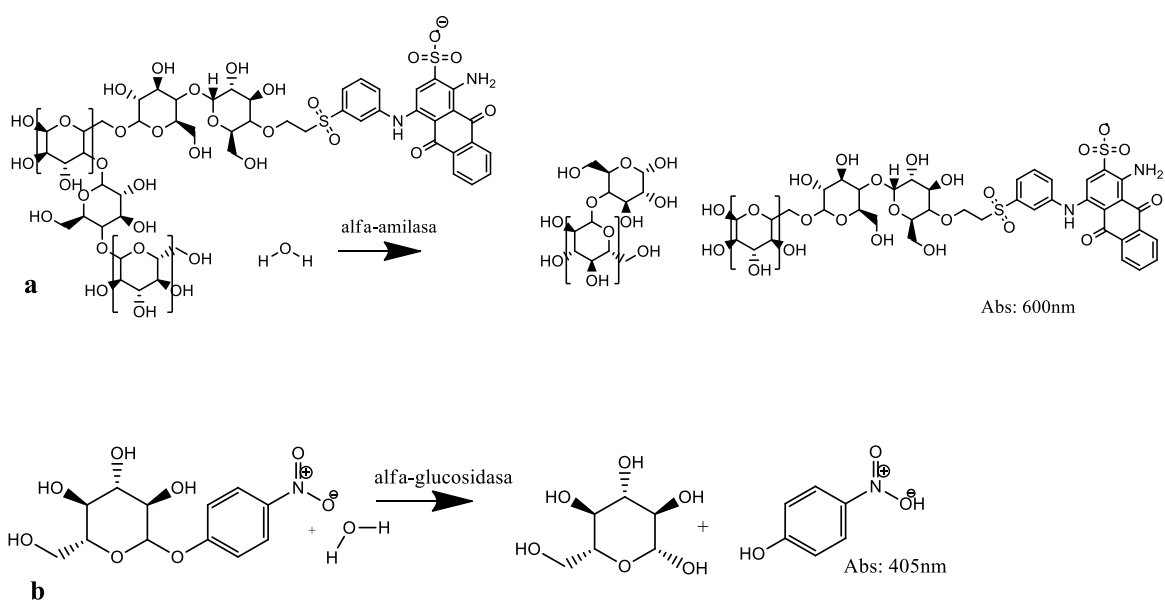


Figura 1.2: Reacciones empleadas en bioensayos de glucosil-hidrolasas intestinales. **a)** hidrólisis del almidón azul catalizada por la α -amilasa, **b)** hidrólisis del pNPG catalizada por la α -glucosidasa. Se presentan las longitudes de onda establecidas para la determinación de la actividad enzimática^{31,32}.

1.2 Fitoterapia en el tratamiento de la Diabetes

1.2.1 Drogas con actividad hipoglicemiante

Se estima que aproximadamente 1200 especies entre plantas, algas y hongos se usan en el tratamiento de la diabetes en la medicina tradicional, siendo el grupo de las plantas el mayoritario². En la bibliografía científica se encuentran múltiples investigaciones que buscan correlacionar la composición química de una determinada especie, con su uso como hipoglicemiante o antidiabéticos, a continuación, se describen algunos de los hallazgos más importantes para estas drogas vegetales*:

- **Drogas ricas en Cromo:** El cromo trivalente es uno de los componentes del factor de tolerancia a la glucosa. El factor de tolerancia se forma entre el metal, dos unidades de ácido nicotínico, glicina, ácido glutámico y cisteína. Este complejo facilita la unión de la insulina con su receptor, aumentando la tasa de absorción de glucosa y aminoácidos por parte de las células. Es por ello que drogas ricas en la forma asimilable de cromo presentan actividad hipoglicemiante, como las hojas de *Phaseolus vulgaris* L y las hojas y frutos del arándano azul *Vaccinium myrtillus* L ².
- **Drogas ricas en polisacáridos:** Los mucílagos son polisacáridos heterogéneos que modifican las condiciones fisicoquímicas del intestino, debido a su baja o nula digestión. Estos biopolímeros forman superficies viscosas sobre el lumen intestinal, disminuyendo la tasa neta de absorción de carbohidratos simples y de algunos lípidos². La consecuencia de lo anterior es una menor absorción de los carbohidratos por parte del organismo. Algunos ejemplos de este tipo de drogas son las semillas del guar *Cyamopsis tetragonolobus* y la semilla de algunas especies del género *Plantago*.
- **Drogas ricas en metabolitos secundarios y péptidos:** Las saponinas, triterpenos, esteroides y flavonoides son grupos de metabolitos secundarios con un gran número de reportes de actividad hipoglicemiante. Dentro de este grupo es interesante resaltar a las saponinas derivadas del ácido ganodérico, extraídas del hongo *Ganoderma lucidum*, que actúan a nivel de las células β pancreáticas, aumentando su número y por ende la producción de insulina. En la especie *Gymnena sylvestre* se encontró el péptido gurmarina, compuesto por 35

*Droga: Se denomina así a las plantas o sus partes enteras, molidas o pulverizadas (flores, frutos, semillas, tubérculos, cortezas, etc.) frescas o secas, así como los jugos, gomas, látex, aceites esenciales o fijos y otros componentes similares, que se emplean puras o mezcladas en la elaboración de productos terapéuticos.

aminoácidos, que interactúa con las papilas gustativas disminuyendo su respuesta sensitiva por glucosa. Lo anterior impacta en la ingesta voluntaria de alimentos con sabores dulces, puesto que se no se genera el estímulo al sabor².

Algunos flavonoides también presentan actividad antidiabética o actividad hipoglicemiante, el mecanismo de acción propuesto radica en sus propiedades antioxidantes, en donde se atenúa el daño tisular que producen diversos procesos inflamatorios relacionados con la resistencia insulina². Adicionalmente, se ha encontrado que flavonoides como la isovitexina, vitexina, orientina, kaempferol, y crisina, entre otros inhiben glucosil-hidrolasas del tracto gastrointestinal¹⁴. Este hecho fue el antecedente más importante que propició el estudio de especies de *Passiflora*, las cuales son ricas en estos polifenoles

1.2.2 Actividad hipoglicemiante del género *Passiflora*

La familia Passifloraceae está conformada por 13 géneros, el más abundante de ellos es *Passiflora*, que incluye más de 500 especies distribuidas en diferentes continentes, siendo en el continente americano donde se encuentra la mayor diversidad de especies³. El uso medicinal de especies del género *Passiflora* por parte de comunidades indígenas se ha reportado desde la época de la conquista y la colonia. En la actualidad se cuenta con reportes de estudios de su actividad sedativa, antidepresiva, ansiolítica, antiinflamatoria, gastroprotectora, hipoglicemiante, antimicrobiana, y antioxidante³. Los extractos de especies de *Passiflora* que han sido objeto de estudios de actividad biológica, se han obtenido a partir de diferentes órganos de las plantas, siendo las hojas las más estudiadas. En particular, el uso de estos extractos sobre el sistema trastornos del nervioso central se encuentra aceptada por diferentes agencias regulatorias oficiales, y se poseen monografías en algunas farmacopeas para la evaluación de su calidad³³.

La actividad hipoglicemiante de extractos de plantas de este género se ha evaluado mediante diversos ensayos tanto *in vivo* como *in vitro*., como la inhibición de glucosil-hidrolasas, y la actividad antioxidante en modelos animales con diabetes inducida^{4,-6,32-35}. En la [tabla 1.1](#) se resumen algunos reportes de la actividad hipoglicemiante de extractos de especies del género de acuerdo con el tipo de ensayo.

Tabla 1.1: Reportes de actividad hipoglicemiante de especies del género *Passiflora*.

| Especie | Órgano estudiado | Tipo de extracto | Modelo experimental (<i>In vivo</i>) | Resultado |
|----------------------------------|-------------------------|-------------------------|--|--|
| <i>Passiflora alata</i> Curtis | Hojas | Acuoso | Ratón NOD (Non-obese diabetic) | El grupo tratado con el extracto (15g hojas/L agua), presentó menor incidencia de diabetes, es decir menor cantidad de animales presentaron concentraciones plasmáticas de glucosa superiores a 250mg/dL. También menor cantidad de células inmunes infiltradas en los islotes pancreáticos, y aumento de las concentraciones de glutatión en hígado y páncreas, respecto al grupo diabético ³⁴ . |
| <i>Passiflora incarnata</i> Linn | Hojas | Metanólico | Ratón con diabetes inducida por estreptozotocina | La administración del extracto a una dosis de 200mg/kg de peso disminuyó los niveles de glucosa en ayunas, glucosa en orina, triglicéridos, LDL, colesterol total. Aumentó la tolerancia oral a glucosa y la regeneración del tejido pancreático ⁶ |
| <i>Passiflora nitida</i> Kunth | Hojas | Hidro-etanólico | Ratón con diabetes inducida por aloxano | Los ratones tratados con el extracto presentaron concentraciones de glucosa inferiores y disminución del colesterol total, respecto al grupo diabético control ⁴ |
| <i>Passiflora foetida</i> | Hojas | Hidro-etanólico | Ratas con diabetes inducida por dextrosa | Los niveles séricos de enzimas como la catalasa, glutatión peroxidasa y del antioxidante ácido ascórbico aumentaron en los grupos tratados con 3 dosis diferentes del extracto con respecto al grupo diabético sin tratamiento ³⁵ |

| <i>Passiflora edulis</i> Sims (variedad no especificada) | Hojas | Acuoso | Ratas normoglicémicas y con diabetes inducida por aloxano | La administración de una dosis única del extracto de 200 mg/kg de peso, aumentó la tolerancia oral de glucosa en ratas normoglicémicas y con diabetes inducida ³⁶ |
|--|------------------|---|--|--|
| Ensayos <i>in vitro</i> | | | | |
| Especie | Órgano estudiado | Tipo de extracto | Modelo experimental | Resultado |
| <i>Passiflora nitida</i> Kunth | Hojas | Hidro-etanólico | α -amilasa salival humana, α -glucosidasa de intestino de rata | El extracto presentó una IC ₅₀ (6.78±0.31 μ g/mL) 7 veces menor que la acarbosa (51.5±5.6 μ g/mL) en la inhibición de la α -glucosidasa. En el caso de la α -amilasa la IC ₅₀ (93.36±4.37 μ g/mL) fue 3 veces mayor a la determinada para la acarbosa (31.56±3.40 μ g/mL) ⁴ |
| <i>Passiflora mollissima</i> (variedad no especificada) | Hojas | Metanólico, en acetato de etilo y en hexano | α -glucosidasa de intestino de rata | La IC ₅₀ de los extractos en hexano, acetato de etilo, metanol y acarbosa fueron de 580.10 ± 2.53, 376.34 ± 2.15, 329.98 ± 2.06, y 276.03 ± 1.74 μ g/mL, respectivamente ³⁷ . |
| <i>Passiflora bogotensis</i> | Hojas | Acuoso | α -glucosidasa de <i>S. cerevesiae</i> | El extracto presentó una IC ₅₀ de 285 ± 3.7 μ g/mL, por su parte la acarbosa 15±0.01 μ g/mL. Los 6 flavonoides C-glicosidados aislados del extracto presentaron IC ₅₀ en rangos de 19 a 34 μ g/mL ⁷ . |

De estos reportes de evaluación de actividad biológica recopilados, es preciso señalar que las hojas son el órgano más estudiado, y que de ellas se obtienen principalmente extractos de alta polaridad. Además, se cuenta con muy pocos estudios que evalúen la actividad biológica de compuestos puros aislados de este género. Lo anterior, cobra relevancia para el presente trabajo, puesto que se evidencia un vacío en la información sobre el aislamiento e identificación de compuestos bioactivos producidos por especies de *Passiflora*.

1.2.3 *Passiflora ligularis* Juss: Generalidades farmacológicas, botánicas y fitoquímicas.

- Usos terapéuticos tradicionales, y reportes farmacológicos de evaluación de actividad biológica de *Passiflora ligularis* Juss**

La Granadilla es una especie que se cultiva con fines alimenticios y económicos debido al valor nutricional de su fruto, y a que es altamente apreciada por los consumidores por su excelente sabor. Estudios de tipo etnofarmacológico, como el realizado por Carvajal-de Pabón *et al.*, muestran algunos usos tradicionales terapéuticos para esta especie basados en los reportes de los agricultores del Huila⁹. En la [tabla 1.2](#) se resumen los resultados de dicha investigación.

Tabla 1.2: Usos etnofarmacológicos reportados por agricultores del departamento del Huila-Colombia⁹.

| Clasificación por órgano o sistema | Uso reportado | Parte de la planta y forma de administración |
|--|--|---|
| Desórdenes respiratorios, torácicos y del mediastino | Descongestionante nasal | Flor: Aspiración |
| | Para la tos | Flor: Infusión |
| | Para la tos de los bebés de tres meses en adelante | Fruto: Jugo |
| | Gripa | Fruto: Jugo |
| Desórdenes gastrointestinales | Regula la digestión | Fruto (jugo), hoja (infusión), cogollo o yema terminal (infusión) |
| | Antidiarréico | Hoja (infusión), fruto (zumo sin semilla), flor (infusión), bejuco (infusión) |
| | Gastritis | Fruto sin semillas |
| | Úlcera | Fruto sin semillas |
| Desórdenes del sistema nervioso | Insomnio y tranquilizante | Fruto, cogollos (infusión) y flor (infusión) |
| | Controlar ataques epilépticos | Flor: infusión |
| Desórdenes del tejido musculoesquelético y conectivo | Alivia las contusiones | Hojas (cataplasma), cogollos (infusión y cataplasma) |
| Desórdenes vasculares | Controla la presión arterial | Fruto |

| | | |
|--|-----------------------------------|--------------------------|
| Heridas, envenenamiento y complicaciones de procedimientos | Controla los síntomas del guayabo | Fruto: jugo |
| Desórdenes endocrinos | Crecimiento en los niños | Fruto |
| Infecciones e infestaciones | Papcias (paperas) | Hoja: Aplicación externa |

En cuanto a la evaluación de actividad biológica en condiciones de laboratorio controladas para extractos o fracciones de *Passiflora ligularis* Juss, se encontraron tres estudios revelantes. En el primer caso, se evaluó la inhibición de la actividad catalítica de la α -amilasa y α -glucosidasa por parte de diferentes extractos de la pulpa del fruto liofilizada. El extracto acetónico presentó el mayor porcentaje de inhibición para la α -amilasa y α -glucosidasa, respecto a los extractos en metanol, éter de petróleo y cloroformo. El extracto acetónico a una concentración de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, inhibió la α -amilasa y la α -glucosidasa en porcentajes de 82.56% y 75.36% respectivamente. Por su parte, la acarbosa a esa misma concentración inhibió la α -amilasa y α -glucosidasa en porcentajes del 84% y del 79.87%, por lo que el extracto acetónico mostró una potencia similar a este fármaco. Los autores relacionan estos resultados con los contenidos de compuestos polifenólicos, los cuales son conocidos por ser inhibidores naturales de este tipo de enzimas¹⁰.

Por su parte, Anusooriya *et al.* evaluaron el potencial como antidiabético de un extracto acuoso de la pulpa del fruto en un modelo *in vivo* de diabetes en rata inducido por estreptozotocina. Como resultado del estudio, los investigadores establecieron una actividad hipoglicemiante del extracto acuoso de la pulpa a una dosis de 400 mg/kg, administrada diariamente durante un mes, al comparar con el grupo diabético control. Además, evidenciaron alteraciones de parámetros bioquímicos relacionados con procesos oxidativos presentes en estados hiperglicémicos y hiperlipidémicos, puesto que el grupo experimental tratado con el extracto presentó valores de antioxidantes enzimáticos, no enzimáticos y de peroxidación lipídica similares al grupo normoglicémico y estadísticamente diferentes al grupo diabético sin tratamiento. Por último, este extracto generó la disminución de concentraciones séricas de colesterol total, triglicéridos y aumento en la cantidad de glicógeno hepático¹¹.

Finalmente, en la tesis de maestría desarrollada por Menenes *et al.* se evidenció actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*, usando el modelo de edema de

oreja en ratón inducido por TPA. Los metabolitos que presentaban mayor actividad fueron la quercetina-3-*O*-glucósido y el ligularósido C, cuyas estructuras se presentan en la siguiente sección. La importancia de este reporte radica en la identificación y elucidación de compuestos con actividad antiinflamatoria, los cuales podrían tener un uso potencial como hipoglicemiantes, dado que los fenómenos inflamatorios son una de las causas de la hiporeactividad del tejido adiposo hacia la insulina y posterior alteración del perfil lipídico ¹². Los flavonoides encontrados en estos extractos han presentado actividad inhibitoria sobre glucosil-hidrolasas intestinales, además cabe resaltar que el kaempferol-3-*O*-glucósido aumentó la secreción de insulina en islotes de células beta aislados ^{13,14}.

- **Características botánicas y fenológicas de la especie**

Passiflora ligularis Juss, es una especie del subgénero *Passiflora*, serie *Tiliaefoliae*, comúnmente conocida como “Granadilla” y originaria de la región andina del continente americano. Se caracteriza por ser un arbusto trepador robusto, que se extiende por varios metros a partir del tallo principal; sus hojas tienen forma acorazonada, son lisas con un tamaño de 6 a 8 cm aproximadamente ³⁸. Su fruto tiene forma esférica y se caracteriza por tener un exocarpio duro, de color amarillo o naranja con manchas blancas pequeñas distribuidas uniformemente. Adicionalmente, posee un mesocarpio blando y un endocarpio membranoso blanco que alberga gran cantidad de semillas cubiertas por una pulpa transparente y dulce ³⁹.

La caracterización fenológica de la Granadilla ha sido descrita por Melgarejo *et al.*, es importante resaltar que los autores declaran que la granadilla presenta superposición de estadios vegetativos y reproductivos, agrupados en tres ciclos característicos: ciclo 1, final de maduración de los frutos; ciclo 2, transición de la floración a la formación de los frutos y ciclo 3, formación de nuevas ramas. Esto implica que se pueden encontrar diferentes estados fenológicos en una misma planta, y es por ello por lo que se le clasifica como una especie semiperenne ⁴⁰.

De acuerdo a los resultados publicados la granadilla tiene 9 estadios de crecimiento, los cuales abarcan desde la etapa de germinación en vivero hasta la etapa de maduración de frutos⁴¹. Estos son:

- **Estadio de crecimiento 0:** Germinación de la granadilla con una duración promedio de 20 días.
- **Estadio de crecimiento 1:** Desarrollo de las hojas y del primer zarcillo. Se presenta en promedio hasta el día 63 después de la siembra.
- **Estadio de crecimiento 2:** Desarrollo de hojas.
- **Estadio de crecimiento 3:** Ramificación lateral.
- **Estadio de crecimiento 4:** Elongación del tallo principal.

Los estadios de crecimiento 2, 3 y 4. Tienen una duración aproximada de 295 días después de que se han trasplantado las plantas en estadio de crecimiento 1⁴².

- **Estadio de crecimiento 5:** Aparición y desarrollo del órgano floral en las ramas secundarias.
- **Estadio de crecimiento 6:** Floración.
- **Estadio de crecimiento 7:** Formación del fruto.
- **Estadio de crecimiento 8:** Maduración del fruto

Las estructuras florales aparecen aproximadamente a los 340 después del trasplante, a partir de la aparición de los botones florales el desarrollo del cartucho floral y la apertura de las flores toma un tiempo aproximado de 39 días y 45 días para el fin de la floración (cuajado del fruto). El fruto es visible 3 días después de la antesis (cuajado del fruto) y para alcanzar el tamaño característico tarda en promedio 42 días y 92 para la maduración⁴¹. A continuación, se presenta un esquema que ilustra los estadios mencionados anteriormente.

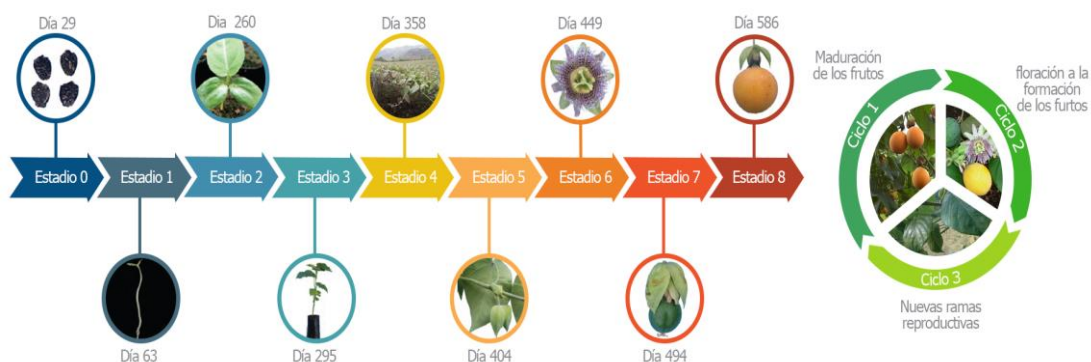


Figura 1.3: Estadios de crecimiento y ciclos superpuestos durante el cultivo de *Passiflora ligularis* Juss.

- **Características agroecológicas del cultivo**

Los estudios agroecológicos desarrollados para *P. ligularis* han permitido establecer las características óptimas para el desarrollo de plantas saludables, y por lo tanto parcelas productivas. Dentro de los factores estudiados por Melgarejo y colaboradores se tienen las precipitaciones, y la luminosidad; relacionados con la brotación de yemas florales; la fecundación; el cuajado; el llenado de los frutos y con la diferenciación de primordios florales, la floración, la coloración del fruto por la formación de azúcares y síntesis de pigmentos, respectivamente. A continuación se presenta la [tabla 1.3](#) con el resumen de las características agroecológicas óptimas para el establecimiento y desarrollo del cultivo⁴⁰.

Tabla 1.3: Demanda agroecológica del cultivo de granadilla (*Passiflora ligularis* Juss) en Colombia⁴⁰.

| Factor | Rango |
|--------------------------------|-------------------------------|
| Altitud sobre el nivel del mar | 1700-2100 msnm |
| Temperatura | 18 a 20°C |
| Luminosidad | 6 horas de brillo solar |
| Precipitación | 1500-2000 mm/año |
| Vientos | Menor de 30 km por hora |
| Humedad Relativa | 70-80% |
| pH del suelo | 6.0 a 6.5 |
| Topografía | Sin relieves y suelos francos |

- **Composición química de *Passiflora ligularis* Juss**

La composición química de *Passiflora ligularis* Juss ha sido estudiada en diferentes órganos de la planta, siendo el fruto el órgano del que más se han reportado metabolitos en la literatura científica. Chassagne *et al.* caracterizaron las agliconas volátiles de la fracción de glicósidos de la pulpa de la fruta. Dentro de las familias de compuestos identificados se encontraron alcoholes alifáticos, norisoprenoides y compuestos aromáticos; las estructuras se presentan en la [figura 1.4](#)⁴³. En el caso de compuestos volátiles de la pulpa, Porto-Figueira *et al.* identificaron como compuestos mayoritarios ésteres y alcoholes, y en menor proporción terpenos, éteres, y cetonas⁴⁴.

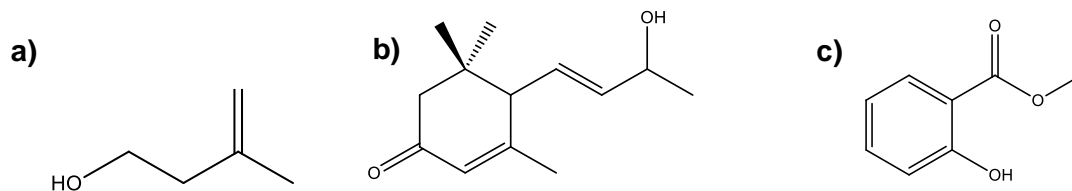


Figura 1.4: Estructuras de agliconas identificadas de la hidrólisis del extracto acuoso de la pulpa de *P. ligularis* a) 3-metil-but-3-en-1-ol, b) 3-oxo- α -ionol y c) salicilato de metilo.

Meneses *et al.* identificaron los siguientes flavonoides en extractos acuosos de hojas provenientes de Anolaima (Cundinamarca, Colombia): (-) catequina, kaempferol-3-*O*- β -glucósido, quercetin-3-*O*- β -glucósido y crisina (figura 1.5)¹². En un estudio de Zuccoloto *et al.* se evidencia la presencia de una gran cantidad de flavonoides, que no corresponden a los usualmente encontrados en los maracuyás, badea y curubas.⁴⁵ Lo anterior muestra que hay un vacío en la caracterización de los polifenoles de los extractos de hojas de granadilla, lo que se abordará en esta tesis.

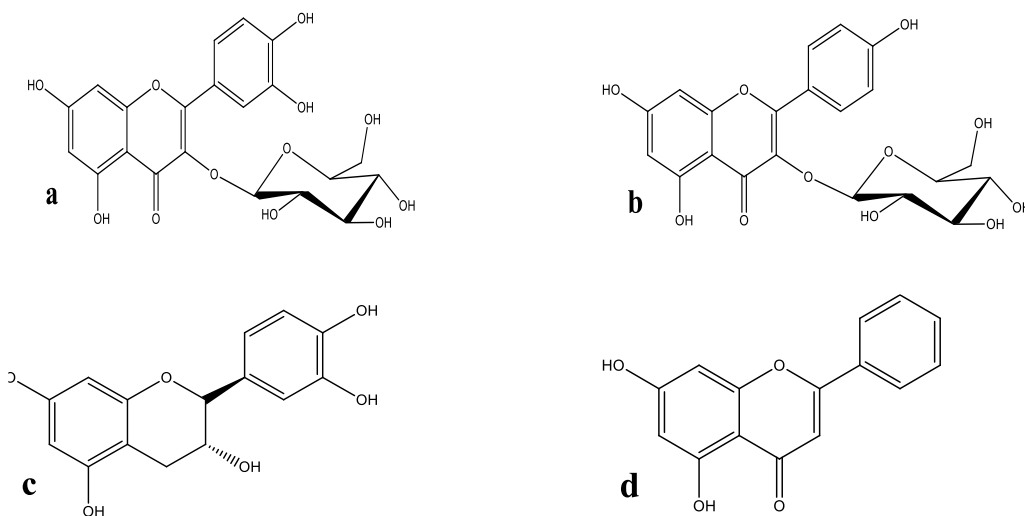


Figura 1.5: Flavonoides encontrados en muestras de Anolaima Cundinamarca-Colombia a) quercetin-3-*O*-glucósido, b) kaempferol-3-*O*-glucósido c) (-)-catequina, d) crisina¹².

Las saponinas son otro grupo de metabolitos identificados en hojas de esta especie por Meneses *et al.* Se aislaron y elucidaron 4 saponinas triterpenoidales con núcleo lanostano, denominados ligularosidos A-D. El ligularósido A ya había sido identificado en otro trabajo de investigación del grupo de investigación¹², actualmente se ha identificado el ligularósido E que está en proceso de caracterización estructural, como parte del desarrollo de un trabajo de investigación realizado en paralelo.

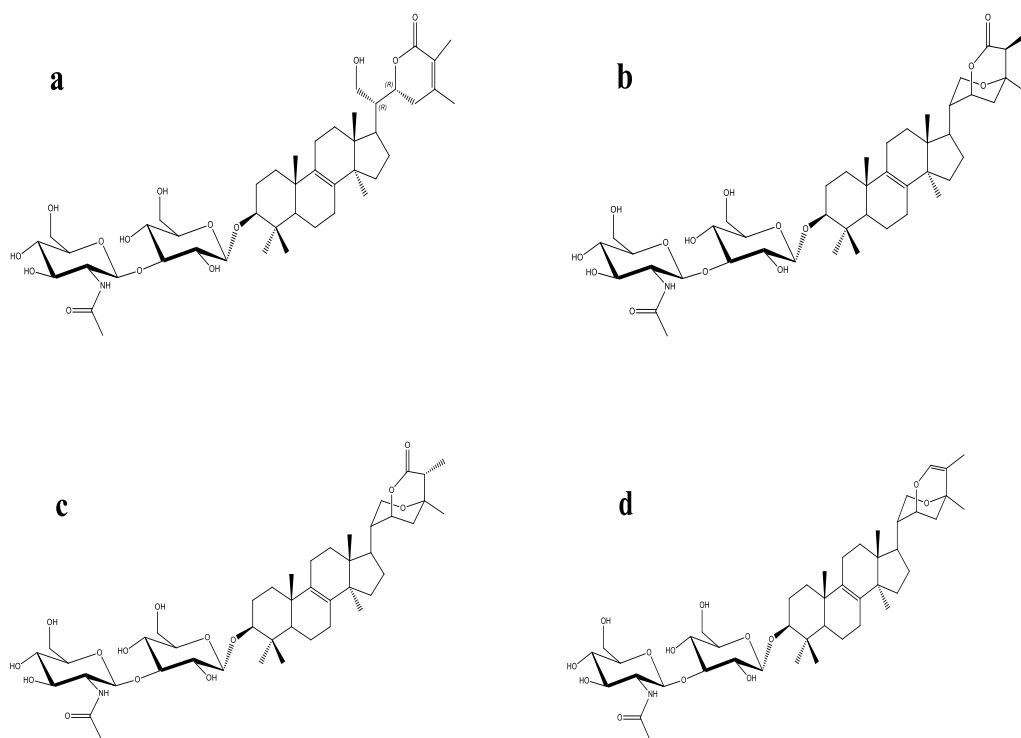


Figura 1.6: Saponinas aisladas del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* Juss

1.3 Trabajos desarrollados en la actualidad en la Universidad Nacional sobre *Passiflora ligularis* Juss

La tesis de maestría acá presentada hace parte de un proyecto de investigación financiado por Colciencias, y que tiene como objetivo caracterizar química, farmacológica y biofarmacéuticamente los extractos de hojas de *Passiflora ligularis* Juss con miras a establecer su potencial como producto fitoterapéutico indicado como hipoglicemiante. En este sentido se están desarrollando dos tesis doctorales y dos tesis de maestría (una de ellas es ésta). Una de las tesis doctorales pretende establecer los posibles mecanismos de acción hipogliceminate del extracto, fracciones y compuestos bioactivos mediante diferentes ensayos *in vivo* e *in vitro* mientras que la tesis de maestría tiene como objetivo principal la caracterización biofarmacéutica del extracto. Es así como el planteamiento y ejecución de todos los trabajos se retroalimentan a nivel conceptual y metodológico, y este trabajo aportará la caracterización química de los compuestos mayoritarios de los extractos activos. Igualmente, se aportará a la caracterización metabolómica de los extractos y su correlación con el lugar de colecta, y la actividad enzimática; así como la evaluación de los metabolitos más activos mediante ensayos *in silico* e *in vitro* contra las enzimas.

1.4 Conclusiones

La diabetes mellitus es una de las patologías que mayores retos genera a los sistemas de salud, puesto que posee cifras epidemiológicas en constante aumento. Al poseer gran cantidad de blancos terapéuticos, y dada su complejidad fisiopatológica, se hace necesaria la búsqueda de sustancias bioactivas que ofrezcan alternativas más eficaces y seguras a las actualmente disponibles. Las glucosil-hidrolasas son blancos farmacológicos ampliamente estudiados, ya que su inhibición tiene un impacto directo en el proceso de absorción de carbohidratos simples. En este contexto, los productos naturales ofrecen un potencial arsenal terapéutico dado la diversidad química de los metabolitos, y la evidencia de que son capaces de inhibir estas enzimas tanto *in vitro* como *in vivo*. Adicionalmente, los productos naturales suelen ser mejor tolerados por los pacientes lo que mejora su adherencia al tratamiento.

El género *Passiflora* es un grupo de plantas promisorio para la búsqueda de este tipo de inhibidores, dado que existen diferentes reportes relacionados con la actividad de extractos, obtenidos principalmente de las hojas, en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* de diabetes. Sin embargo, la información referente al aislamiento y elucidación estructural de dichos inhibidores es limitada y se hacen necesarios estudios que complementen dichos hallazgos, de forma que se genere mayor evidencia que soporte la aplicación terapéutica de este género.

La revisión bibliográfica permitió establecer el potencial de la especie *Passiflora ligularis* Juss (Granadilla) como fuente de este tipo de inhibidores, ya que se ha evidenciado la actividad biológica de extractos obtenidos de la pulpa del fruto en modelos de diabetes. Es importante mencionar que la mayoría de los polifenoles de hojas de granadilla aún no se han identificado; no obstante, sí se han identificado algunos compuestos polifenólicos en sus hojas con actividad inhibitoria en modelos de glucosil-hidrolasas intestinales. Lo anterior denota la necesidad de caracterizar todos los compuestos polifenólicos mayoritarios del extracto polar de las hojas de granadilla, el cual es activo como inhibidor de glucosil-hidrolasas, así como identificar los compuestos responsables de esta actividad. Finalmente, se requiere determinar si hay variaciones en el perfil metabólico de plantas desarrolladas en diferentes condiciones de cultivo, y si estas variaciones tienen impacto en la actividad biológica. La identificación y caracterización de estos metabolitos podría impactar en el uso dado a las hojas de Granadilla,

las cuales son desechadas como subproducto de cultivo, y pueden ser fuente de compuestos con valor agregado para los campesinos cultivadores.

1.5 Bibliografía

- (1) World Health Organization. Informe Mundial de La Diabetes. *Resum. orientación* **2016**, 4.
- (2) Giner Larza, E. M.; Castillo García, E. Fitoterapia y Diabetes. *Rev. Fitoter.* **2003**, 3 (2), 113–122.
- (3) Dhawan, K.; Dhawan, S.; Sharma, A. Passiflora: A Review Update. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, 94 (1), 1–23.
- (4) Montefusco-Pereira, C. V.; De Carvalho, M. J.; De Araújo Boleti, A. P.; Teixeira, L. S.; Matos, H. R.; Lima, E. S. Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Hypoglycemic Effects of the Leaf Extract from *Passiflora nitida* Kunth. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2013**, 170 (6), 1367–1378.
- (5) Figueiredo, D.; Colomeu, T. C.; Schumacher, N. S. G.; Stivanin-Silva, L. G.; Cazarin, C. B. B.; Meletti, L. M. M.; Fernandes, L. G. R.; Prado, M. A.; Zollner, R. L. Aqueous Leaf Extract of *Passiflora alata* Curtis Promotes Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects and Consequently Preservation of NOD Mice Beta Cells (Non-Obese Diabetic). *Int. Immunopharmacol.* **2016**, 35, 127–136.
- (6) Gupta, R. K.; Kumar, D.; Chaudhary, A. K.; Maithani, M.; Singh, R. Antidiabetic Activity of *Passiflora incarnata* Linn. in Streptozotocin- Induced Diabetes in Mice. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, 139 (3), 801–806.
- (7) Costa, G. M.; Cárdenas, P. A.; Gazola, A. C.; Aragón, D. M.; Castellanos, L.; Reginatto, F. H.; Ramos, F. A.; Schenkel, E. P. Isolation of C-Glycosylflavonoids with α -Glucosidase Inhibitory Activity from *Passiflora bogotensis* Benth by Gradient High-Speed Counter-Current Chromatography. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2015**, 990, 104–110.
- (8) Ocampo Pérez, J.; Coppens d'Eeckenbrugge, G.; Restrepo, M.; Jarvis, A.; Salazar, M.; Caetano, C. Diversity of Colombian *Passifloraceae*: Biogeography and an Updated List

- for Conservation. *Biota Colomb.* **2007**, *8* (1), 1–45.
- (9) Luz Marina Carvajal-de Pabón, Sandra Turbay, Lizeth Marely Álvarez, Adalberto Rodríguez, Julie Maritza Alvarez, Karla Bonilla, Sara Restrepo, M. P. Relación Entre Los Usos Populares de La Granadilla (*Passiflora ligularis* Juss) y Su Composición Fitoquímica. *Rev.Bio.Agro* **2014**, *12* (2), 185–196.
- (10) Saravanan, S.; Parimelazhagan, T. In Vitro Antioxidant, Antimicrobial and Anti-Diabetic Properties of Polyphenols of *Passiflora ligularis* Juss. Fruit Pulp. *Food Sci. Hum. Wellness* **2014**, *3* (2), 56–64.
- (11) Anusooriya, P.; Malarvizhi, D.; Gopalakrishnan, V. K.; Devaki, K. Antioxidant and Antidiabetic Effect of Aqueous Fruit Extract of *Passiflora ligularis* Juss. on Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Int. Sch. Res. Not.* **2014**, *2014*, 1–10.
- (12) Meneses, C. Saponinas y Flavonoides de *Passiflora ligularis* y Evaluación de Su Actividad Antiinflamatoria. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de química. **2016**.
- (13) Peng, X.; Zhang, G.; Liao, Y.; Gong, D. Inhibitory Kinetics and Mechanism of Kaempferol on α -Glucosidase. *Food Chem.* **2016**, *190*, 207–215.
- (14) Proença, C.; Freitas, M.; Ribeiro, D.; Oliveira, E. F. T.; Sousa, J. L. C.; Tomé, S. M.; Ramos, M. J.; Silva, A. M. S.; Fernandes, P. A.; Fernandes, E. α -Glucosidase Inhibition by Flavonoids: An in Vitro and in Silico Structure–activity Relationship Study. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32* (1), 1216–1228.
- (15) Gurib-Fakim, A. Medicinal Plants: Traditions of Yesterday and Drugs of Tomorrow. *Mol. Aspects Med.* **2006**, *27* (1), 1–93.
- (16) Kim, H. K.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. NMR-Based Metabolomic Analysis of Plants. *Nat. Protoc.* **2010**, *5* (MARCH 2010), 536–549.
- (17) Kim, H. K.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. NMR-Based Plant Metabolomics: Where Do We Stand, Where Do We Go? *Trends Biotechnol.* **2011**, *29* (6), 267–275.
- (18) Ozougwu, O. The Pathogenesis and Pathophysiology of Type 1 and Type 2 Diabetes

- Mellitus. *J. Physiol. Pathophysiol.* **2013**, *4* (4), 46–57.
- (19) Tamayo, D. C. Diabetes En Colombia: Construyendo El Panorama Desde La Perspectiva Del Observatorio de Diabetes de Colombia. *Libr. Blanco del Obs. Diabetes Colomb.* **2014**.
- (20) American Diabetes Association. Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **2004**, *27* Suppl 1 (suppl 1), S88-90.
- (21) Kaku, K. Pathophysiology of Type 2 Diabetes and Its Treatment Policy. *J. Japan Med. Assoc.* **2010**, *60* (5–6), 361–368.
- (22) American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes--2006. *Diabetes Care* **2006**, *29* Suppl 1 (suppl 1), S4-42.
- (23) McGibbon, A.; Richardson, C.; Hernandez, C.; Dornan, J. Pharmacotherapy in Type 1 Diabetes. *Can. J. Diabetes* **2013**, *37* (SUPPL.1), S56–S60.
- (24) Upadhyay, J.; Polyzos, S. A.; Perakakis, N.; Thakkar, B.; Paschou, S. A.; Katsiki, N.; Underwood, P.; Park, K.-H.; Seufert, J.; Kang, E. S.; et al. Pharmacotherapy of Type 2 Diabetes: An Update. *Metabolism* **2017**, *78*, 13–42.
- (25) Witters, L. A. The Blooming of the French Lilac. *J. Clin. Invest.* **2001**, *108* (8), 1105–1107.
- (26) Gloster, T. M.; Davies, G. J. Glycosidase Inhibition: Assessing Mimicry of the Transition State. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (2), 305–320.
- (27) Zhang, J.; Wang, G.; Li, H.; Zhuang, C.; Mizuno, T.; Ito, H.; Suzuki, C.; Okamoto, H.; Li, J. NII-Electronic Library Service. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1994**, *58* (7), 1195–1201.
- (28) Qian, M.; Nahoum, V.; Bonicel, J.; Bischoff, H.; Henrissat, B. Enzyme-Catalyzed Condensation Reaction in a Mammalian α -Amylase . High-Resolution Structural Analysis of an Enzyme - Inhibitor Complex . **2001**, 7700–7709.
- (29) Gusakov, A. V; Kondratyeva, E. G.; Sinitsyn, A. P. Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities. **2011**, 2011.
- (30) Bott, A. W.; Ph, D. Electrochemical Methods for the Determination of Glucose. In *Current*

separations; 1998; Vol. 1, pp 25–31.

- (31) Lehoczki, G.; Kandra, L.; Gyémánt, G. The Use of Starch Azure for Measurement of Alpha-Amylase Activity. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *183*, 263–266.
- (32) Ayinampudi, S. R.; Domala, R.; Merugu, R.; Bathula, S.; Janaswamy, M. R. New Icetexane Diterpenes with Intestinal α -Glucosidase Inhibitory and Free-Radical Scavenging Activity Isolated from *Premna Tomentosa* Roots. *Fitoterapia* **2012**, *83* (1), 88–92.
- (33) Community Herbal Monograph on *Passiflora Incarnata* L. European Medicine Agency, E.U, Herba. **2014**, *44*.
- (34) Colomeu, T. C.; Figueiredo, D.; Cazarin, C. B. B.; Schumacher, N. S. G.; Maróstica, M. R.; Meletti, L. M. M.; Zollner, R. L. Antioxidant and Anti-Diabetic Potential of *Passiflora Alata* Curtis Aqueous Leaves Extract in Type 1 Diabetes Mellitus (NOD-Mice). *Int. Immunopharmacol.* **2014**, *18* (1), 106–115.
- (35) Birudu, R. B.; Jagadish Naik, M.; Janardhan, M. Antioxidant Levels in Dextrose Induced Diabetic Rats Treated with *Passiflora foetida* Plant Extract, Standard Drugs and Silver Nanoparticles. *J. Chem. Pharm. Sci.* **2015**, *8* (4), 719–723.
- (36) Devaki, K.; Beulah, U.; Akila, G.; Gopalakrishnan, V. K. Effect of Aqueous Extract of *Passiflora edulis* on Biochemical and Hematological Parameters of Wistar Albino Rats. *Toxicol. Int.* **2012**, *19* (1), 63–68.
- (37) Rajendran, L. Antimicrobial Efficacy and α - Glucosidase Inhibition of *Passiflora mollissima* Bailey Leaves and Its Phytochemical Analysis. *Int. J. Pharm. Res. Bio-science* **2015**, *4* (September), 62–78.
- (38) Canessa, B. Sistema de Agro Negocios Granadilla Extracto y Fresco. Seminario de Agronegocio, Universidad del Pacífico, **2001**.
- (39) García, M. C. Manual de Manejo Cosecha y Poscosecha de Granadilla. Corpoica, Gobierno de Colombia, Produmedios: Bogotá, **2008**.
- (40) Rivera, V. Implementación de Un Plan de Manejo Técnico Para La Producción Sustentable de Granadilla (*Passiflora Ligularis* Juss) Como Alternativa de Innovación

Frente a Los Sistema Tradicionales En El Municipio de Caicedo-Antioquía. Universidad de la Salle, **2016**.

- (41) DANE. El Cultivo de La Granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.), y Los Efectos de La Temporada Seca. *Boletín Mens. Insumos y factores Asoc. a la Prod. Agropecu.* **2017**, 1.
- (42) Melgarejo, L. Granadilla (*Passiflora ligularis* Juss): *Caracterización Ecofisiológica Del Cultivo*. Universidad Nacional de Colombia (Sede Bogotá). Facultad de Ciencias, Colciencias: Corporación Centro de Desarrollo Tecnológico de las Pasifloras de Colombia – CEPASS, **2015**.
- (43) Chassagne, D.; Boulanger, R.; Crouzet, J. Enzymatic Hydrolysis of Edible *Passiflora* Fruit Glycosides. *Food Chem.* **1999**, 66 (3), 281–288.
- (44) Porto-Figueira, P.; Freitas, A.; Cruz, C. J.; Figueira, J.; Câmara, J. S. Profiling of Passion Fruit Volatiles: An Effective Tool to Discriminate between Species and Varieties. *Food Res. Int.* **2015**, 77, 408–418.
- (45) Zucolotto, S. M.; Fagundes, C.; Reginatto, F. H.; Ramos, F. A.; Castellanos, L.; Duque, C.; Schenkel, E. P. Analysis of C-Glycosyl Flavonoids from South American *Passiflora* Species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochem. Anal.* **2012**, 23 (3), 232–239.

2. Capítulo 2: Perfil metabólico de hojas de *Passiflora ligularis* Juss y su relación con la actividad inhibitoria sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa.

Resumen

Extractos de plantas del género *Passiflora* han mostrado actividad inhibitoria frente a glucosilhidrolasas, enzimas claves en el proceso de digestión de azúcares, que son blancos terapéuticos para el tratamiento de la diabetes. Estos extractos han sido obtenidos principalmente de hojas, y son de polaridad alta a media, presentando una composición metabólica diversa, y en general son ricos en saponinas, y compuestos polifenólicos entre otros. Dentro de este género, *Passiflora ligularis* Juss o Granadilla, es una especie ampliamente cultivada en el territorio nacional dada la importancia económica de su fruto. Sin embargo, la información química disponible se centra en el fruto y no en las hojas, pese a su gran potencial. Por lo anterior en este trabajo nos propusimos estudiar químicamente las hojas de este cultivo y valorar estos extractos en cuanto a su potencial para inhibir enzimas involucradas en la digestión de azúcares.

El perfilado metabólico de los extractos polares de hojas de granadilla, mediante RMN-¹H y HPLC-MS/MS, permitió la identificación de un total de **29** compuestos, 5 de los cuales corresponden a aminoácidos, 2 a carbohidratos, 4 a ácidos orgánicos, 3 a compuestos misceláneos, 1 saponina y 14 compuestos polifenólicos; principalmente flavonoides del tipo O-glicósido con núcleos quercetina, kaempferol y crisina. Así mismo, se evaluó la capacidad de inhibir la actividad enzimática de un total de 167 extractos obtenidos a partir de 25mg de hojas secas y 1 mL de una mezcla Metanol: Buffer fosfatos pH 6.0 90mM (1:1); estas hojas fueron obtenidas de 8 parcelas de cultivo ubicados en 3 municipios productores y almacenadas bajo

dos condiciones de almacenamiento: refrigeración a -78°C y a temperatura ambiente. La evaluación de la actividad enzimática se hizo frente a las enzimas α -amilasa pancreática porcina y la α -glucosidasa presente en el extracto de intestino de rata. En cuanto a la inhibición de la α -amilasa los porcentajes de inhibición variaron entre el 5 y 95%, mientras que para la inhibición de la α -glucosidasa el rango fue del 5 al 50%.

Dadas las variaciones en la actividad biológica, se empleó un estudio metabólico por RMN- ^1H , con el fin de evidenciar cambios en los perfiles metabólicos de los 167 extractos estudiados, usando la mezcla MD₆ (MeOH- d_4 : Buffer fosfatos pH 6.0 90mM en D₂O) como solvente de extracción. Mediante un análisis de componentes principales se identificó que la diferenciación de las muestras se debe principalmente a la condición de almacenamiento de las hojas y en menor medida a la ubicación y edad del cultivo. Un análisis por OPLS-DA permitió establecer que las variables responsables de esta diferenciación son aquellas relacionadas con desplazamientos químicos característicos de monosacáridos, siendo el grupo de las muestras almacenadas bajo refrigeración aquellas con mayor concentración de estos compuestos.

Respecto a la relación de las variaciones en el perfil metabólico con los cambios en la actividad inhibitoria frente a las dos enzimas de interés, se seleccionaron muestras con valores extremos de porcentaje de inhibición, evitando el uso de extractos con valores intermedios puesto que la mayoría de los extractos presentan porcentajes de inhibición homogéneos. En el análisis por OPLS-DA fueron incluidas un total de 38 muestras con porcentajes de inhibición menores a 10 y mayores al 30% para el caso de la α -glucosidasa y 73 muestras con porcentajes de inhibición menores al 40 y superiores al 80% frente a la α -amilasa. Se identificó que las variables asociadas a las muestras más activas corresponden a desplazamientos químicos característicos de compuestos como saponinas, aminoácidos y polifenoles; por lo que estas sustancias se asocian con la inhibición de las enzimas.

2.1 Introducción

El uso de plantas como alternativa terapéutica está ampliamente difundido, y aceptado, en nuestra sociedad. No obstante, falta mucha información que demuestre que este uso es seguro y efectivo, así la validación del uso de las plantas es requerida. Este proceso abarca una gran cantidad de estudios, que buscan soportar la eficacia y seguridad de las preparaciones tradicionales y de los productos fitoterapéuticos¹. Dentro de estos estudios, la caracterización química, farmacológica y toxicológica del material vegetal y sus componentes bioactivos son pasos claves, que proporcionan la información básica para las etapas posteriores que incluyen la caracterización biofarmacéutica, farmacocinética y tecnológica de los extractos. Estas caracterizaciones convergen en la obtención de productos fitoterapéuticos estandarizados que aumentan el acceso a terapias a un mayor grupo de pacientes².

La metabolómica es una de las ciencias ómicas que busca el análisis cualitativo y cuantitativo de los metabolitos de un tejido u organismo, mediante la convergencia de técnicas analíticas de amplio rango de detección, y el análisis estadístico multivariado (MVDA)³. Dado que se busca reducir el fraccionamiento y la purificación de compuestos, con el fin de mejorar la reproducibilidad de la extracción y por ende del MVDA, la identificación de los metabolitos se hace difícil y requiere del proceso de dereplicación⁴. Dentro de las técnicas analíticas comúnmente usadas se encuentra la HPLC-MS y el RMN, esta última se caracteriza por una mayor reproducibilidad y mayor rango de detección, pero menor sensibilidad³. Los estudios metabolómicos se dividen en dirigidos (*targeted*) y no dirigidos (*untargeted*), en el primer caso se estudian metabolitos con características fisicoquímicas o funcionales definidas, mientras que en segundo caso se estudia un amplio rango de metabolitos⁵. A su vez, cada uno de estos tipos de estudios metabolómicos emplean diferentes técnicas de MVDA que permite evidenciar la variabilidad de las diferentes observaciones con base en el conjunto de datos medido, o al efecto de estos sobre una variable respuesta, de ahí la clasificación en métodos no supervisados o supervisados, respectivamente. El PCA es representativo del primer grupo, y el PLS y OPLS ejemplos del segundo grupo⁶. Estas herramientas estadísticas permiten correlacionar diferentes variables con la producción metabólica, por lo que se pueden explorar los factores que impactan la expresión metabólica de las plantas ⁴; sean bióticos como

abióticos⁷ (eje. Locación geográfica, radiación solar, fitopatologías etc); o identificar los compuestos que se relacionan con la actividad biológica medida para el extracto⁴.

En este capítulo se buscó identificar cuáles compuestos presentes en el extracto polar de hojas de *Passiflora ligularis* Juss, provenientes de 3 sitios de cultivo y con dos métodos de almacenamiento, son los responsables de la actividad inhibitoria sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa. Para esto, se realizó un perfilado metabólico no dirigido de los extractos polares mediante RMN-¹H, el cual se correlacionó con la actividad inhibitoria mediante herramientas de MVDA. Finalmente, para la caracterización química de los compuestos polifenólicos se empleó un análisis por UHPLC-MS y RMN.

2.2 Resultados y discusión

La granadilla, *Passiflora ligularis* Juss (*sweet grandilla*), es altamente demandada por sus frutos con excelentes propiedades organolépticas, por esta razón se tienen cultivos de ella a escala mediana para su comercialización en la región andina colombiana. La industria de alimentos demanda las frutas, mientras las hojas son desechadas y no encuentran aplicación más allá del compostaje. En esta tesis se busca valorizar este subproducto del cultivo de la grandilla.

Las hojas de *Passiflora ligularis* Juss fueron recolectadas en dos de los departamentos de mayor producción de este cultivo: Cundinamarca (dos municipios Anolaima y Junin) y Huila (Algeciras), con el fin de caracterizar estas hojas e identificar los compuestos que ellas producen⁸. Los cultivos muestreados presentaban diferentes estadios de desarrollo fenológico, principalmente con diferente grado de maduración del fruto, presencia o ausencia de flores, entre otros ([figura 2.1a](#)). Es importante mencionar que los cultivos de granadilla presentan estadios de desarrollo superpuestos, es decir, diferentes etapas de formación de flor, fruto y hojas superpuestas. Tampoco había uniformidad en la edad de cultivo, que varió entre 1, 2, 4 y 7 años. En la [tabla 2.1](#), se detallan los datos de la recolección, tales como como ubicación, época de colecta, altura sobre el nivel del mar, edad del cultivo, y el principal estado fenológico; este último con base a la escala establecida por Melgarejo *et al*⁹.

Las hojas se cortaron con tijeras y se guardaron en bolsas plásticas individuales. Éstas fueron tratadas de dos maneras diferentes: una mitad fue congelada inmediatamente después de ser

cortada de la planta (-196°C en nitrógeno líquido, codificadas como R), almacenadas a -78°C y posteriormente liofilizadas; mientras la otra mitad fue secada a temperatura ambiente (codificada como A), con el fin de comparar el efecto del almacenamiento en la actividad biológica y la composición química, la distribución de los grupos se esquematiza en la [figura 2.1b](#).

Tabla 2.1: Datos de cultivos de *Passiflora ligularis* Juss muestreados.

| CÓDIGO ASIGNADO | UBICACIÓN | ALTITUD M.S.N.M | ÉPOCA DE COLETA | EDAD DEL CULTIVO | ESTADO FENOLÓGICO MAYORITARIO Y DESCRIPCIÓN | |
|-----------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------|------------------|---|---|
| C1 | Anolaima (Vereda Caprea) | Latitud: 4°50.0172' N | 1850 | Enero 2018 | 4 años | 89 Frutos en madurez plena |
| C2 | Anolaima (Vereda Caprea) | Longitud: 74°29.97' O | 1850 | Enero 2018 | 2 años | 76 Fruto inmaduro con tamaño final |
| H1 | Algeciras (Vereda el paraíso) | | 1900 | Febrero 2018 | 7 años | 82 Fruto en proceso de maduración 40% de su coloración alcanzada |
| H2 | Algeciras (Vereda el paraíso) | Latitud: 2° 31' 59.99" N | 1900 | Febrero 2018 | 2 años | 76 Fruto inmaduro con tamaño final |
| H3 | Algeciras (Vereda el paraíso) | Longitud: -75° 18' 60.00" O | 1900 | Febrero 2018 | 4 años | 60 Flores abiertas |
| H4 | Algeciras (Vereda el paraíso) | | 1900 | Febrero 2018 | 1 año | 70 Frutos cuajados |
| J1 | Junín (Vereda el valle) | Latitud: 4° 47' 24" N | 2000 | Julio 2018 | 1 año | 76 Fruto inmaduro con tamaño final |
| J2 | Junín (Vereda el valle) | Longitud: 73° 39' 46" O | 2000 | Julio 2018 | 1 año | 76 Fruto inmaduro con tamaño final |

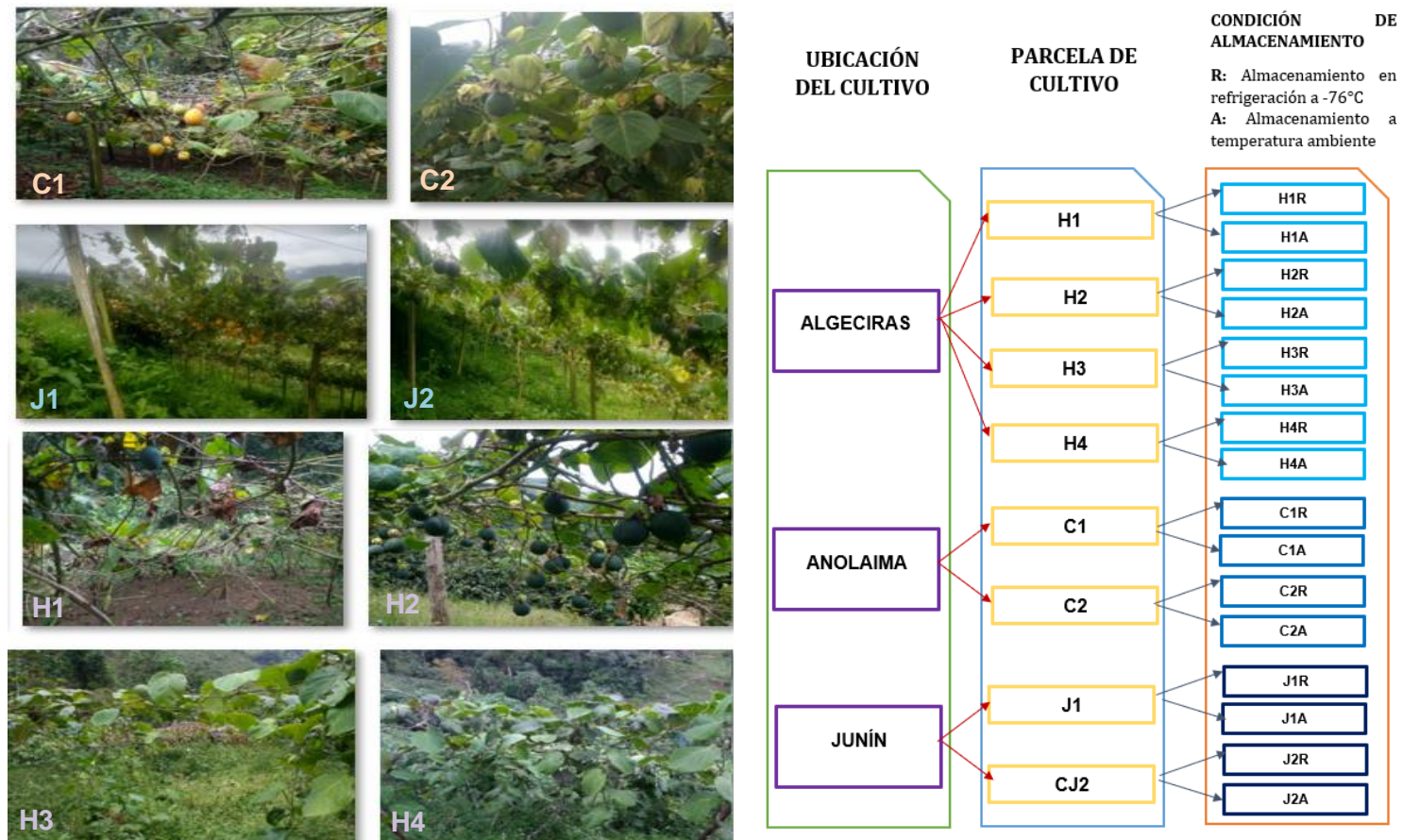


Figura 2.1: a) Cultivos de *Passiflora ligularis* Juss muestreados. Códigos asignados con base a la ubicación (C, H, J) y número de parcela (1-4): C parcelas ubicadas en el municipio de Anolaima-Cundinamarca, J parcelas ubicadas en el municipio de Junín-Cundinamarca; y H parcelas ubicadas en el municipio de Algeciras-Huila. **b)** Resumen gráfico de la distribución de las muestras de hojas de *P. ligularis* en los grupos experimentales de acuerdo con la ubicación del cultivo y la condición de almacenamiento.

2.2.1 Perfilado metabólico (*fingerprinting*) de hojas de *Passiflora ligularis* Juss.

Con el fin de obtener perfil metabólico para cada una de las muestras, se registró el espectro de RMN ^1H en MD6 para cada muestra previamente secada. Este solvente fue seleccionado porque se obtienen extractos sin polímeros y con compuestos de diferente polaridad; así mismo, el control del pH los hace más reproducibles, comprables entre sí y con los datos de la literatura¹⁰. El estudio de los espectros mostró que hay señales atribuibles a aminoácidos, carbohidratos, ácidos orgánicos, polialcoholes, polifenoles, y saponinas entre otros (misceláneos) (figura 2.2). Así mismo, se observan diferencias en el espectro registrado para muestras mantenidas en refrigeración (almacenadas a -76°C) y las secadas a temperatura ambiente (figura 2.2).

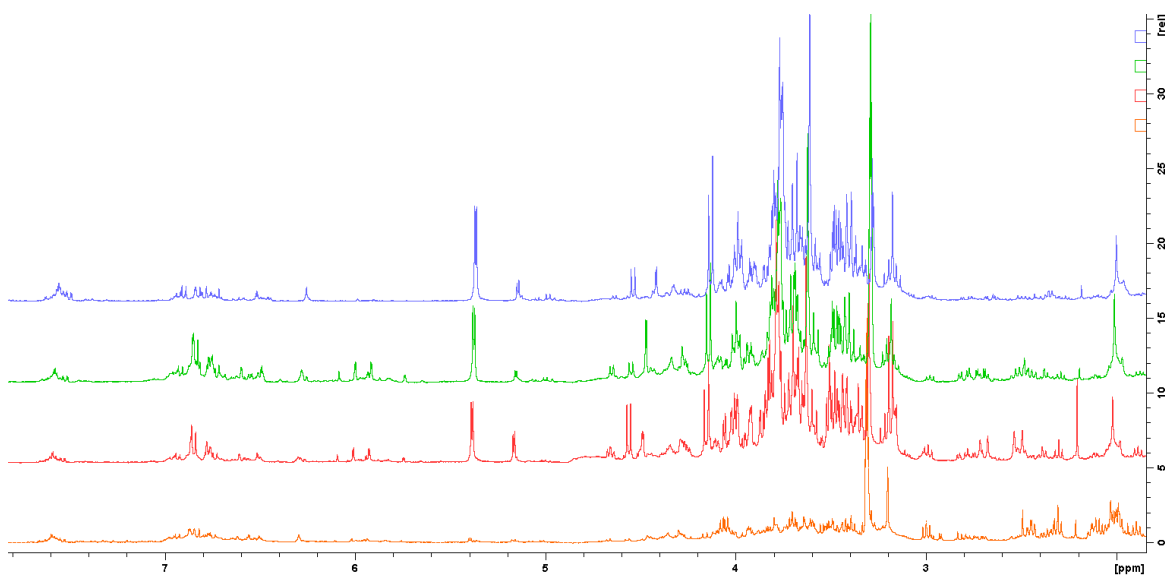


Figura 2.2: Espectros de RMN ^1H (MD6, 400 MHz) de extractos de hojas *Passiflora ligularis* Juss, codificados de acuerdo a la ubicación del cultivo (C, H, J), al número de parcela (1-4), a la condición de almacenamiento de las hojas (A: almacenadas a temperatura ambiente, R: almacenadas bajo refrigeración a -76°C) y al número de la muestra (1-10). Los espectros azul y verde corresponden a dos muestras provenientes de diferente municipio y almacenadas bajo refrigeración (J1R3 y C1R4). Los espectros en rojo y naranja corresponden a dos muestras recolectadas en la misma parcela, pero almacenadas bajo diferentes condiciones (H1R2 y H1A3).

Para la identificación de los compuestos presentes en los extractos se hizo su estudio espectroscópico, y luego se compararon las señales del espectro con las recopiladas en las librerías compiladas en Chenomex™, incluyendo la biblioteca del *Leiden Natural Products Laboratory*. Este proceso permitió la identificación de 5 aminoácidos, 3 carbohidratos, 1 polialcohol, 3 ácidos orgánicos, 2 compuestos misceláneos, 1 flavonoide y saponinas ([tabla 2.2](#)). La confirmación de estas identificaciones se hizo mediante las correlaciones “*cross-peaks*” en los espectros bidimensionales COSY ^1H - ^1H y HMBC (anexo A, [figura S2.1](#) y [figura S2.2](#)). Los datos espectroscópicos para los compuestos identificados se encuentran detallados en la [tabla 2.2](#). Muchos de los metabolitos primarios acá identificados corresponden con lo reportado por Naranjo *et al.* ¹¹ en su tesis de doctorado sobre el subgénero *Tacsonia* de *Passiflora*.

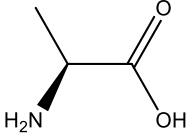
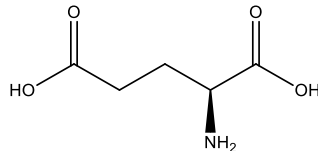
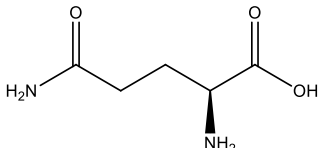
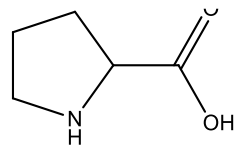
Los espectros de algunas muestras seleccionadas, compilados en la [figura 2.2](#), presentan señales de alta intensidad en la región de hidrógenos de carbohidratos (3.5-5.5 ppm), señales de menor intensidad en la región aromática (6-8 ppm), y de saponinas (0.75-1.25). Es de resaltar que los espectros contienen diferencias en las dos primeras regiones, aspecto que confirma la variabilidad en la expresión metabólica de las muestras, sin embargo, también se observan regiones altamente conservadas como la que comprende señales entre 0.75 y 1.25 ppm, atribuibles a las saponinas.

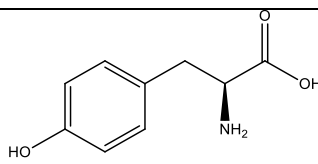
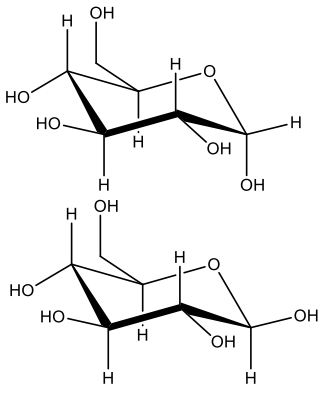
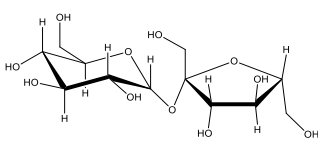
A manera de ejemplo se muestra la elucidación estructural del flavonide crisina (**14**), el cual se logró identificar a través de señales características de un núcleo tipo flavona en el espectro de RMN ^1H y correlaciones en los espectros COSY H-H y HMBC. En particular, se encontraron las señales características del anillo B no sustituido, como la señal para los hidrógenos en las posiciones H-2' y H-6' (δ_{H} 8.00, dd, $J= 8.0$ Hz, $J=1.6$ Hz), los cuales presentan constantes de acoplamiento con valores característicos de acoplamientos tipo *orto* y *meta* entre estos hidrógenos y los hidrógenos en las posiciones H-3' o H-5' y H-4', respectivamente. La señal δ_{H} 7.60 (m) integra para un total de 3 hidrógenos y se atribuye a los hidrógenos del anillo B en las posiciones H-3', H-4' y H-5'. En el caso de las señales del anillo A, se encontraron las señales características de hidrógenos en las posiciones H-6 (δ_{H} 6.51, d, $J=2.0$ Hz) y H-8 (δ_{H} 6.27, d, $J=2.0$ Hz); los valores de constante de acoplamiento confirman el acoplamiento tipo *meta* entre dichos hidrógenos, y sus valores de desplazamiento sugieren que se encuentran entre grupos donores de electrones. Finalmente, la señal δ_{H} 6.75(s), permitió confirmar la presencia de un

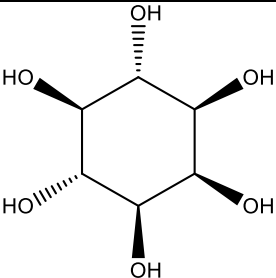
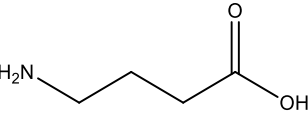
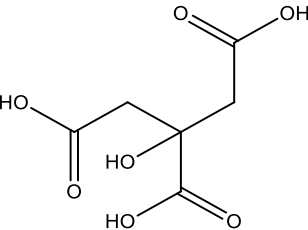
compuesto de tipo flavona, ya que este desplazamiento es característico para el hidrógeno en la posición 3 del anillo C. Es de resaltar que las correlaciones encontradas en los espectros bidimensionales (COSY y HMBC) proporcionaron evidencia adicional para la identificación de este compuesto en mezcla, como la correlación entre las señales δ_H 7.60 y δ_H 8.00, entre los hidrógenos del anillo B, y la correlación entre la señal δ_H 6.75 y δ_C 179.5, correspondiente al hidrógeno olefínico H-3 del anillo C y el carbonilo C-4.

La identificación en mezcla de la presencia de saponinas tipo ligularósidos, previamente identificadas en nuestro grupo de investigación¹², se hizo mediante las correlaciones en HMBC. Así, la señal del metilo H₃-19 (δ_H 0,99) correlaciona con los carbonos CH-1(δ_C 36.4), CH-5 (δ_C 51.1) y C-9 (δ_C 134.5), éste último de carácter olefínico y característico de la instauración del núcleo $\Delta^{9,10}$. De igual manera, la señal del metilo H₃-29 (δ_H 0.90) con los carbonos CH-3 (δ_C 88.5), C-4 (δ_C 39.2), CH-5 (δ_C 51.1) y CH₃-28 (δ_C 27.0); y del metilo desplazado a campo bajo H₃-26 (δ_H 2.03) con el carboxilo C-31 (δ_C 173.4) de la δ -lactona de la cadena lateral reportada para el ligularósido C, lo que explica su desplazamiento. Adicionalmente, se observan correlaciones en COSY entre sí de las señales diasterotópicos de H₂-1 (δ_H 1.20 y 1.76), y la de uno de los protones de H₂-2 (δ_H 1.72), que a su vez correlaciona con la señal del protón carbinólico H-3 (δ_H 3.19). Estos datos fueron contrastados con la información reportada por Meneses *et al.*¹² y se pudo evidenciar la presencia del ligularósido C. Por otra parte, no se identificaron correlaciones de señales para la cadena lateral de las otras saponinas reportadas (ligularósido A y B), pero esto puede ser un efecto de concentración. Análisis previos por HPLC-ELSD habían mostrado la presencia de al menos tres saponinas en los extractos provenientes de Anolaima ([figura 2.3](#)).

Tabla 2.2: Desplazamientos químicos (δ_H en metanol- d_4 - KH_2PO_4 en D_2O a pH 6.0) y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los metabolitos identificados en hojas de *P. ligularis*. Se incluyen datos de los espectros bidimensionales (COSY y HMBC).

| | Tipo de compuesto | Señales características en el espectro ^1H RMN $\delta(\text{ppm})$ y J (Hz) | Cross-peaks en espectros 2D $\delta(\text{ppm})$ | Estructura | Referencia |
|---------------------|-------------------|---|--|---|------------|
| Alanina (1) | Aminoácido | 1.48 (H-3, d, $J = 7.2$ Hz) 3.78 (H-2, m) | COSY δ_H 1.48 / δ_H 3.78 |  | HMDB |
| Ácido glutámico (2) | Aminoácido | 2.04 (H-2a, m) 2.12 (H-2b, m) 2.40 (H-3, m) 3.70 (H-1, m) | COSY δ_H 2.04 / δ_H 2.40 δ_H 2.12 / δ_H 2.40 δ_H 2.04 / δ_H 3.70 δ_H 2.12 / δ_H 3.70 HMBC δ_H 2.40 δ_C 180.6 |  | HMDB |
| Glutamina (3) | Aminoácido | 2.13 (H-3, m) 2.46 (H-4, m) 3.69 (H-1, m) | COSY δ_H 2.13 / δ_H 2.46 δ_H 2.13 / δ_H 3.69 HMBC δ_H 2.13 / δ_C 33.5 δ_H 2.46 / δ_C 178.1 |  | HMDB |
| Prolina (4) | Aminoácido | 2.35 (m) 4.07 (m) | COSY δ_H 1.90 / δ_H 2.35 δ_H 2.35 / δ_H 4.07 |  | HMDB |

| | Tipo de compuesto | Señales características en el espectro ¹ H RMN δ(ppm) y J (Hz) | Cross-peaks en espectros 2D δ(ppm) | Estructura | Referencia |
|--------------|-------------------|--|--|---|------------|
| Tirosina (5) | Aminoácido | 7.19 (m) 6.85 (d, J=8.3 Hz) | COSY δ _H 7.19/ δ _H 6.85 HMBC δ _H 7.19/ δ _C 158.6 |  | HMDB |
| Glucosa (6) | Carbohidrato | 5.18 (H-1 α, d, J = 3.8 Hz) 4.58 (H-1 β, d, J = 7.8 Hz) 3.87 (dd, J = 12, 2.1) | COSY δ _H 5.18/ δ _H 3.47 δ _H 4.58/ δ _H 3.20 HMBC δ _H 5.18/ δ _C 71.6 δ _H 3.46/ δ _C 73.1 δ _H 3.20/ δ _C 96.1 |  | HMDB |
| Sacarosa (7) | Carbohidrato | 5.40 (H-1, d, J=3.6 Hz) 4.15 (H-5', d, J = 8.3 Hz) 4.02 (t, J = 8.2 Hz) | HMBC δ _H 5.40/ δ _C 72.7 δ _H 5.40/ δ _C 103.7 δ _H 3.51/ δ _C 72.5 δ _H 4.15/ δ _C 74.1 |  | HMDB |

| | Tipo de compuesto | Señales características en el espectro ^1H RMN δ (ppm) y J (Hz) | Cross-peaks en espectros 2D δ (ppm) | Estructura | Referencia |
|--------------------|-------------------|---|--|---|------------|
| Myo-inositol (8) | Polialcohol | 4.02 (H-2, m) 3.61 (H-4/6, t, $J = 9.6$ Hz) 3.46 (H-1/3, dd, $J = 10, 2.9$ Hz) 3.23 (H-5, t, $J = 9.3$ Hz) | COSY $\delta_{\text{H}} 3.23 / \delta_{\text{H}} 3.61$ $\delta_{\text{H}} 3.61 / \delta_{\text{H}} 3.46$ $\delta_{\text{H}} 3.46 / \delta_{\text{H}} 4.02$ HMBC $\delta_{\text{H}} 3.23 / \delta_{\text{C}} 68$ $\delta_{\text{H}} 3.23 / \delta_{\text{C}} 72.5$ $\delta_{\text{H}} 3.61 / \delta_{\text{C}} 74.5$ $\delta_{\text{H}} 3.61 / \delta_{\text{C}} 71.4$ $\delta_{\text{H}} 4.02 / \delta_{\text{C}} 72.4$ |  | HMDB |
| GABA (9) | Ácido orgánico | 1.89 (H-3, m) 2.31 (H-2, t, $J = 7.2$) 3.01 (H-4, t like, $J = 7.2$) | COSY $\delta_{\text{H}} 2.31 / \delta_{\text{H}} 1.89$ $\delta_{\text{H}} 1.89 / \delta_{\text{H}} 3.00$ HMBC $\delta_{\text{H}} 2.31 / \delta_{\text{C}} 180.5$ $\delta_{\text{H}} 2.31 / \delta_{\text{C}} 39.1$ $\delta_{\text{H}} 2.31 / \delta_{\text{C}} 23.3$ $\delta_{\text{H}} 1.89 / \delta_{\text{C}} 39.1$ $\delta_{\text{H}} 3.01 / \delta_{\text{C}} 23.3$ |  | HMDB |
| Ácido cítrico (10) | Ácido orgánico | 2.53 (H-2a, d, $J = 16.0$) 2.71 (H-2b, d, $J = 16.0$) | COSY $\delta_{\text{H}} 2.53 / \delta_{\text{H}} 2.71$ HMBC $\delta_{\text{H}} 2.71 / \delta_{\text{C}} 177.4$ $\delta_{\text{H}} 2.71 / \delta_{\text{C}} 180.1$ |  | HMDB |

| | Tipo de compuesto | Señales características en el espectro ¹ H RMN δ(ppm) y J (Hz) | Cross-peaks en espectros 2D δ(ppm) | Estructura | Referencia |
|---------------------|--------------------|--|--|------------|------------------------------------|
| Lactato (11) | Ácido orgánico | 1.34 (H-3, d, J= 7.2 Hz) 4.06 (H-2, m) | COSY δ _H 1.34/ δ _H 4.06 | | HMDB |
| Colina (12) | Misceláneo | 3.22 (N-CH ₃ , s) 3.50 (H-1, m) 4.03 (H-2, m) | COSY δ _H 3.50/ δ _H 4.03 HMBC δ _H 3.22/ δ _C 53.8 δ _H 3.22/ δ _C 67.3 | | HMDB |
| Putrescina (13) | Misceláneo | 3.05 (m) 1.77 (m) | COSY δ _H 3.05/ δ _H 1.77 | | HMDB |
| Crisina (14) | Compuesto fenólico | 6.27 (H-8, d, J= 2.0 Hz); 6.51 (H-6, d, J 2.0 Hz); 6.75 (H-3, s), 7.60 (H-3', H-4', H-5', m), 8.00 (H-2' , H-6', dd, J= 1.6, 8.0 Hz) | COSY δ _H 6.27/ δ _H 6.51 δ _H 7.60/ δ _H 8.00 HMBC δ _H 8.00/ δ _C 132.2 δ _H 6.75/ δ _C 179.4 | | Meneses <i>et al</i> ¹² |
| Ligularósido C (15) | Saponina | 0.90 (H ₃ -29, s); 0.99 (H ₃ - 19, s); 1.20 (H-1, m); 1.76 (H-1, m), 1.83 (H ₃ -27, s); 2.03 (H ₃ -26, s); 3.19 (H-3, m) | COSY δ _H 1.20/ δ _H 1.72 δ _H 1.20/ δ _H 1.76 δ _H 1.72/ δ _H 3.19 HMBC | | Meneses <i>et al</i> ¹² |

| Tipo de compuesto | Señales características en el espectro ^1H RMN δ (ppm) y J (Hz) | Cross-peaks en espectros 2D δ (ppm) | Estructura | Referencia |
|-------------------|---|--|------------|------------|
| | | $\delta_{\text{H}} 0.90 / \delta_{\text{C}} 27.0$ | | |
| | | $\delta_{\text{H}} 0.90 / \delta_{\text{C}} 39.2$ | | |
| | | $\delta_{\text{H}} 0.90 / \delta_{\text{C}} 51.1$ | | |
| | | $\delta_{\text{H}} 0.90 / \delta_{\text{C}} 88.5$ | | |
| | | $\delta_{\text{H}} 0.99 / \delta_{\text{C}} 36.4$ | | |
| | | $\delta_{\text{H}} 0.99 / \delta_{\text{C}} 51.4$ | | |
| | | $\delta_{\text{H}} 0.99 / \delta_{\text{C}} 134.5$ | | |
| | | $\delta_{\text{H}} 2.04 / \delta_{\text{C}} 173.4$ | | |

En relación a la actividad biológica reportada en la bibliografía para los compuestos identificados, se encontró que los metabolitos primarios cumplen funciones como unidades básicas para la biosíntesis de metabolitos especializados, entre estos metabolitos se identificaron aminoácidos, carbohidratos y compuestos misceláneos como la colina y el mio-inositol^{13,14}. En el caso de los ácidos orgánicos, resalta el papel que cumple el ácido γ -aminobutírico o GABA como neurotransmisor responsable de la activación de vías neurológicas inhibitorias en el sistema nervioso de mamíferos; la unión de este ácido a sus receptores conlleva a efectos ansiolíticos y anticonvulsivantes; no obstante, su baja disponibilidad y permeabilidad en la barrera hematoencefálica sugiere que esta actividad biológica no será observada en extractos ricos en este compuesto¹⁵.

Por otro lado se encontró que dos compuestos, crisina (**14**) y ligularósido C (**15**), poseen reportes relacionados con actividad antioxidante y antiinflamatoria, respectivamente^{12,16}. La crisina es un compuesto polifenólico ampliamente estudiado por su capacidad antioxidante; se ha establecido la relación entre esta característica con la protección de diferentes tejidos expuestos a fuentes de estrés oxidativo. De esta forma, se ha determinado su papel como cardio, neuro, nefro y hepatoprotector, empleando variedad de modelos *in vivo* e *in vitro* e inclusive se ha determinado en ciertos modelos celulares que este compuesto inhibe a factores de transcripción activados por procesos redox^{16,17}. Respecto al ligularósido C, sólo se encuentra reportado su actividad antiinflamatoria en un modelo de edema en oreja de ratón inducido por TPA, como se describió en la sección 1.2.2¹². Lo anterior, podría estar relacionado con algunos de los usos terapéuticos de la especie empleados tradicionalmente, tales como el uso de las hojas para aliviar contusiones o heridas, ya que gran parte de los procesos bioquímicos desencadenados por un evento inflamatorio se encuentran mediados por procesos redox¹⁸.

- **Identificación de flavonoides**

Dada la complejidad de señales en RMN para la zona aromática, la dereplicación directa de los flavonoides por esta técnica no fue posible. De hecho, tan sólo la crisina pudo ser identificada como se consigna en la [tabla 2.2](#). La complejidad en la composición de flavonoides de los extractos polares (Metanol: buffer KH_2PO_4 pH 6.0 1:1) se evidenció en los cromatogramas obtenidos por HPLC-DAD-ELSD que se muestran en la [figura 2.3](#). Es importante señalar que el cromatograma obtenido por HPLC- ELSD permitió establecer que los compuestos mayoritarios

de estos extractos son las saponinas, los flavonoides se encuentran en una proporción mucho menor como se muestra en el cromatograma ELSD de la [figura 2.3](#). Lo anterior dado que el detector ELSD es universal, y responde a la cantidad de muestra analizada, por lo que se espera que la respuesta sea directamente proporcional a la cantidad de analito dentro de un rango de concentración determinado¹⁹. La señal para los flavonoides en ELSD es pequeña por lo que se infiere que su concentración es mucho menor que la de las saponinas ([figura 2.3](#)). De otro lado, cuando el análisis se hizo con el detector DAD ([figura 2.4](#)) se evidenció la presencia de una gran diversidad de flavonoides (**14**, **16-28**), puesto que los espectros de absorción de los picos presentaron diferentes bandas de absorción, como el caso de espectros con dos bandas de igual intensidad en las regiones entre 260-280nm y 340-370nm, características de flavonoides tipo flavonol y flavonas glicosiladas tales como quercetina, kaempferol, isoramnetina, y sus derivados, mientras que otros espectros presentaron una banda muy intensa entre 260-270 nm característica de compuestos tipo flavonas con menor cantidad de hidroxilaciones como crisina y derivados²⁰. Con este detector las saponinas no se observan ya que ellas no absorben en esta región del UV ([figura 2.4](#)).

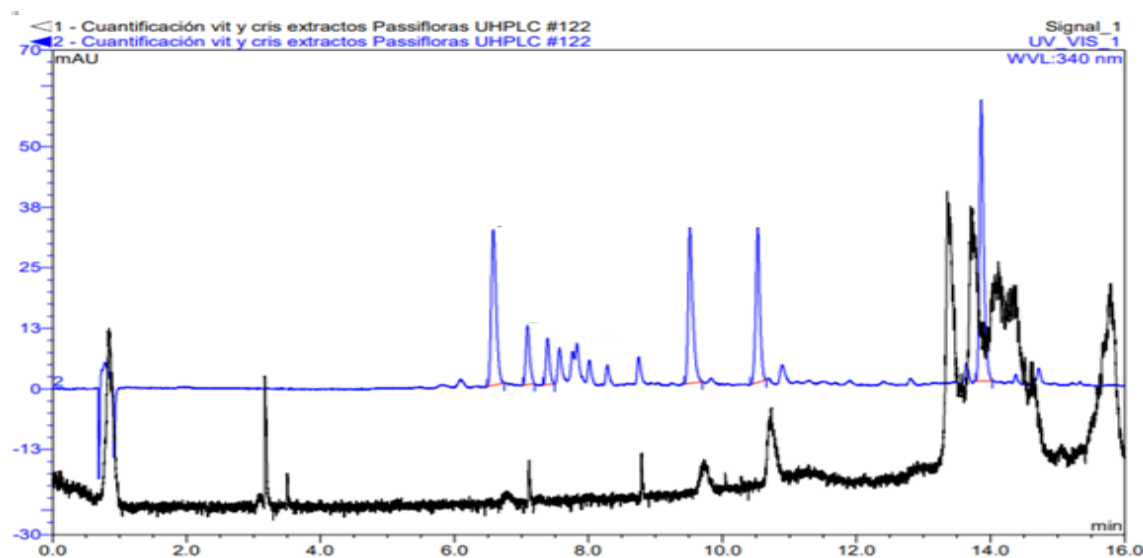


Figura 2.3: Cromatograma a 340 nm (línea azul) y ELSD (línea negra) de un extracto de *Passiflora ligularis*. Se observa que los compuestos mayoritarios del extracto no corresponden a flavonoides.

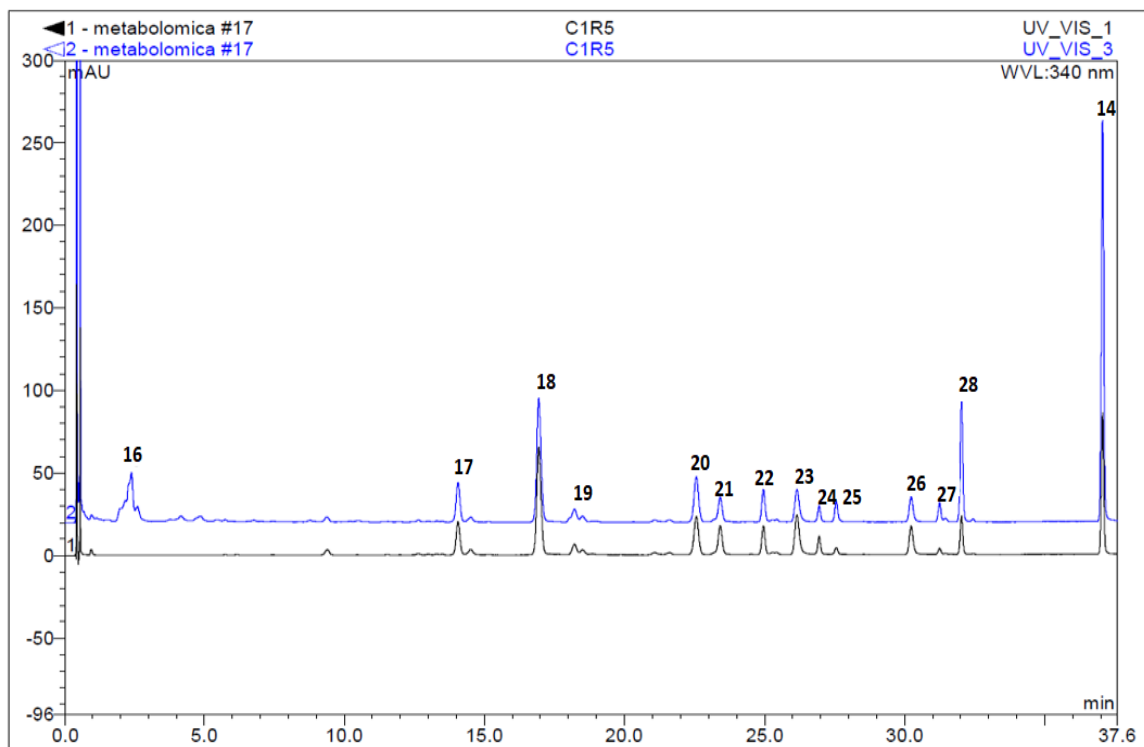


Figura 2.4: Cromatogramas a 267 nm (línea azul) y 340 nm (línea negra) de la muestra C1R5, recolectada en Anolaima y preservada por refrigeración. Se observa la presencia de una gran cantidad de polifenoles (**14, 16-28**).

Para la identificación de los compuestos fenólicos se hizo un fraccionamiento grueso, y a las fracciones obtenidas se les analizó por RMN y espectrometría de masas. Así, se identificaron los compuestos mayoritarios, en algunos casos no hubo necesidad de purificaciones posteriores porque se contaba con patrones, en otras sí se requirió proceso de purificación adicional para los ensayos de actividad biológica (capítulo 3). A continuación, se describen brevemente estos procesos.

Como se evidenció en el análisis por RMN, los extractos contenían una gran cantidad de compuestos altamente polares, como azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos. Para removerlos, los extractos polares fueron resuspendidos en agua y tratados con una resina XAD-2™. Posteriormente, la fracción retenida en XAD-2™ fue eluída con metanol, y extracto obtenido fue fraccionado por cromatografía de exclusión de tamaño haciendo uso de la resina Sephadex™ LH20. Las saponinas eluyeron en las primeras fracciones (F1-F4), a juzgar por las

señales en ELSD y la ausencia de señales en DAD ([figura 2.5a](#)); mientras los flavonoides eluyeron en las fracciones finales (F5-F17), dada la presencia de picos en los cromatogramas a 340 nm en DAD ([figura 2.5b](#)). Por otro lado, ya que en ELSD no se detectaron estos picos de flavonoides se puede decir que ellos son poco abundantes. Finalmente, se aislaron cromatográficamente los compuestos más abundantes de los extractos, y algunos compuestos minoritarios, y se registraron los espectros de RMN ^1H en DMSO d_6 o MeOH d_4 , para compararlos con los datos reportados en la literatura. La elucidación estructural de las saponinas fue realizada en un trabajo previo del grupo de investigación, por lo que en éste sólo se compararon espectros¹². Las saponinas fueron reaisladas para su uso en los bioensayos del capítulo 3. Los flavonoides debieron ser aislados y caracterizados en este trabajo.

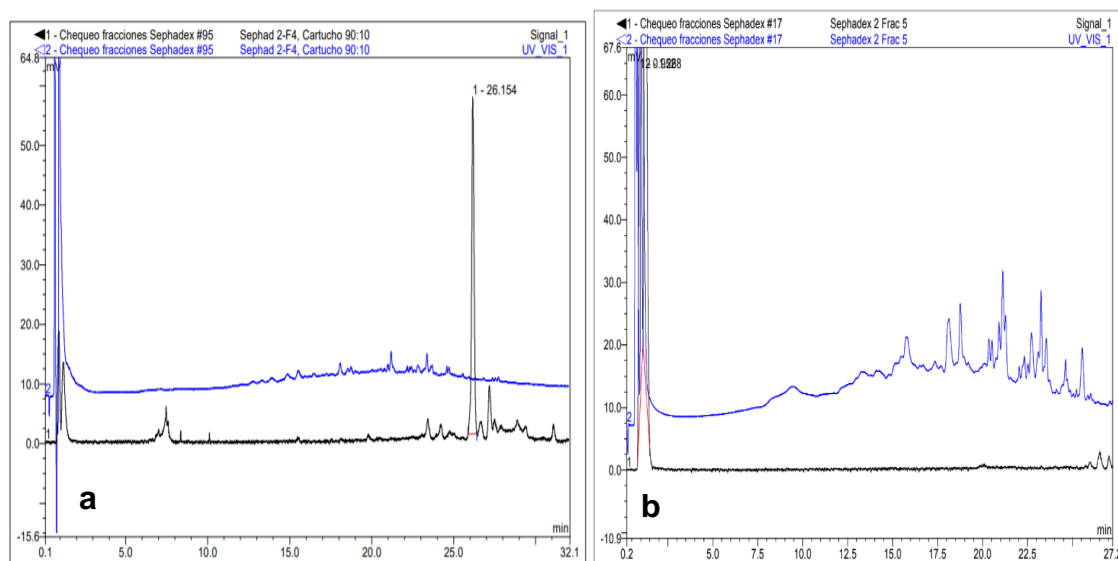


Figura 2.5: Cromatogramas a 340nm (línea azul) y ELSD (línea negra) de las fracciones **a)** F4 rica en saponinas, y sin presencia de flavonoides; y **b)** F5 rico en flavonoides, y sin presencia de saponinas

En el cromatograma presentado en la [figura 2.4](#) se observa la presencia de 14 compuestos polifenólicos (**14, 16-28**), siendo 4 de ellos mayoritarios que corresponden a **14, 16, 19** y **28**. La identificación de los flavonoides se hizo mediante el estudio de los datos de UV y MS/MS obtenidos, dadas las rupturas características de este tipo de compuestos²¹. Así mismo, se hizo la comparación de los valores de m/z obtenidos y los valores de λ_{max} con los reportados en la literatura²³⁻²⁸. En algunos casos se hicieron coinyecciones con los estándares disponibles en el

laboratorio. Para los análisis por HPLC-MS y HPLC-MS/MS se seleccionó el modo de ionización negativo y positivo, puesto que el primero mejora la sensibilidad de la detección de los flavonoides dada la presencia de los hidroxilos fenólicos²² y el segundo modo permite la identificación de otro tipo de compuestos como saponinas. De esta manera se identificaron los compuestos listados en la [tabla 2.3](#). En algunos casos para un sólo pico de HPLC-DAD se identificó la presencia de más de un compuesto, los cuales se identificaron con una letra “a” adicional, ej compuesto **17a**.

Tabla 2.3: Compuestos fenólicos identificados en las hojas de *P. ligularis* mediante el análisis de los datos de HPLC-MS/MS y RMN ¹H.

| No | t _{ret} (min) | [M-H] ⁻ | Datos MS/MS | λ _{max} (nm) | Fórmula molecular | Datos de RMN DMSO d6 o MD6*(m, J Hz) | Identificación | Referencia |
|------------|------------------------|--------------------|--|-----------------------|---|---|--------------------------------------|--|
| 16* | 2.1 ^a | 289.0738 | 245(79), 203(5.2), 151(42), 137(64), 109(100), 97(20) | 273.6 | C ₁₅ H ₁₄ O ₆ | 6.87 (H-2', d, 2.2); 6.79 (H-5', d, 8.3); 6.74 (H-6', m); 6.02 (H-8, d, 2.2); 5.93 (H-6, d, 2.2); 4.57 (H-2, d, 7.9); 4.12 (H-3, m); 2.84 (H4b, m); 2.44 (H-4a, dd, 15.6, 9.0) | (-)-Catequina | HMBD ^c Hye <i>et al</i> ²³ . |
| 17 | 14.1 ^a | 463.0864 | 301(26), 300(46), 271(33), 255 (8), 151(5) | 255 357 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ | 7.57 (H-2', H-6', dd 6.5, 2.4); 6.83 (H-5', d, 9.0); 6.39 (H-8, d, 1.7); 6.19 (H-6, d, 1.7); 5.46 (H-1", d, 7.3), 3.57 (H-6", d, 10.2) 3.22 (H-2", H-3", m), 3.08 (H-4", H-5", m) | Quercetin-3-O-glucósido | Pereira <i>et al</i> ²⁴ |
| 17a | 14.5 | 447.0937 | 285(74), 284(83), 175(5) | 255 347 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ | 7.44 (H-6', dd, 8.3, 2.0); 7.40 (H-2', d, 2.0); 6.89 (H-5', d, 8.3); 6.79 (H-8, d, 1.9); 6.75 (H-3, s); 6.44 (H-6, d, 1.9); 5.08 (H-1", d, 7.4); | Luteolin-7-O-glucósido | Lin <i>et al</i> ²⁵ |
| 18 | 17.5 | 549.0808 | 505 (10) 300 (25) 151 (3.1) | 255 357 | C ₂₄ H ₂₂ O ₁₅ | | Quercetin-3-O-(6"-malonil)-glucósido | FooDB ^c Katsube <i>et al</i> ²⁶ |

| No | t _{ret} (min) | [M-H] ⁻ | Datos MS/MS | λ _{max} (nm) | Fórmula molecular | Datos de RMN DMSO d6 o MD6*(m, J Hz) | Identificación | Referencia |
|-----|------------------------|-----------------------|---|-----------------------|---|--|--|--------------------------------------|
| 19 | 18.2 ^a | 447.0928 | 285(22) 284(5), 255(42), 227(44) | 265 355 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ | | Kaempferol-3- <i>O</i> -glucósido | Li <i>et al</i> ²⁷ . |
| 19a | 18.5 | 433.1115 ^b | 271(20) | 258 350 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ | | Apigenin-7- <i>O</i> -glucósido | Bennet <i>et al</i> ²⁸ |
| 20 | 22.5 | 479.1164 ^b | 317(67) | 256 351 | C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂ | | Isoramnetin-3- <i>O</i> -glucósido | Lee <i>et al</i> ²⁹ |
| 21 | 23.5 | 533.0881 | 489 (8) 285(22) | 264 346 | C ₂₄ H ₂₂ O ₁₄ | | Kaempferol-3- <i>O</i> -(6''-malonil)-glucósido | FooDB ^c |
| 22 | 25.0 | 565.1119 ^b | 519 (10) 317 (15) | 254 347 | C ₂₅ H ₂₄ O ₁₅ | | Isoramnetin-3- <i>O</i> -(6''-malonil)-glucósido | HMDB ^c |
| 25 | 27.5 | 415.1025 | 253(100) | 267 | C ₂₁ H ₂₀ O ₉ | 8.11 (H-2', H-6', d, 7.0); 7.61 (H-3', H-4', H-5', m); 7.07 (H-3, s); 6.88 (H-8, d, 1.8); 6.48 (H-6, d, 1.8); 5.08 (H-1'', d, 7.0); | Crisin-7- <i>O</i> -glucósido | Antri <i>et al</i> ³⁰ |
| 26 | 31.2 | 269.0443 | 151(3), 117(20) | 266 338 | C ₁₅ H ₁₀ O ₅ | 7.93 (H-2', H-6', d, 8.7); 6.93 (H-3', H-5', d, 8.7); 6.78 (H-3, s); 6.48 (H-8, d, 1.9); 6.19 (H-6, d, 1.9) | Apigenina | Alwahsh <i>et al</i> ³¹ . |
| 27 | 31.2 | 285.0404 | 257(18), 213(7) | 266 338 | C ₁₅ H ₁₀ O ₆ | | Kaempferol | Li <i>et al</i> ²⁷ . |

| No | t _{ret} (min) | [M-H] ⁻ | Datos MS/MS | λ_{\max} (nm) | Fórmula molecular | Datos de RMN DMSO d6 o MD6*(m, J Hz) | Identificación | Referencia |
|-----|------------------------|--------------------|-------------|-----------------------|---|--|------------------------------------|----------------------------------|
| 28 | 32.0 | 457.1137 | 253(100) | 267 | C ₂₃ H ₂₂ O ₁₀ | 8.10 (H-2', H-6', d, 6.6 Hz); 7.60 (H-3', H-4', H-5', m); 7.05 (H-3, s); 6.85 (H-8, d, 2.1); 6.48 (H-6, d, 2.1); 5.11 (H-1", d, 7.5); 4.38 (H-6a", dd, 11.2, 1.5); 4.13 (H-6b", dd, 11.2, 7.0); 2.01 (CO-CH ₃ , s) | Crisin-7-O-(6"-O-acetil)-glucósido | Antri <i>et al</i> ³⁰ |
| 14* | 37.0 ^a | 253.050 | 145(3) | 267 | C ₁₅ H ₁₀ O ₄ | 8.00 (H-2', H-6', dd, 8.0, 1.6) 7.60 (H-3', H-4', H-5', m); 6.75 (H-3, s); 6.51 (H-6, d, 2.0); 6.27 (H-8, d, 2.0) | Crisina | Han <i>et al</i> ³² |

^a Coelución con estándar, ^b ión quasi-molecular [M+H]⁺ detectado en ESI modo positivo, ^c comparación con espectro simulado, * espectro tomado en MD6

A continuación, se ilustra la identificación de polifenoles como la catequina y derivados de kaempferol, apigenina, quercetina y crisina, siendo estos dos últimos los más abundantes:

El compuesto **16** eluído a los 2.1 min muestra un ion quasi-molecular [M-H]⁻ en $m/z=289.0738$, que indica una fórmula molecular de $C_{15}H_{14}O_6$ (Δ 4 ppm) sugiriendo la ausencia de residuos de azúcar. El valor de λ_{max} en 274 nm sugiere la presencia de un núcleo tipo **catequina**³³. En el análisis por MS/MS se observa la presencia de fragmentos en $m/z=245$ [M-H-44], característico de la ruptura en los enlaces de las posiciones 2 y 4 en el anillo C; y en $m/z=137$ [M-H-152] producto de la ruptura en las posiciones 1 y 3 en el mismo anillo. Por otro lado, los datos de RMN-¹H, en mezcla, permitieron validar la información obtenida por MS para este compuesto, puesto que se encontraron las señales características de un compuesto tipo flavan-3-ol, como el dd en δ_H 2.44 y el multiplete en 2.84, asignados mediante comparación con datos de la literatura a los hidrógenos diasterotópicos de la posición 4 del anillo C, posición que se encuentra reducida en este tipo de polifenoles²³. De igual forma, las señales en δ_H 4.57 (d) y 4.12 (m) atribuibles a los hidrógenos en las posiciones 2 y 3 del anillo C, respectivamente, indican la ausencia de insaturación. Finalmente, las señales en la región aromática permitieron confirmar la presencia de los hidrógenos en las posiciones 6, y 8 del anillo A, y las posiciones 2', 5' y 6' del anillo B. Dado que los valores de desplazamiento y constantes de acoplamiento se ajustan a lo reportado²³ el compuesto **16** se identificó como (-)-catequina, previamente reportada para esta especie¹².

En cuanto a los compuestos derivados de **quercetina**, se identificó que los compuestos **17** y **18** son glicósidos de este flavonoide, puesto que se encontraron los fragmentos $m/z=300$ y $m/z=301$ característicos de este núcleo²⁷. A manera de ejemplo de elucidación de estos compuestos se presenta la de **17**, tiempo de retención de 14.1min, que tiene un ion quasi-molecular [M-H]⁻ en $m/z= 463.0864$, que sugiere una fórmula molecular de $C_{21}H_{20}O_{12}$ (Δ 2.5 ppm), posee dos λ_{max} en 255nm y 357nm característico de un núcleo quercetina²⁴. Mediante los datos de MS/MS se encontró una pérdida característica de una hexosa [M-H-162], la cual genera dos fragmento de $m/z=301$ y un fragmento $m/z= 300$, característicos de una aglicona de núcleo tipo quercetina en la que se ha perdido una hexosa neutra o una hexosa radical, respectivamente²⁴. Los datos del espectro de RMN-¹H (400 MHz DMSO d_6) validaron la presencia de este compuesto, dado que se identificaron señales características para hidrógenos

aromáticos presentes en el núcleo quercetina, tales como δ_H 7.57 (H-2', H-6', dd, $J=6.5, 2.1$); δ_H 6.89 (H-5', d, $J=9.0$ Hz); δ_H 6.39 (H-8, d, $J=1.7$ Hz); y δ_H 6.19 (H-6, d, $J=1.7$ Hz). La señal del hidrógeno unido al carbono anomérico en δ_H 5.46 (H-1", d, $J=7.3$ Hz) sugiere una configuración β por el valor de la J . Las señales de los hidrógenos carbinólicos en δ_H 3.56 (H-6", d, $J= 10.2$ Hz); δ_H 3.22 (H-2", H-3", m); y 3.08 (H-4", H-5", m); indican la presencia de un residuo de glucosa unido a la aglicona mediante un enlace glicosídico tipo β . Los datos fueron comparados con datos reportados del compuesto en DMSO d_6 ²⁴ resultando ser iguales. Adicionalmente, los valores de λ_{max} y la coelución con el estándar permitieron establecer que este compuesto es la quercetin-3-*O*-glucósido.

Para el derivado de quercetina **18**, con un tiempo de retención de 17.5 min, se encontró que tiene un ion quasi-molecular [M-H]-en $m/z=549.0808$, que indica una fórmula molecular $C_{24}H_{22}O_{15}$ (Δ 0.7 ppm) sugiriendo la presencia de azúcar y un grupo malonato. Posee un λ_{max} en 255 nm y otro en 357 nm que son característicos de núcleos tipo quercetina. El análisis de los datos de MS/MS indican la presencia de un fragmento $m/z=505$ [M-H-CO₂], el cual se atribuye a una descarboxilación del grupo malonato; un fragmento $m/z=300$, el cual se atribuye a la pérdida de *O*-hexosa y malonato. Estos datos permiten inferir que el compuesto **18** es un derivado de quercetina, que se sugiere que es el quercetin-3-*O*-(6"-malonil)-glucósido, de acuerdo a la información reportada en el Human Metabolome Database y en la referencia citada²⁶

Adicionalmente, los compuestos **20** y **22** presentaron fragmentaciones comunes en *O*-glucósidos derivados de **isoramnetina**, la cual es biosintetizada tras la metilación en la posición 3' de la quercetina. Para ellos se obtuvieron iones quasi-molecular [M+H]⁺ de 479.1164 y 565.1119 los cuales indican fórmulas moleculares de $C_{22}H_{22}O_{12}$ (Δ -3.3ppm) y $C_{25}H_{24}O_{15}$ (Δ -12.03ppm), respectivamente. Para el compuesto **20**, se encontró el fragmento [M+H-162] $m/z=317$ correspondiente a la aglicona isoramnetina; mientras que en el compuesto **22**, se identificaron los fragmentos [M+H-CO₂] $m/z=519$ y [M+H-248] $m/z=317$, los cuales se fundamentan en la descarboxilación del grupo malonao y la pérdida de *O*-hexosa y malonato, respectivamente. Estos datos se compararon con espectros simulados en bases de datos, sugiriendo que **20** es la isoramnetina-3-*O*-glucósido y **22** es isoramnetina-3-*O*-(6"-malonil)-

glucósido. Resaltamos que las estructuras sugeridas deben ser confirmadas mediante análisis por RMN, pero la baja concentración en las que se encuentran no permitió obtener espectros de calidad.

Otro de los núcleos identificados fue el **kaempferol**, el cual se identificó mediante la comparación de los datos de λ_{\max} y la presencia del fragmento $m/z=285$ en los espectros de MS/MS; de esta forma los compuestos **19** y **21** corresponden a glicósidos de este flavonoide y el compuesto **27** al kaempferol en forma de aglicona. En el caso del compuesto **19**, presentó un tiempo de 18.2 min y un ion quasi-molecular $[M-H]^-$ $m/z=447.0928$ que indica una fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_{11}$ (Δ -1.1ppm). La pérdida de una hexosa neutra o una hexosa radical unidas por una enlace *O*-glicosídico genera los dos fragmentos observados en el espectros de MS/MS, con $m/z=285$ y $m/z=284$; por otro lado el núcleo kaempferol se confirma por los fragmentos con $m/z=255$ (M-CO+H) y $m/z=227$ (M-2CO+H), los cuales se generan tras la pérdida de radicales a partir del fragmento $m/z=284$ ³⁴. Finalmente, los valores de λ_{\max} y la coelución con estándar sugieren que **19** se trata del compuesto kaempferol-3-*O*-glucósido. En relación al compuesto **21**, con un tiempo de retención de 23.5min y un ion quasi-molecular $[M-H]^-$ $m/z=533.0881$ que sugiere la fórmula molecular $C_{24}H_{22}O_{14}$ (Δ 2.5ppm), se encontraron fragmentos característicos de flavonoides glicosilados esterificados con malonil como el ion $[M-H-CO_2]^-$ $m/z=489$ y el ion $[M-H-248]^-$ $m/z=285$ que se atribuye a la pérdida de la hexosa y el grupo malonato. La comparación de estos datos con el espectro simulado del compuesto kaempferol-3-*O*-(6''-malonil)-glucósido permiten sugerirlo como el compuesto **21**. Así mismo, el compuesto **27** con un ion quasi-molecular $[M-H]^-$ $m/z=285.0404$ y fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_6$ (Δ -0.2ppm), presentó un espectro UV y fragmentaciones característicos del kaempferol, como la pérdida de CO que genera el fragmento con $m/z=257$ ²⁷.

En relación, a los compuestos con núcleo **apigenina**, los datos de RMN en conjunto con MS permitieron identificar por una parte la apigenina en su forma de aglicona, compuesto **26**, y el compuesto **19a** como un glicósido de este flavonoide. Para el compuesto **19a** se encontró un ion quasi-molecular $[M+H]^+$ $m/z=433.1115$, una fórmula molecular calculada de $C_{21}H_{20}O_{10}$ (Δ 2.3ppm) y un fragmento $[M+H-162]$ con $m/z=271$ atribuible a la pérdida de una hexosa unida mediante un enlace *O*-glicosídico; por lo tanto, al contrastar estos datos de fragmentaciones y de λ_{\max} se sugiere que el compuesto **19a** es la apigenina-7-*O*-glucósido²⁸. El compuesto **26** generó

un ión quasi-molecular [M-H]⁻ $m/z=269.0443$ que sugiere la fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_5$ (Δ -4.4ppm) y señales en el espectro RMN-¹H características de un flavonoide tipo flavona, puesto que se encontró la señal δ_H 6.78 (s) que se atribuye al hidrógeno en la posición 3 del anillo C de este tipo de compuestos. Además, se encontraron señales doblete en δ_H 7.93 ($J=8.7$ Hz, 2H) y 6.93 ($J=8.7$ Hz, 2H), característica de un acoplamiento tipo *orto* del anillo B con que presenta una sola hidroxilación en la posición 4'. Por su parte, las señales en δ_H 6.48 ($J=1.9$ Hz, 1H) y 6.19 ($J=1.9$ Hz, 1H), característica de un acoplamiento tipo *meta*, se asignaron a los hidrógenos en las posiciones 6 y 8 de anillo A. Todos los datos presentados son iguales a los reportados en la literatura para la apigenina, compuesto que corresponde a **26**³¹.

Finalmente, se identificaron 3 compuestos con núcleo **crisina**, dado el fragmento $m/z=253$ característico de este flavonoide en MS con modo de detección negativo. Así, el compuesto **25**, con un tiempo de retención de 27.5 min, con un ion quasi-molecular [M-H]⁻ en $m/z=415.1025$ que indica una fórmula molecular $C_{23}H_{22}O_{10}$ (Δ 1.4 ppm). El λ_{max} presentado en 267 nm es característico de núcleos tipo crisina. El fragmento $m/z=253$ [M-H-162] se atribuye a la pérdida de un azúcar tipo hexosa, el cual está unido mediante un enlace *O*-glicosídico, ya que esta pérdida es característica de este tipo de glicósidos³⁰. Por otra parte, las señales del espectro de RMN-¹H son características de un núcleo tipo crisina, a saber, el doblete a δ_H 8.11 y el multiplete a 7.61 δ_H , que integran para 5 protones sugieren la ausencia de hidroxilación en el anillo B. Además, el singlete a δ_H 7.07 del protón H-3; y los dobletes en δ_H 6.88 y 6.48 con una $J=2.1$ Hz se asignaron a los protones del anillo A en las posiciones H-6 y H-8, que presentan un acoplamiento tipo *meta*, y que permiten confirmar un núcleo de tipo flavona. Finalmente, la señal para protón anomérico en δ_H 5.08 (d, $J=7.5$ Hz) sugiere la presencia de un enlace *O*- β glicosídico. Al realizar la comparación de estas señales con lo reportado en la literatura se estableció que el compuesto **25** corresponde a la flavona glicosilada, crisin-7-*O*-glucósido³⁰.

El compuesto **28**, con un tiempo de retención de 32.0 min, presentó un ion quasi-molecular [M-H]⁻ en $m/z=457.1137$ que indica una fórmula molecular $C_{23}H_{22}O_{10}$ (Δ 0.6 ppm) sugiriendo la presencia de azúcar y un grupo acetato. Posee un λ_{max} en 267 nm que es característico de núcleos tipo crisina. El análisis de los datos de MS/MS indican la presencia de un fragmento $m/z=253$ [M-H-204], el cual se atribuye a la pérdida de una *O*-hexosa acetilada. El espectro de

RMN-¹H es muy similar al de **25**, sugiriendo la presencia de un núcleo de crisina glicosilada, la acetilación se confirma por la señal tipo singlete a δ_H 2.01 atribuible a los hidrógenos del metilo del grupo acetilo³⁰. Se determinó que la acetilación se presentaba sobre la posición 6'' de la glucosa, dado el desplazamiento característico de este metileno cuando hay acetilación en la posición 6''. Así el compuesto **28** corresponde a crisin-7-*O*-(6''-*O*-acetil)-glucósido³⁰, cuyos datos de RMN son iguales a los reportados.

En el caso del flavonoide más abundante **14**, con un tiempo de retención de 37.0 min, presentó un ion quasi-molecular en $m/z=253.0502$ que indica una fórmula molecular C₁₅H₁₀O₄ (Δ 0.7 ppm) sugiriendo la ausencia de residuos de azúcar. Posee un λ_{max} en 267 nm que es característico de un núcleo de crisina. Los datos de MS/MS son iguales a los reportados para la crisina. Del mismo modo el espectro de RMN ¹H MD6 coincide con los reportados en la literatura, puesto que se encuentran los desplazamientos característicos para el anillo A en δ_H 6.27 y 6.51, con valores de $J=2.0$ Hz típico de un acoplamiento *meta*, también se encuentra el singlete para el hidrógeno en la posición 3 del anillo C; y dos señales para hidrógenos del anillo B no hidroxilado en δ_H 7.60, multiplete asignado a los hidrógenos aromáticos en las posiciones 3', 4' y 5'; y un doblete en δ_H 8.0 ($J= 8.0; 1.6$ Hz) de los hidrógenos simétricos de las posiciones 2' y 6' ³². Todos estos datos permiten inferir que el compuesto **14** es la crisina.

De esta manera, los núcleos más abundantes identificados en hojas de granadilla son los núcleos crisina y quercetina, los cuales corresponden a los compuestos quercetin-3-*O*-glucósido(**17**), quercetin-3-(6''-malonil-glucósido) (**18**), crisin-7-*O*-glucósido (**25**), crisin-7-(6''-*O*-acetil)-*O*- β -D-glucósido (**28**), crisina (**14**). Dicho lo anterior y con el fin de establecer si estos compuestos son mayoritarios respecto a otros compuestos polifenólicos presente en el extracto, se realizó la comparación de los cromatogramas UV, ELSD ([figura 2.6a](#)) y el TIC obtenido en modo negativo ([figura 2.6b](#)). Así se encontró que los compuestos polifenólicos más abundante en los extractos son los compuestos **14**, **17** y **28**, ya que son los picos más abundantes en los cromatogramas ELSD y el TIC, los cuales garantizan una señal de detección que se ajusta en mayor proporción a la cantidad de analito, a diferencia de la detección por UV en la que un compuesto minoritario con un coeficiente de absortividad grande puede generar una respuesta intensa³⁵.

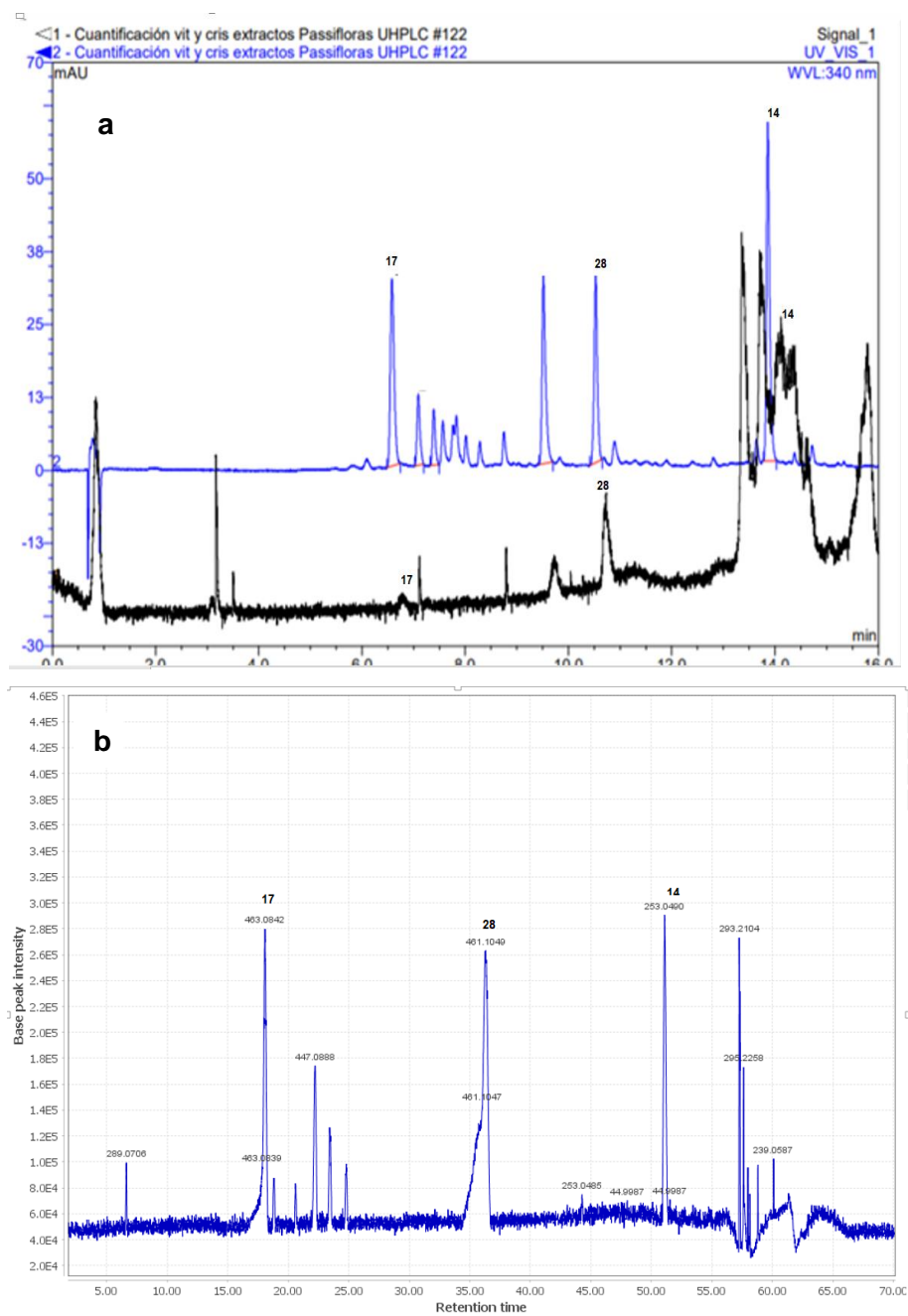


Figura 2.6: Cromatogramas de extractos polares de hojas de *P. ligularis*. **a)** Cromatograma a 340nm (línea azul) y cromatograma ELSD. **b)** TIC obtenido del análisis por HPLC-MS con modo de detección negativo. Se indican los compuestos más abundantes en los cromatogramas.

Estos hallazgos permitieron establecer el perfil de compuestos polifenólicos de *P. ligularis* difiere a otras especies del género, en donde los núcleos más comunes son de tipo apigenina y luteolina, principalmente encontrados como *C*-glicósidos. Esta afirmación se soporta en diferentes estudios publicados que han establecido el perfil de compuestos polifenólicos en hojas de especies del género *Passiflora*, como el realizado por Zucolotto *et al.*, en donde se determinó la presencia de *C*-flavonoides en extractos de hojas de las especies *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. edulis* var. *edulis*, *P. alata*, *P. tripartita* var. *mollissima*, *P. quadrangularis* y *P. manicata*, a excepción del extracto e hojas de *P. ligularis*, también incluida en el estudio³⁶. Por otro lado, Farag *et al.*, identificaron un total de 20 *C*-flavonoides, 8-*O*-flavonoides y 21 *C,O*-flavonoides en extractos provenientes de 17 especies del género mediante un análisis por UHPLC-MS; siendo los núcleos apigenina y luteolina los más comunes y en menor proporción el núcleo crisina, representado por *C*-glicósidos²². Adicionalmente en la tesis de doctorado realizada por Narajo *et al.*, se identificaron flavonoides de tipo *C*-glicósido y *C,O*-glicósidos en hojas de especies del género *Passiflora* subgénero *Tacsonia*, principalmente derivados de luteolina, apigenina y en menor proporción de crisina. Hay que mencionar, además, que solo los compuestos mayoritarios **14** y **17** han sido reportados en especies del género^{16,37}, por lo que los compuestos quercetin-3-(6"-malonil-glucósido) (**18**) y crisin-7-(6"-*O*-acetil)-*O*- β -D-glucósido (**28**) corresponderían a un nuevo reporte para este género.

Respecto a su actividad biológica, es de resaltar el comportamiento polifarmacológico de los flavonoides, es decir estos compuestos tienen la posibilidad de interactuar con diversas dianas farmacológicas confiriéndoles diferentes actividades biológicas³⁸. La quercetin-3-*O*-glucósido (**17**), y compuestos relacionados, ha presentado actividad antiinflamatoria, antidiabética, anticancerígena y antioxidante en diversos modelos *in vitro* e *in vivo* ³⁹. Dentro de este último grupo es de interés aquellos reportes relacionados con los modelos de diabetes, tales como la inhibición de las enzimas α -glucosidasa de intestino de rata, α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*, la α -amilasa humana y del transportador de glucosa GLUT-2, implicado en la secreción de insulina dependiente de glucosa por parte de las células β pancreáticas en estados de hiperglicemia³⁹. También se ha reportado la inhibición de productos de glicación avanzada por parte de este flavonoide y la disminución de la hiperglicemia y peroxidación lipídica en ratas con diabetes inducida por aloxano³⁹.

La crisina (**14**) ha mostrado actividad neuro y cardioprotectora, y actividad citotóxica contra líneas tumorales, entre otras¹⁶. No obstante, es un compuesto que presenta poca absorción por vía oral, por lo que su potencial aplicación en la terapéutica se ve limitada por este aspecto¹⁶. Sin embargo, cabe destacar dos estudios relacionados con el efecto antidiabético de este compuesto, el primero relacionado con la mejoría en la función renal de ratas con diabetes inducida por dieta hipercalórica/streptozotocina; y el aumento del consumo de glucosa del medio extracelular por parte hepatocitos de la línea HepG2 tratados con crisina y derivados de crisina¹⁶.

En el caso de los otros dos compuestos mayoritarios **18** y **28**, no se encuentran publicados estudios relacionados con su actividad en modelos de diabetes, en el caso del compuesto **18** sí se ha reportado su potencial como antioxidante⁴⁰.

- **Aislamiento de Saponinas**

Se identificó la presencia de saponinas en las fracciones de la columna de sephadex F1-F4. Estas se separaron por HPLC, y se identificaron mediante la comparación de las señales de RMN con lo reportado por Meneses *et al.* en su tesis de maestría¹². Solo el ligularósido C se aisló en cantidad suficiente para los ensayos biológicos, el espectro del compuesto reaislado se presentan en el anexo A, [figura S2.7](#).

2.2.2 Evaluación de la inhibición de glucosil-hidrolasas de interés en la búsqueda de compuestos con actividad hipoglicemiante.

La evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos polares de hojas de *P. ligularis* Juss sobre glucosil-hidrolasas intestinales, se realizó empleando modelos ampliamente descritos en estudios de actividad hipoglicemiante de extractos vegetales. Estos modelos fueron descritos en la [sección 1.1.3](#). Las glucosil-hidrolasas intestinales están involucradas en el paso inicial del metabolismo de carbohidratos en humanos, las enzimas empleadas en este trabajo poseen similitud estructural a las humanas lo que permiten obtener resultados extrapolables. En este trabajo se emplearon la α -amilasa purificada de páncreas de cerdo, y un extracto enzimático de intestino de rata en donde se encuentran diferentes glucosil-hidrolasas, incluyendo la α -

glucosidasa. Estas enzimas poseen un alto grado de homología estructural con las enzimas humanas, 87% y 60%, respectivamente⁴¹.

- **Evaluación de la inhibición de la α -glucosidasa por parte de los extractos polares de hojas de grandilla**

Los ensayos de inhibición fueron realizados para cada uno de los extractos de las hojas recolectadas, determinando la absorbancia del medio de reacción producto de la liberación del producto coloreado amarillo *p*-nitrofenol, tras la hidrólisis del enlace α -glicosídico del sustrato dNPG, como se ilustra en la reacción de la [figura 1.2b](#). De este modo la inhibición de la actividad enzimática se observará como una disminución de la coloración amarilla de la solución de ensayo. En la [figura 2.7](#) se ilustra una fotografía del ensayo con diferentes extractos de hojas y un control positivo de acarbosa.

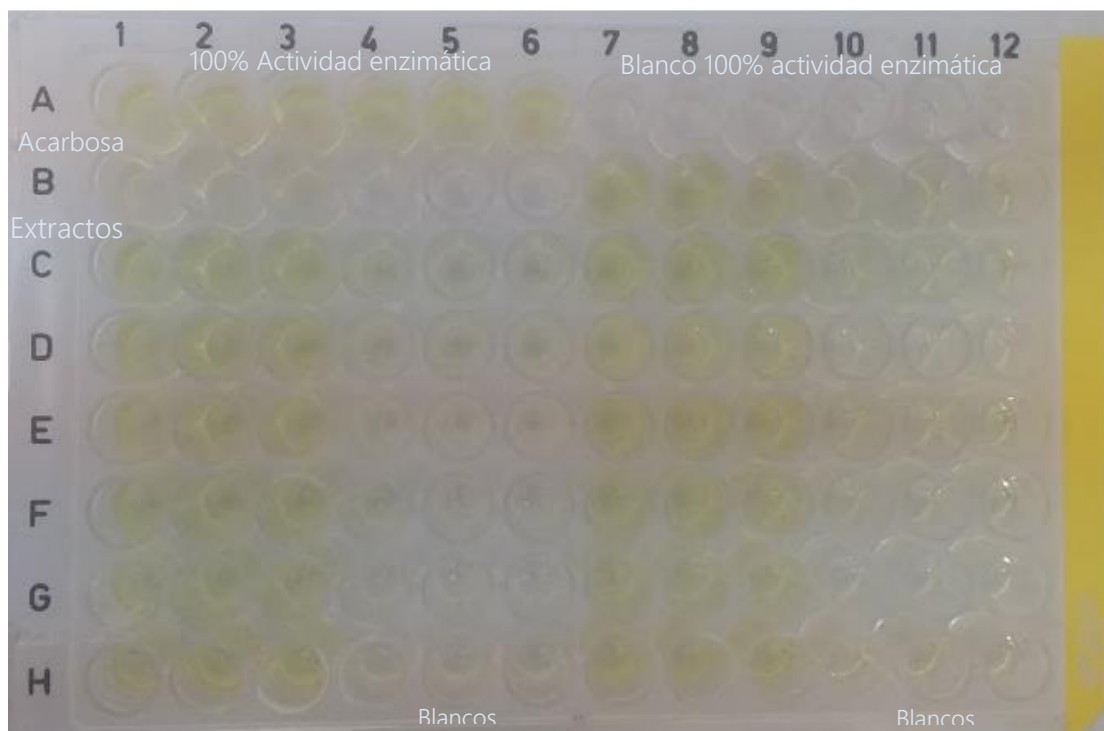


Figura 2.7: Fotografía de la placa de 96 pozos de un bioensayo de inhibición de la α -glucosidasa presente en el extracto enzimático de polvo de intestino de rata. Se presentan las zonas de 100% de actividad enzimática (ausencia de inhibidor), muestras con presencia de inhibidor (acarbosa o extractos) y sus respectivos blancos. El color amarillo indica la hidrólisis del sustrato dNPG por parte de la α -glucosidasa murina, indicando una baja inhibición por parte del extracto de hojas de grandilla

Los porcentajes de inhibición (calculados con base a la ecuación presentada en la [sección 2.4.6](#)) se presentan como gráficos de barras en la [figura 2-8](#) agrupando las muestras por parcela de cultivo y condición de almacenamiento. En algunos grupos no cuentan con la totalidad de las muestras debido a pérdidas durante su procesamiento. La inhibición sobre la actividad catalítica de la enzima α -glucosidasa, fue determinada para la cantidad de extracto generado por 0.5 mg de hojas de *Passiflora ligularis* Juss, encontrándose porcentajes de inhibición desde el 5 hasta el 50%. Estas variaciones en los porcentajes de inhibición podrían estar relacionadas con cambios en la expresión de metabolitos con actividad inhibitoria sobre la enzima, tanto en términos cuantitativos como cualitativos.

No se observó relación entre la ubicación de las parcelas muestreadas, y la actividad inhibitoria sobre la enzima de sus extractos. En todas las parcelas se encontraron muestras con porcentajes de inhibición altos y bajos. De igual forma, no se observó un efecto claro de la condición de almacenamiento de las hojas sobre la inhibición enzimática por parte de sus extractos; dado que solo en algunas parcelas de cultivo, como la C2 y J2, se encontró que la actividad de los extractos obtenidos de hojas almacenadas a temperatura ambiente aumenta respecto a la actividad de los extractos de esas mismas parcelas, pero obtenidos de hojas congeladas. No obstante, esta tendencia no se evidenció en otros grupos, siendo importante notar que los valores de porcentajes de inhibición son más homogéneos en los grupos de extractos de hojas congeladas. Por esto se infiere que la inhibición está mediada por el perfil metabólico propio de cada extracto, y en menor medida por variables relacionadas con el procesamiento de las hojas. Estas observaciones iniciales serán retomadas en los análisis estadísticos presentados en la [sección 2.2.5](#).



Figura 2.8: Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de la enzima α -glucosidasa (extracto enzimático de intestino de rata) por parte de extractos polares de hojas de *P. ligularis*. Se presentan gráficos de barras con sus respectivos errores estándar (S.E.M). Las muestras se agrupan de acuerdo a la parcela de origen: **a)** Parcela C1, **b)** parcela C2, **c)** parcela H1, **d)** parcela H2, **e)** parcela H3, **f)** parcela H4, **g)** parcela J1 y **h)** parcela J2. AC: acarbose. En todos los casos las muestras marcadas con * se refieren a muestras no disponibles.

- **Evaluación de la inhibición de la α -amilasa pancreática porcina empleando como sustrato almidón azul.**

El ensayo enzimático empleando el sustrato “*starch azure*” o almidón azul, permite establecer directamente la actividad enzimática de la α -amilasa pancreática porcina purificada a través de una determinación de la absorbancia del medio de reacción. Durante la reacción enzimática se da la hidrólisis de enlaces alfa-glucosídicos en la estructura del almidón modificado ([figura 1.2a](#)), genera dextrinas solubles unidas covalentemente al colorante remasol azul, lo que da coloración azul al medio de reacción como se observa en la [figura 2.9](#) ⁴². Es decir, cuanto más azul el medio más actividad enzimática hay, y su inhibición se verá como la ausencia de color azul.

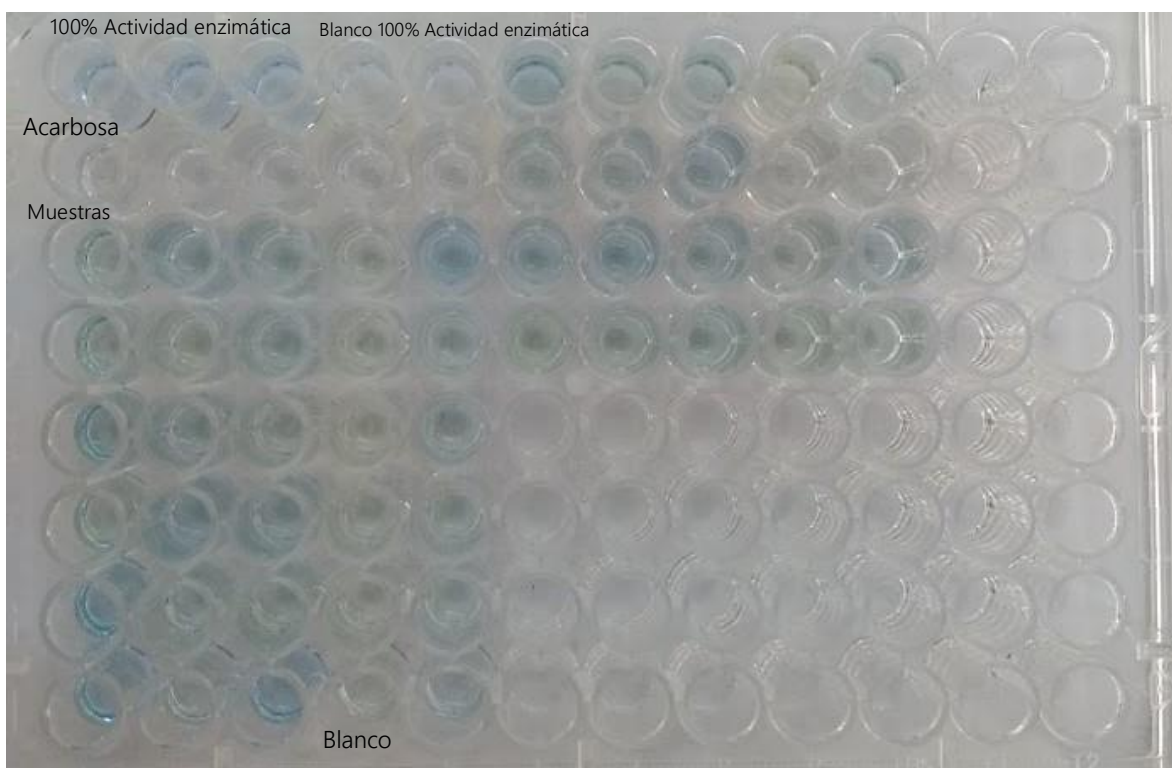


Figura 2.9: Bioensayo de inhibición de la α -amilasa. Se presentan las zonas de 100% de actividad enzimática (ausencia de inhibidor), muestras con presencia de inhibidor (acarbosea o extractos) y sus respectivos blancos. La coloración azul indica actividad enzimática.

La [figura 2.10](#) presenta los porcentajes de inhibición de la α -amilasa por parte de los extractos de hojas de *P. ligularis* obtenidos a partir de 5 mg de hojas. Se encontraron porcentajes de inhibición en un rango del 5 al 95%, rango de mayor amplitud que el obtenido para la inhibición de la α -glucosidasa. Se observó que en general las muestras activas frente a α -amilasa también son activas frente a la α -glucosidasa, este resultado era esperado dado que estas enzimas poseen sitios catalíticos altamente similares, se espera este tipo de tendencias para posibles inhibidores⁴³. Se observaron grupos parcelas con inhibiciones muy heterogéneas, como la C1, y otras más homogéneas J1. En términos generales las parcelas H3R y H4R presentaron los menores y mayores porcentajes de inhibición en promedio respecto a los demás grupos experimentales, respectivamente. Finalmente, no se identificó una correspondencia entre la actividad biológica, la condición de almacenamiento y el sitio de cultivo.

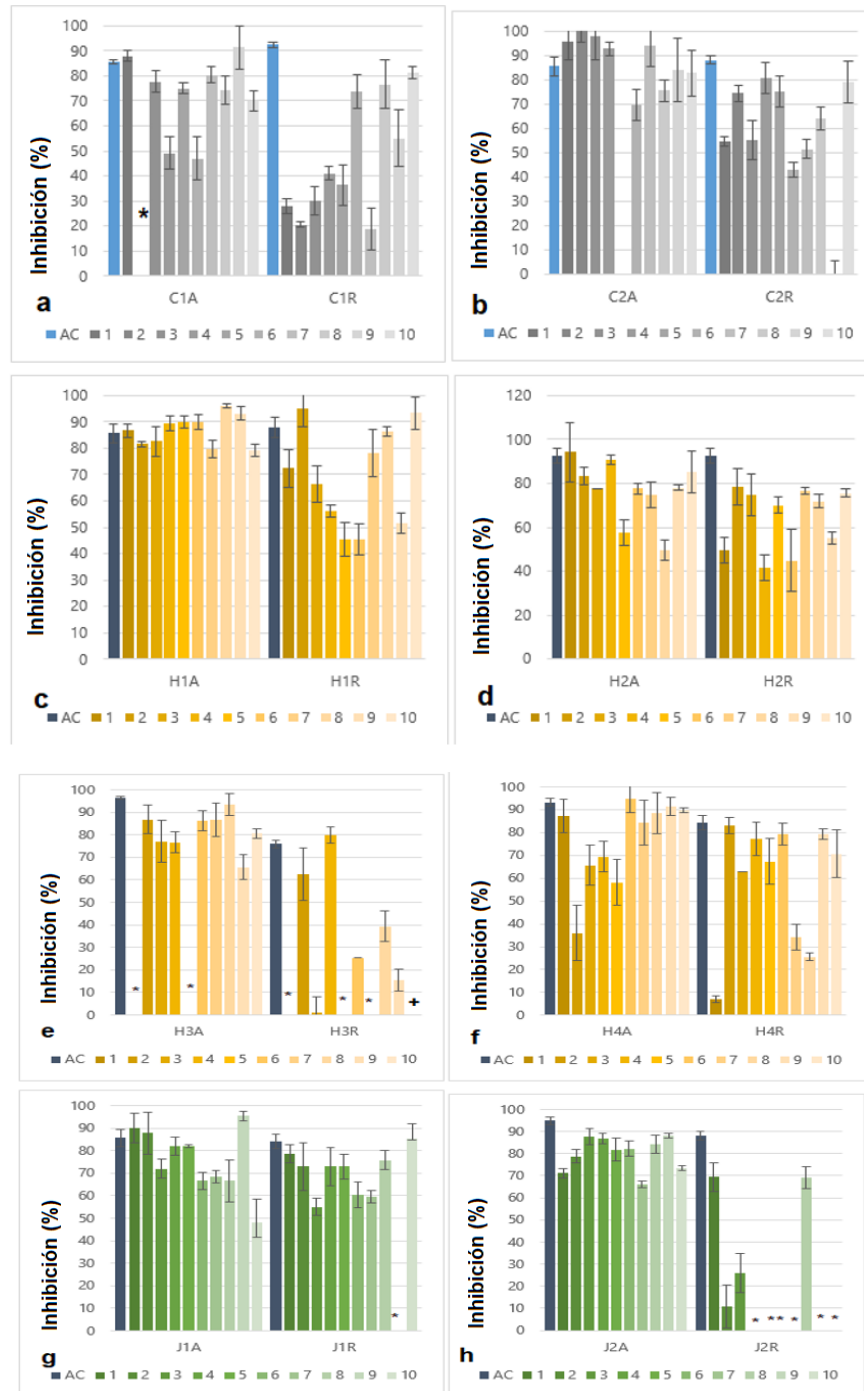


Figura 2.10: Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de la enzima α -amilasa. **a)** parcela C1, **b)** parcela C2, **c)** parcela H1, **d)** parcela H2, **e)** parcela H3, **f)** parcela H4, **g)** parcela J1 y **h)** parcela J2. AC: acarbosa, * muestra no disponible.

2.2.3 Relación entre el “*fingerprint*” metabólico de hojas de *P. ligularis* con el sitio de recolección y condición de almacenamiento.

El objetivo final que se persigue en el proyecto de investigación del que hace parte esta tesis, es el desarrollo de un producto fitoterapéutico a base de hojas de granadilla. La expresión metabólica de las plantas tiene una alta relación con la exposición a factores bióticos y abióticos propios de las condiciones en las que ellas se desarrollan⁷. Por lo anterior se vio la necesidad de establecer las posibles variaciones en el perfil metabólico de hojas de *P. ligularis* recolectadas en tres los municipios productores donde se recolectó. Estos municipios representan las zonas de mayor producción en Cundinamarca y Huila, que junto con Antioquia son las zonas de mayor producción nacional. Los lugares de colecta pertenecen a zonas geográficas bien diferenciadas, como se observa en la [tabla 2.1](#). Adicionalmente, se buscó establecer si la metodología de almacenamiento y secado tenían algún impacto en la composición química del extracto. Los compuestos que se trabajaron son de alta a mediana polaridad, pues parecen ser los responsables de la actividad observada en el extracto crudo, de acuerdo a las referencias de la literatura en cuanto a la inhibición de glucosil-hidrolasas intestinales por extractos de hojas de otras especies del género *Passiflora*^{36,44}.

Las hojas fueron extraídas con MD6, se registraron los espectros de RMN eliminando la señal residual del solvente, con el fin de suprimir el impacto de esta sobre la normalización de las señales en los espectros. Adicionalmente los espectros obtenidos fueron procesados mediante un “*binning*” de 0.04 ppm dentro del rango de desplazamientos con señales apreciables (0-9 ppm) y escalados mediante el método de Pareto. El número total de muestras fue de 167, incluidas las réplicas de la muestra J2R2, usadas como control de calidad ([figura 2.11a](#)). Lo primero fue hacer un análisis por PCA de todas las muestras, buscando ver agrupaciones en ellas. En la [figura 2.11](#) presenta el *score plot* que explica el 62.4% de la varianza, con un PC1 (53.1%) y un PC2 (9.2%). Usando códigos de colores se representan dos observaciones, siendo la primera el impacto de la condición de almacenamiento ([figura 2.11a](#)), y el impacto del lugar de colecta, representado por municipios ([figura 2.11b](#)). En relación a las réplicas de la muestra J2R2 empleadas como control de calidad, se encontró el agrupamiento de las 9 réplicas en un mismo cuadrante ([figura 2.11a](#)), esto permite inferir que el proceso de obtención de espectros es preciso y que el impacto de variables no controladas es bajo.

Respecto al efecto de la condición de almacenamiento ([figura 2.11a](#)) se evidencian dos agrupaciones características, una para las muestras preservadas en congelación (parte positiva del PC1) y otra para las muestras almacenadas a temperatura ambiente (parte negativa del PC1). Lo que indica que hay un impacto fuerte de las condiciones de almacenamiento sobre la composición química del extracto obtenido. Se puede observar la presencia de algunas muestras almacenadas a temperatura ambiente (en verde) muy cerca de las muestras tratadas con frío (azul), correspondiente a los cuadrantes positivo de PC1 y negativo de PC2. Estas muestras almacenadas a temperatura ambiente corresponden a las que fueron procesadas para su análisis por RMN con menor tiempo de colecta (4 semanas antes), colectadas en el municipio de Junín-Cundinamarca. Al haber sido expuesta al ambiente por menor tiempo, las transformaciones químicas sufridas fueron menores y por lo tanto se parecen más a las almacenadas bajo refrigeración. Todo este análisis permite comprobar que las condiciones de almacenamiento impactan la composición metabólica del extracto obtenido. Este aspecto se debe tener en cuenta al momento de establecer las condiciones adecuadas para la obtención de material vegetal de partida para la elaboración de un producto fitoterapéutico.

El siguiente punto fue establecer si el lugar de colecta se correlaciona con la composición del extracto. En la [figura 2.11b](#) se presenta el *score-plot* poniendo las muestras en colores diferentes según su lugar de recolecta. No se encontraron agrupaciones claramente identificadas al usar todas las muestras ([figura 2.11b](#)), se observa una agrupación para las muestras provenientes del municipio de Junín (en azul celeste), en el sector positivo de PC1, a pesar de ello la separación de las muestras en función del sitio de colecta no es claro. El impacto que tiene la condición de almacenamiento sobre la composición, nos llevó a proponer el análisis teniendo en cuenta sólo las muestras preservadas en frío, que reflejan mejor el estado de las hojas en el momento de ser colectas, pues los procesos enzimáticos se detienen al congelar la muestra a con nitrógeno líquido y luego liofilizarla³.

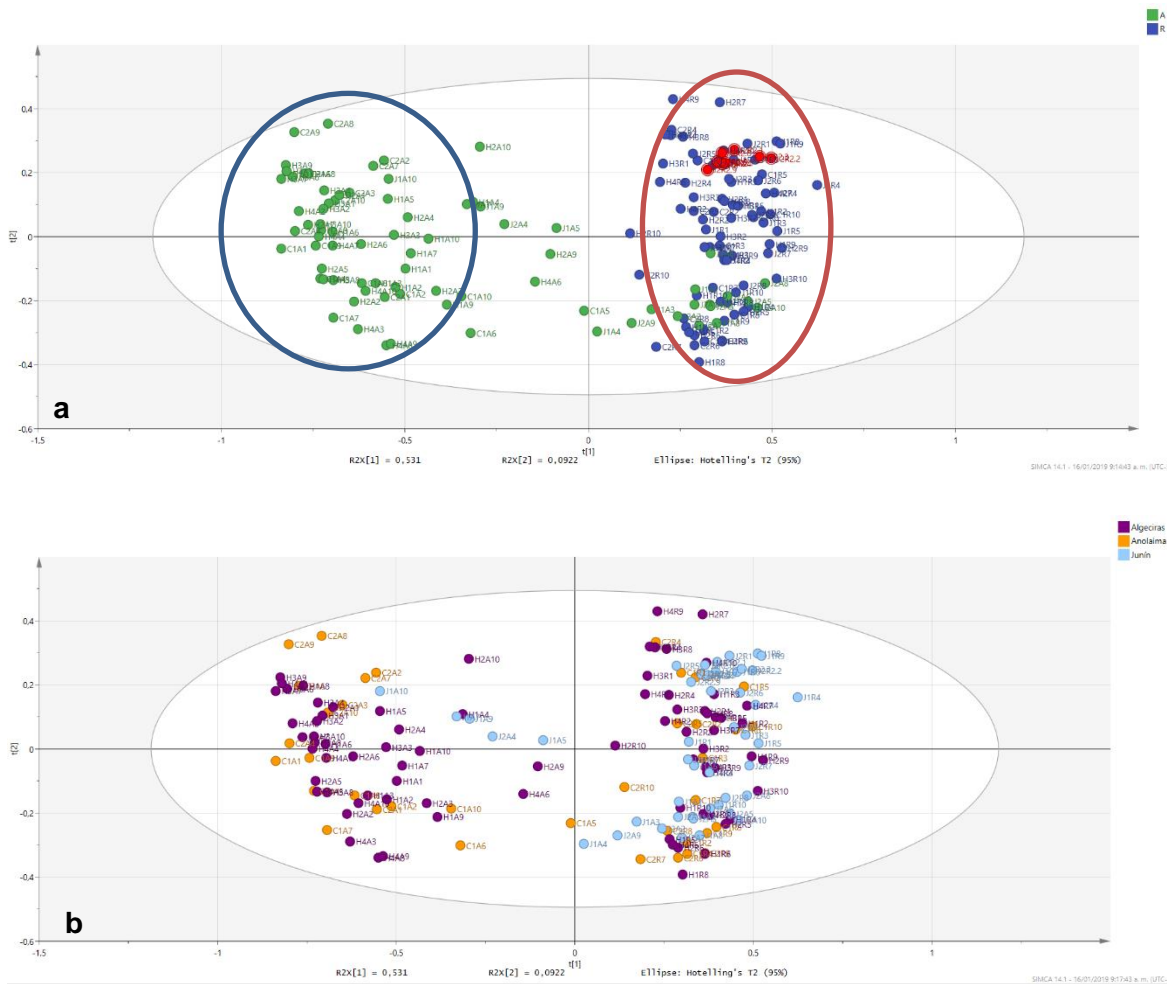


Figura 2.11: Análisis de componentes principales (PCA) de los datos de RMN de los extractos de hojas de *P. ligularis*. **a)** *score plot* clasificando las muestras de acuerdo a la condición de almacenamiento (puntos verdes: muestras almacenadas a temperatura ambiente; puntos azules: muestras almacenadas bajo refrigeración; puntos rojos: réplicas de control de calidad), **b)** *score plot* clasificando de acuerdo al municipio de recolección incluyendo todas las muestras (puntos violetas: muestras recolectadas en el municipio de Algeciras; puntos naranjas: muestras recolectadas en el municipio de Anolaima; puntos azul celeste: muestras recolectadas en el municipio de Junín).

Así, el análisis de componentes principales (PCA) con sólo las muestras preservadas en frío, no mostró agrupaciones claras de acuerdo al sitio de colecta ([figura 2.12a](#)). Lo anterior puesto que las muestras provenientes de municipios separados espacialmente como Anolaima (Cundinamarca), Junin (Cundinamarca) y Algeciras (Huila) se ubican en las mismas regiones del gráfico; aunque las provenientes de Junín (clúster azul celeste) parecen estar menos

relacionados con las provenientes de Algeciras y Anolaima. Respecto al efecto de la edad del cultivo sobre la expresión metabólica tampoco se presentaron agrupaciones definidas, ya que muestras provenientes de cultivos jóvenes (1 año) y de cultivos maduros (4 o 7 años) se distribuyeron de forma no homogénea en el gráfico ([figura 2.12b](#)).

De todo lo anterior se pudo inferir que el impacto del sitio de cultivo o la edad del cultivo sobre la composición del extracto es menor que el de la condición de almacenamiento. Sin embargo, y a pesar de que el efecto de estas variables sobre el perfil metabólico no es claramente evidenciable en el análisis por componentes principales, existen otros métodos de análisis multivariado que permiten esclarecer correlaciones menos claras como la matriz de correlaciones de Pearson, en el que se establece el nivel de correlación de cada variable con una variable respuesta⁴⁵, por lo que recomendamos el uso de este tipo de análisis para buscar las separaciones en función del lugar de cultivo y/o edad del mismo y así identificar de manera más precisa aquellos metabolitos que están variando de acuerdo a dichos cambios en las características del cultivo.



Figura 2.12: Análisis de componentes principales (PCA) de los datos de RMN de los extractos de hojas de *P. ligularis* almacenadas bajo refrigeración. **a)** *score plot* clasificando de acuerdo al municipio de recolección muestras almacenadas en refrigeración (puntos violetas: muestras recolectadas en el municipio de Algeciras; puntos naranjas: muestras recolectadas en el municipio de Anolaima; puntos turquesa: muestras recolectadas en el municipio de Junín), **b)** *score plot* de las muestras clasificando de acuerdo a la edad del cultivo (puntos amarillos: 1 año; puntos turquesa: 2 años; puntos verdes: 4 años; puntos rojos: 7 años).

La principal variación entre muestras refrigeradas y no refrigeradas está dada por la presencia de los carbohidratos, puesto que según el “*score plot*”, producto del análisis multivariado supervisado tipo OPLS-DA ($R^2X=0.609$ y $Q^2=0.846$), son las variables asociadas a desplazamientos químicos de hidrógenos de azúcares las que más diferencian a dichos grupos. Las variables de desplazamiento químico δ_H 3.8, 3.68, 3.72, 3.84, 3.76, 3.64, 3.44, 4.0 se ubicaron en el cuadrante del gráfico *S-plot* que representa a las muestras almacenadas a temperatura

ambiente ([figura 2.13a](#) y [figura 2.13b](#)). La validez del modelo se determinó aplicando un test de permutaciones ($n=100$), el cual permite obtener valores de R^2 y Q^2 para diferentes modelos generados al permutar aleatoriamente valores de variable discriminante (Y) y de las variables de las observaciones (X); de esta forma si una permutación con un coeficiente de correlación de 0 respecto al conjunto de datos originales genera valores de R^2 mayor a 0.3 y de Q^2 mayor a 0.05 se considera que el modelo no es válido⁴⁶, en el presente caso se obtuvieron valores de $R^2=0.0268$ y $Q^2=-0.132$ por lo que el modelo cumple con los requerimientos.

Como soporte de lo anteriormente planteado, en la [figura 2.14](#) se presenta el espectro de RMN del extracto de una hoja preservada en frío y del extracto de otra hoja, colectada en el mismo sitio, secada a temperatura ambiente. Lo anterior cobra importancia al momento de establecer variables ideales para la obtención de materia prima vegetal de calidad homogénea para la elaboración de un posible producto fitoterapéutico; no obstante, para establecer la correlación entre dichas variables (desplazamientos químicos) y la actividad biológica se presentará posteriormente los resultados de un análisis multivariado tipo OPLS-DA para las enzimas objeto de estudio.

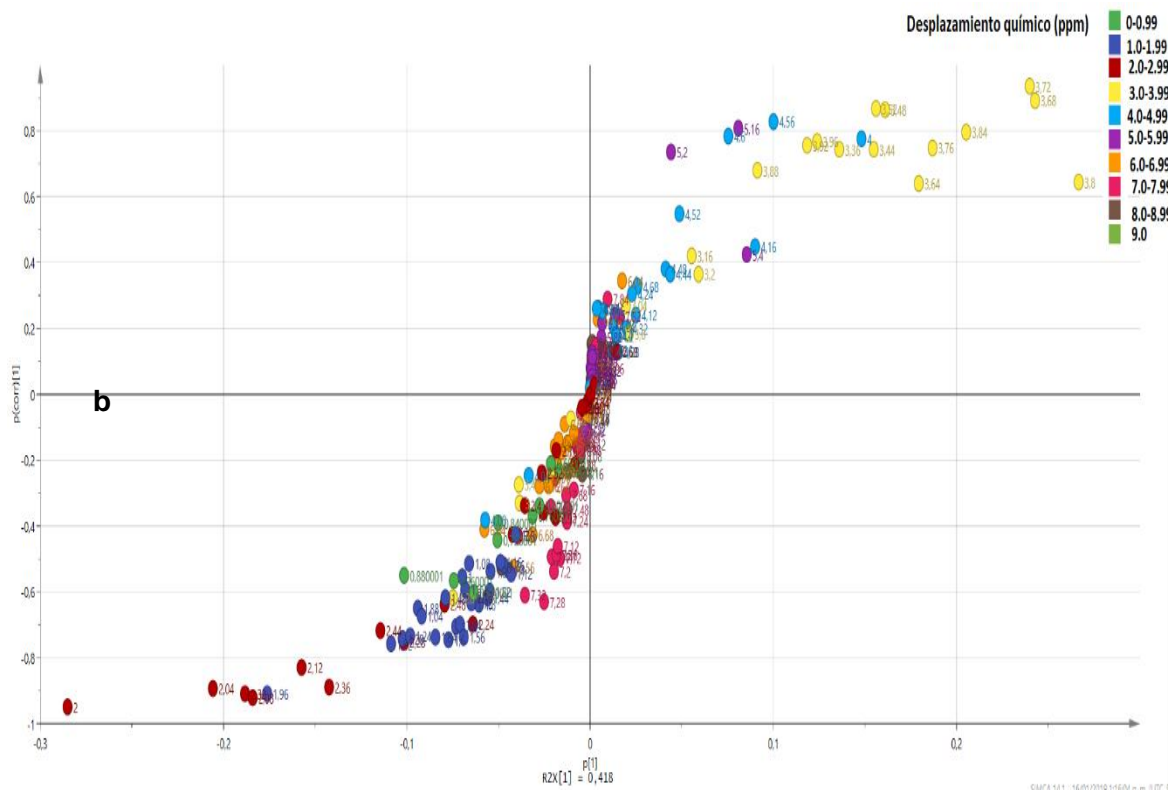
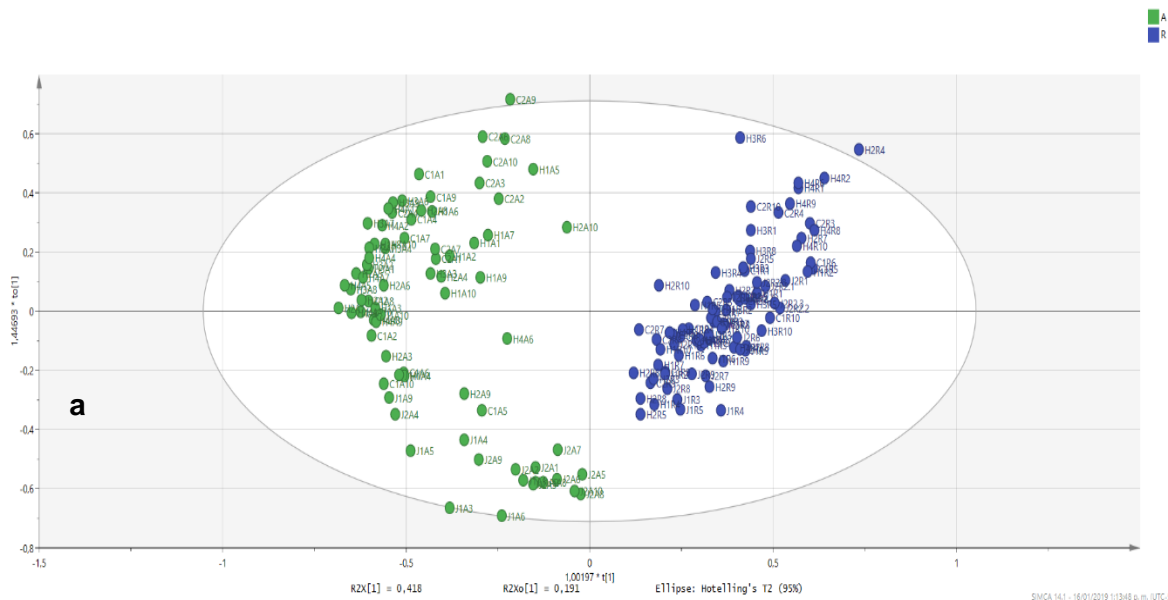


Figura 2.13: Análisis de proyecciones ortogonales de estructuras latentes discriminante (OPLS-DA) usando como variable discriminante la condición de almacenamiento. **a)** *score plot* mostrando la separación entre muestras refrigeradas (R) y almacenadas a temperatura ambiente (A) **b)** *S-plot* presentando los valores de desplazamiento químico que caracterizan cada agrupación.

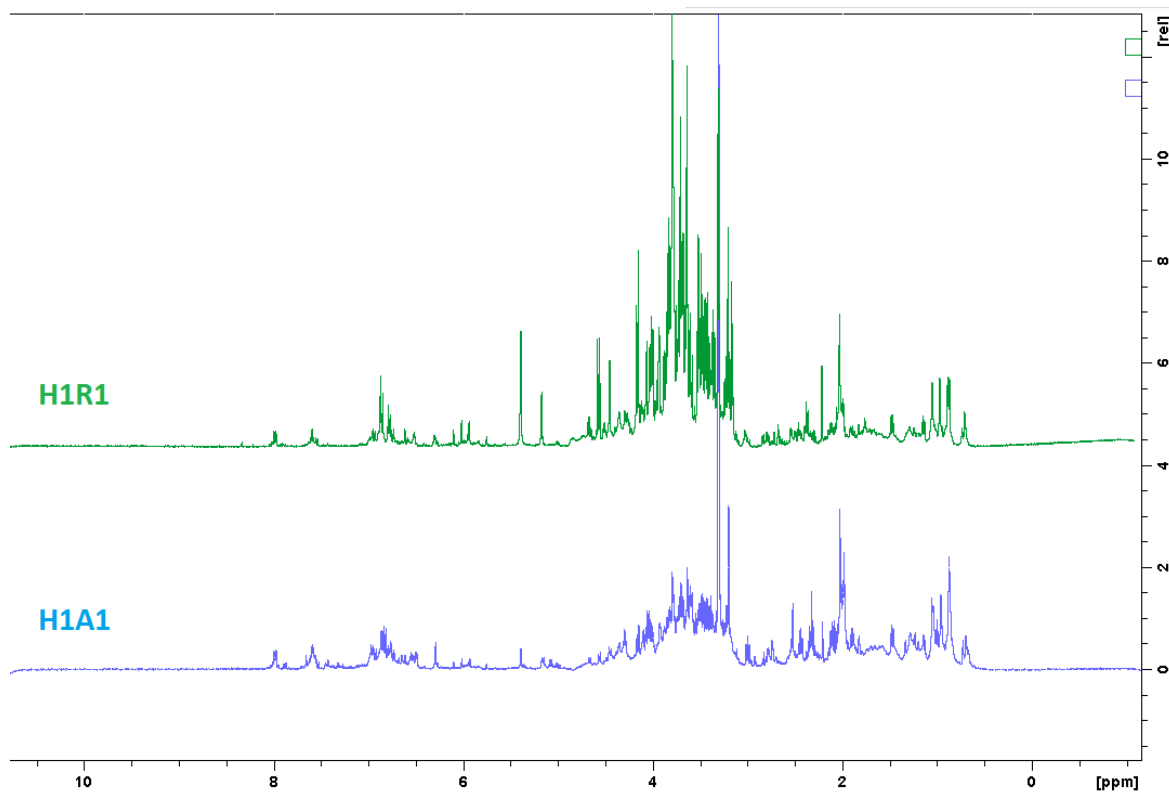


Figura 2.14: Espectros de RMN ^1H (MD6, 400 MHz) de extractos de hojas *Passiflora ligularis* Juss, provenientes de la misma parcela de cultivo pero sometidos a diferente condición de almacenamiento. El espectro en verde a una muestra refrigerada y en azul a una muestra almacenada a temperatura ambiente. Se observa una clara disminución en la intensidad de señales en la zona de hidrógenos de carbohidratos.

2.2.4 Relación entre el “*fingerprint*” metabólico de hojas de *P. ligularis* y la actividad inhibitoria sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa.

El siguiente aspecto por tratar, fue establecer la relación entre el perfil metabólico de las muestras y los porcentajes de inhibición enzimática de estos extractos (resultados mostrados en las [figuras 2.7](#) y [figura 2.9](#)). Para esto se empleó un análisis de proyecciones ortogonales de estructuras latentes discriminante (OPLS-DA), en el que la variable respuesta (% de inhibición) se trata de forma binaria, de forma que las muestras se clasificaron como activas (A) o no activas

(N) con base en el porcentaje de inhibición para cada una de las enzimas. En el caso del ensayo de inhibición de la α -glucosidasa se encontró que muchas de los extractos presentaron porcentajes de inhibición entre el 10% y el 30% (118 de 156), no obstante, algunas de ellas tienen % inhibición con valores fuera de este rango (38 de 156). Entonces las muestras de inhibición entre el 10-30% no se incluyeron, y sí las extremas, puesto que se espera que en estos casos el perfil metabólico presente cambios más abruptos. Lo anterior es plausible dado que a través de la separación de las muestras en dos clases, los análisis multivariados pueden exponer de mejor forma su diferenciación⁶; por lo que se requiere que dicha clasificación se realice con base a criterios que separen claramente las muestras⁴⁷. De igual manera, para el análisis multivariado tipo OPLS-DA entre el perfil metabólico y la inhibición de la α -amilasa se incluyeron muestras con porcentajes de inhibición mayores al 80% y menores al 40%. Las que presentaban valores intermedios no se incluyeron.

En la ensayo de inhibición de la α -glucosidasa de origen murino, se realizó un análisis OPLS-DA, cuyo *score-plot* se presenta en la [figura 2.15a](#). En él se evidencia la separación en los cuadrantes positivo y negativo del PC1 de las muestras (n=38) clasificadas como activas (A, valores positivos) y no activas (N, valores negativos) en la ensayo de inhibición de la α -glucosidasa de origen murino. Los valores $R^2_{cum}=0.669$ y $Q^2_{cum}=0.488$ indican un buen ajuste y predicción del modelo, puesto que valores de $R^2 \geq 0.5$ y $Q^2 \geq 0.4$ se consideran aceptables para modelos construidos con datos provenientes de ensayos biológicos²².

En relación a la confirmación de los resultados se realizaron dos *test* de validación, por una parte el test de permutaciones, que mediante la obtención de combinaciones aleatorias entre las variables observadas (intensidad normalizada en los intervalos de desplazamiento químico) y las variables respuesta (actividad biológica) de todo el conjunto de muestras, calcula los estadísticos de ajuste (R^2) y predicción (Q^2) que tendrían estos nuevos modelos OPLS-DA; así para un total de 100 permutaciones se obtuvo que ningún modelo construido con las nuevas permutaciones presentaría mejores valores de R^2 y Q^2 que el modelo construido con el conjunto de datos originales. Lo anterior se establece con base a los valores de R^2 y Q^2 (0.239 y -0.354) que tiene una permutación con una correlación de 0 respecto al conjunto de datos originales, es decir no se ajusta en ninguna combinación de variables⁶. Todo lo anterior significa que el modelo es adecuado para describir la variabilidad de los datos y su correlación con la actividad

biológica. Por otra parte, en el caso de la curva ROC se obtuvo un AUC de 0.976 lo que permite inferir que la clasificación de las muestras como activas y no activas se ajusta a lo planteado⁶.

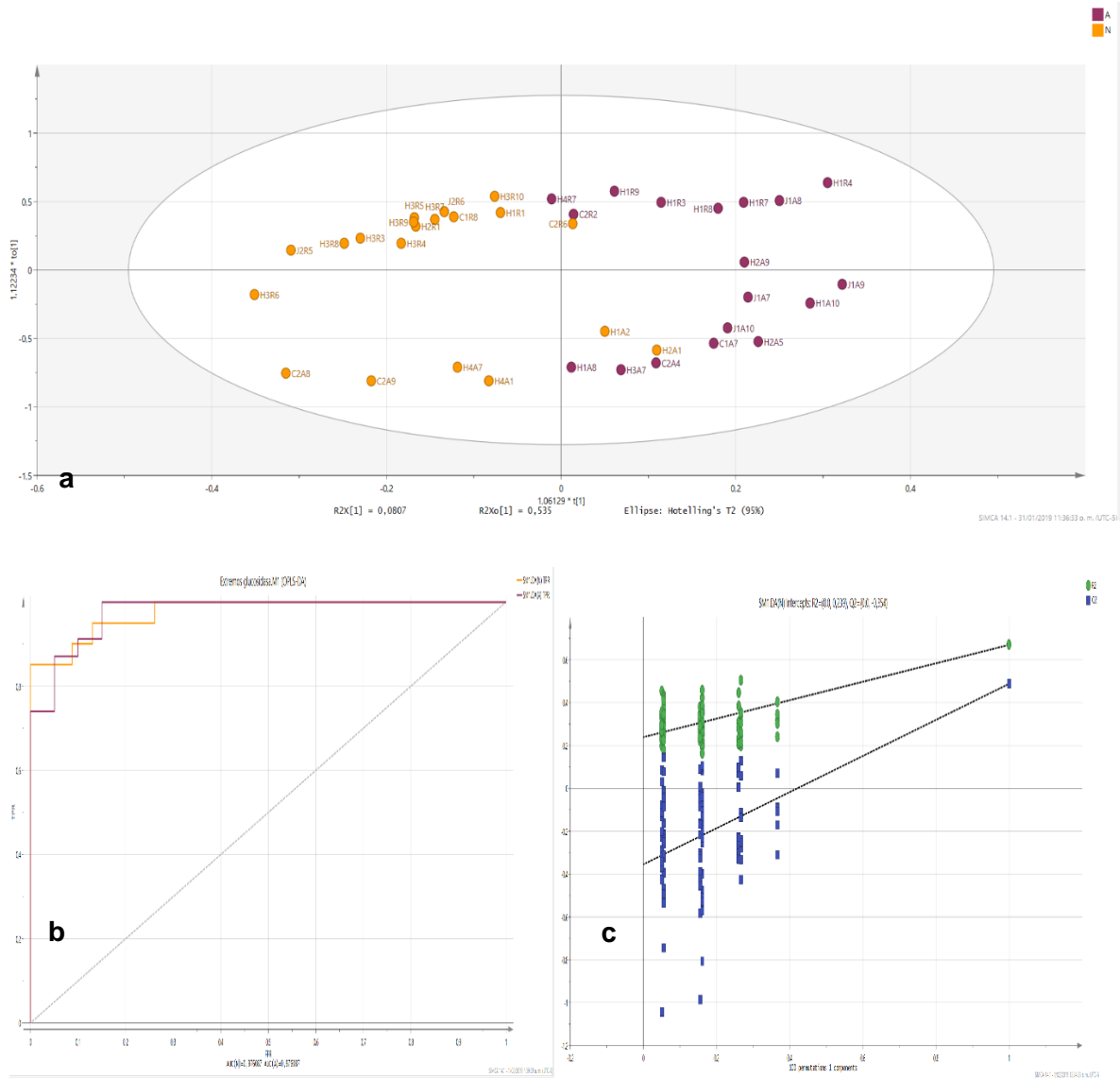


Figura 2.15: Análisis de proyecciones ortogonales de estructuras latentes discriminante (OPLS-DA) usando como variable discriminante la inhibición de la actividad enzimática de la α -glucosidasa presente en el extracto de intestino de rata: **a)** "score plot" mostrando la separación entre muestras activas (A) y no activas (A), **b)** Curva ROC con un AUC de 0.976 que indica la correcta clasificación de las muestras y **c)** Resultado del test de permutación para el modelo OPLS-DA.

En cuanto a la determinación de las variables cuyos cambios impactan en la diferenciación de cada uno de los grupos, el análisis del gráfico *S*-plot de la [figura 2.16](#), permitió la identificación de las variables δ_H 2.0, 2.04, 2.08, 2.12, y 2.32, como aquellos valores de desplazamiento químico que caracterizan a las muestras clasificadas como activas (A). Estas señales son atribuibles a protones de las cadenas laterales, del núcleo, o a metilos de grupos acetato del residuo de *N*-acetil glucosamina presentes en las saponinas lanostado identificadas en *P. ligularis*¹². Estos valores también podrían ser atribuidos a aminoácidos como el ácido glutámico (2) y glutamina (3) identificados en el extracto, no obstante, no se encuentran reportes de que dichos compuestos inhiban este tipo de enzimas; sin embargo, en el siguiente capítulo se evaluará la actividad biológica de los compuestos con estas características estructurales con el objetivo de validar los resultados aquí presentados. Otras variables identificadas fueron δ_H 3.4 y 4.04, característicos de hidrógenos carbinólicos de carbohidratos y δ_H 6.84 correspondientes a hidrógenos aromáticos del anillo B de flavonoides con núcleo tipo quercetina y luteolina presente en los compuestos **17**, **17a** y **18**.

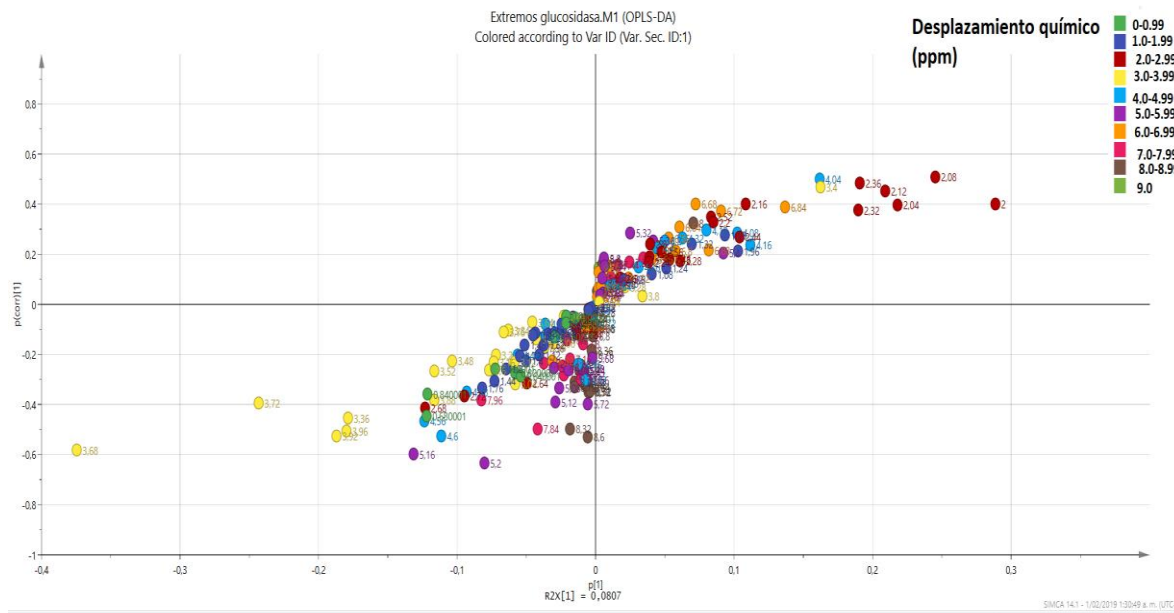


Figura 2.16: *S*-plot del análisis multivariado OPLS-DA entre el perfil metabólico de hojas de *P. ligularis* y la inhibición de la α -glucosidasa. Se presentan los valores de desplazamiento químico significativos para las muestras clasificadas como activas en la parte positiva del gráfico. Los rangos de desplazamiento de RMN se representan en colores diferentes.

Con respecto a la relación entre el perfil metabólico y la inhibición de la α -amilasa porcina, se encontró que las agrupaciones de las muestras entre activas y no activas (n=73), se relaciona con la condición de almacenamiento de estas; de forma que la mayoría de las muestras clasificadas como activas (A) en la [figura 2.17](#) son muestras almacenadas a temperatura ambiente, mientras que en el caso de las no activas (N) se encontró que la mayoría corresponde a las muestras almacenadas bajo refrigeración. Al igual que en el caso de la correlación con la actividad en α -glucosidasa, los test de validación permitieron inferir que el modelo planteado cumple por una parte con la clasificación de las muestras (curva ROC AUC 0.95 [figura 2.17c](#)) y con la veracidad de los valores $R^2=0.635$ y $Q^2 =0.538$, como los posibles mejores valores de ajuste y predicción para la combinación de variables introducida en el modelo ([figura 2.17b](#)).

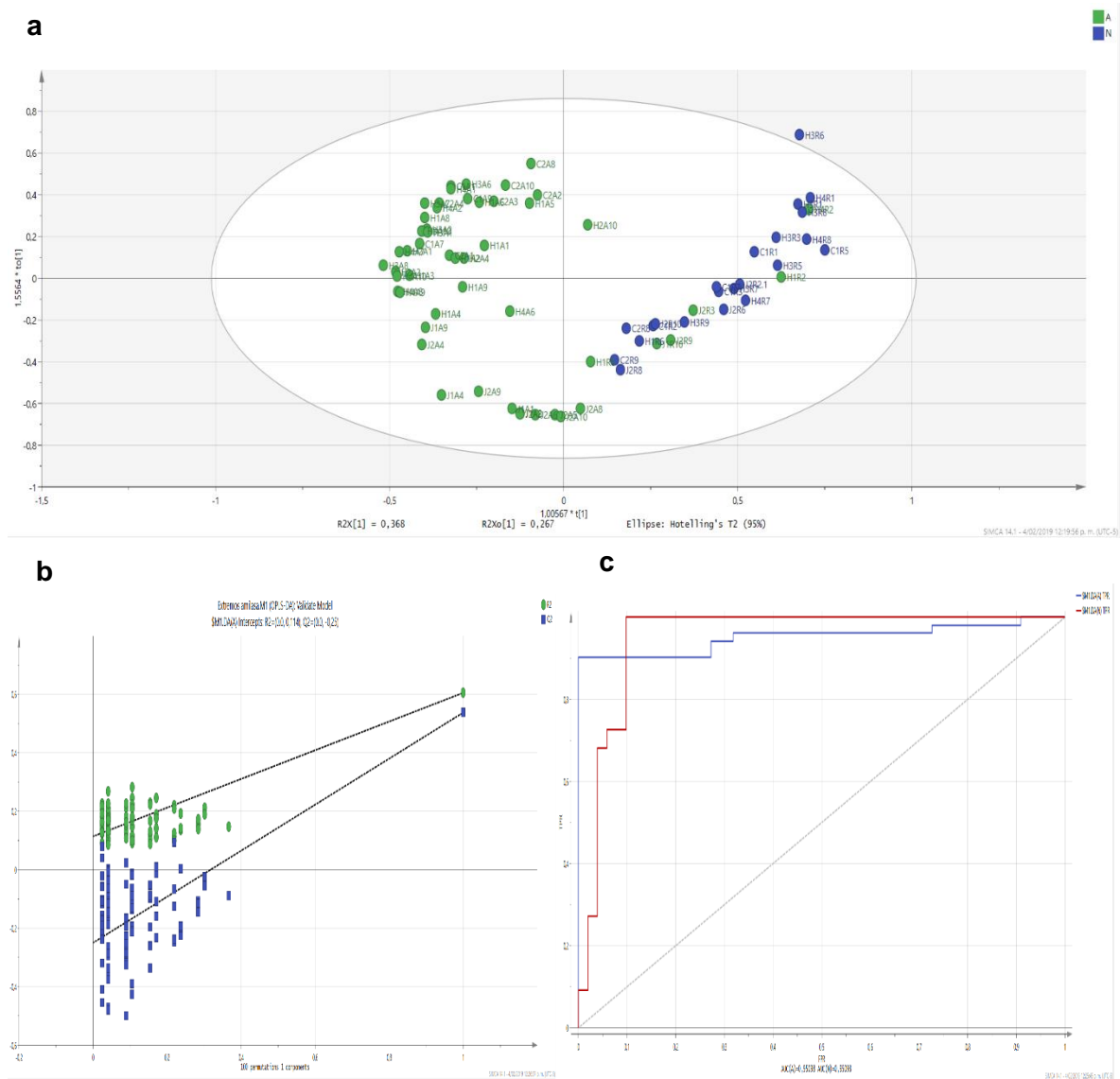


Figura 2.17: Análisis de proyecciones ortogonales de estructuras latentes discriminante (OPLS-DA) usando como variable discriminante la inhibición de la actividad enzimática de la α -amilasa pancreática porcina: **a)** “score plot” mostrando la separación entre muestras activas (A) y no activas (A), **b)** Resultado del test de permutación para el modelo OPLS-DA y **c)** Curva ROC con un AUC de 0.950 que indica la correcta clasificación de las muestras.

De igual forma el análisis del gráfico “S-plot” presentado en la [figura 2.18](#), de la actividad inhibitoria de la α -amilasa porcina, arrojó que las señales que mejor representan a las muestras activas son principalmente δ_H 1.96, 2.0, 2.04, 2.08, 2.12, 2.32 y con menor impacto variables entre rangos de δ_H 0.6 a 1.99 y δ_H 6.0-7.62. Así, los grupos de metabolitos que presentan dichos desplazamientos químicos son las saponinas, aminoácidos y compuestos polifenólicos como

flavonoides. Es decir, los mismos identificados en el modelo anterior. Por otro lado, en el caso de las muestras no activas (N), las variables asociadas a desplazamientos de carbohidratos son las que las diferencian del otro grupo. Lo anterior tiene coherencia con los hallazgos presentados en la sección 2.2.3, en el que las señales de carbohidratos representan a las muestras sometidas a esta condición de almacenamiento, esto podría indicar que los procesos de degradación de carbohidratos podrían concentrar a las muestras almacenadas a temperatura ambiente en los compuestos bioactivos y que estos compuestos bioactivos no se son alterados drásticamente con el almacenamiento, ya que a pesar de que las muestras refrigeradas incluidas en el análisis OPLS-DA fueron clasificadas como no activas, esta clasificación se realizó con base a un límite de actividad, más no a la ausencia de la misma.

En resumen, mediante estos métodos de análisis multivariado se identificaron saponinas, aminoácidos y polifenoles como compuestos con posible actividad inhibitoria de las enzimas. La actividad de estos compuestos se valorará tanto *in vitro* como *in silico* en el siguiente capítulo. Es importante resaltar que los flavonoides tienen un gran número de reportes de inhibición de glucosil-hidrolasas⁴⁸, en el caso de las saponinas también hay reportes pero la cantidad es menor⁴⁹, mientras para los aminoácidos no hay información sobre su capacidad de inhibir estas enzimas.

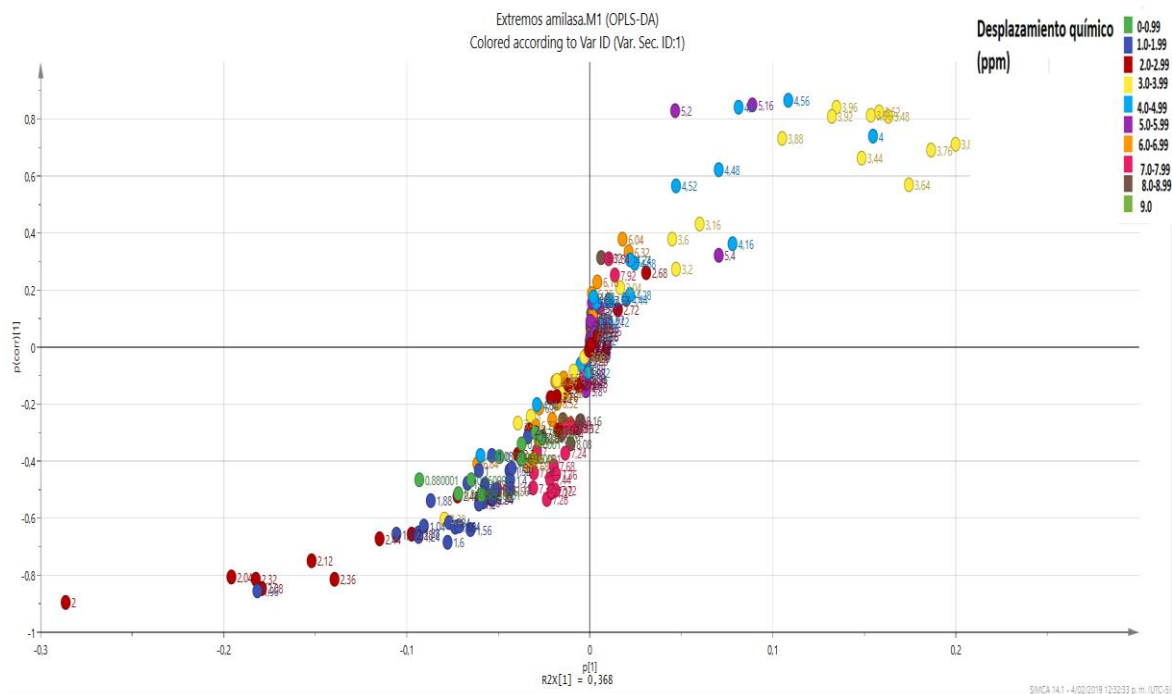


Figura 2.18: *S-plot* del análisis multivariado OPLS-DA entre el perfil metabólico de hojas de *P. ligularis* y la inhibición de la α -amilasa. Se presentan los valores de desplazamiento químico significativos para las muestras clasificadas como activas en la parte positiva del gráfico.

2.3 Conclusiones

El estudio químico de los extractos polares de hojas de *Passiflora ligularis* Juss permitió la identificación de 29 compuestos, dentro de los cuales se encontraron diferentes aminoácidos, carbohidratos, ácidos orgánicos, compuestos polifenólicos, saponinas y otros tipos de compuestos clasificados como misceláneos. En el caso de compuestos polifenólicos, el análisis de los extractos crudos mediante HPLC-DAD y HPLC-MS proporcionó la información necesaria para la identificación de al menos 14 compuestos de tipo flavan-3-ol, flavonol y flavonas, siendo los núcleos más comunes la crisina y quercetina en forma de *O*-glucósidos. Los compuestos mayoritarios corresponden a quercetin-3-*O*-glucósido (**17**), crisin-7-*O*-(6''-*O*-acetil)-glucósido (**28**) y crisina (**14**), que fueron purificados y su estructura fue confirmada mediante análisis por RMN.

Se valoró el impacto de variables como la ubicación del cultivo y las condiciones de almacenamiento del material vegetal sobre el perfil metabólico de hojas de *P. ligularis*. Para esto las 167 muestras provenientes de los municipios de Algeciras, Anolaima y Junín se analizaron RMN ^1H (MD6, 400 MHz) y los MVDA permitieron establecer que la variable que tiene mayor impacto sobre la composición química del extracto es la condición de almacenamiento. De forma puntual, estos cambios se atribuyeron principalmente a cambios en el perfil de carbohidratos empleando un análisis multivariado supervisado tipo OPLS-DA. Respecto a las otras variables estudiadas, como la ubicación del cultivo y la edad de este, el análisis multivariado tipo PCA no mostró agrupaciones claras, por lo que no parecen ser tan impactantes en la composición del extracto.

Por otro lado, 156 de los 167 extractos obtenidos mostraron actividad inhibitoria sobre las enzimas α -amilasa pancreática porcina y α -glucosidasa murina; no obstante, los porcentajes de inhibición obtenidos variaron de forma considerable entre las diferentes muestras. Estas variaciones no presentaron una tendencia clara respecto a la procedencia de las muestras o a la condición de almacenamiento, hecho que indica que las variaciones en la actividad biológica están relacionadas con cambios en el perfil metabólico propio de cada muestra. Los análisis supervisados (OPLS-DA y *S-plot*) sugieren que los compuestos responsables de la actividad

inhibitoria de las enzimas son saponinas, aminoácidos y polifenoles. Estos resultados se deben probar con ensayos *in vitro* de los compuestos purificados.

2.4 Materiales y Métodos

2.4.1 Reactivos y equipos

Se usó metanol (grado RA) en los procesos de extracción. Para los ensayos de inhibición enzimática se compraron a Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) los reactivos α -D-glucopiranosido (pNPG) N1377, Acarbosa A8980, polvo intestinal de rata (en acetona) I1630, alfa amilasa de páncreas porcino (PPA) A3176, Almidón azul Sigma/Aldrich S7776, TRIS base, K_2HPO_4 , y KH_2PO_4 .

Para el procesamiento de las muestras se usó un ultrasonicador Vevor Digital Ultrasonic Cleaner, (Vevor Ltd, Los Ángeles, CA, USA), una microcentrífuga refrigerada Hettich D-78532 (Tuttligen, Alemania), un liofilizador Labconco. (Crawley, UK) y el lector de Microplacas BIORAD modelo 550 fue empleado en la determinación de la absorbancia. Para la obtención de la solución de α -glucosidasa a partir de extracto acetónico de intestino de rata se usó un sonicador Qsonica (Melville, NY, USA). En la incubación de las muestras se utilizó la incubadora con agitación (Polimax 1040, Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Alemania).

En el caso de los análisis por RMN se usaron Metanol- d_4 , agua deuterada comprados a Merck GmbH (Steinheim, Germany). En los análisis por UHPLC-DAD se empleó metanol (grado HPLC), acetonitrilo (grado HPLC) comprados a Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los estándares de referencia usados fueron: quercetina-3-*O*-glucósido (Sigma, >98%), kaempferol-3-*O*-glucósido (Sigma, >97%), (-)-catequina (Sigma, >95%), y crisina (Fluka, >98%). La identidad de los compuestos de referencia se verificó por RMN- 1H y HPLC-MS.

2.4.2 Material vegetal

Las hojas de *Passiflora ligularis* Juss fueron colectadas en parcelas de cultivos comerciales ubicados en los municipios de Anolaima (Cundinamarca), Junín (Cundinamarca) y Algeciras (Huila); los proveedores del recurso biológico firmaron el consentimiento informado encontrado en el Anexo en el cual declaran su conocimiento sobre la recolección de material vegetal con fines académicos. Las hojas recolectadas corresponden a cultivos en diferentes estadios de desarrollo; las características fenológicas y ubicación geográfica de las parcelas se detallan en la [tabla 2.1](#); como una aproximación a la clasificación fenológica de los cultivos se

empleó la escala BBCH (*Biologische Bundesanstalt, Bundensortenamt and Chemical Industry*) establecida por Melgarejo *et. al* para el cultivo de granadilla. En cada cultivo se tomaron diez hojas que fueron congeladas en nitrógeno líquido y otras diez hojas que fueron almacenadas a temperatura ambiente; cada hoja se considera como una muestra independiente y su procesamiento se realiza de forma separada. Se depositó un espécimen en el Herbario Nacional de Colombia del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia con el número (COL602878).

2.4.3 Procesamiento de las muestras

- **Secado y molienda**

Para las muestras almacenadas en nitrógeno líquido se empleó la liofilización como método de secado. La molienda de cada una de las hojas se realizó de forma separada con un mortero de cerámica controlando la humedad para evitar la reactivación de las enzimas. Cada una de las hojas trituradas fue almacenada de forma separada en tubos Falcon en un ultra congelador a -76°C.

En el caso de las muestras almacenadas a temperatura ambiente, el secado se llevó a cabo mediante la exposición del material vegetal a corrientes de aire, y el almacenamiento de forma separada a temperatura ambiente. La molienda fue realizada de la misma forma que para el caso de las muestras almacenadas en nitrógeno líquido.

- **Extracción**

La extracción se realizó siguiendo el protocolo reportado por Kim *et al.* para el análisis metabolómico de muestras vegetales. Así, para las muestras a someter a evaluación biológica 25 mg de material vegetal se introdujeron en tubos Ependorf, se adicionaron 500 µL de metanol y 500 µL de *Buffer* fosfatos 90 mM ajustado a pH 6.0. Las muestras fueron sometidas a ultrasonido por 10 minutos, posterior a esto se centrifugaron a una velocidad de 6000 rpm por 10 minutos; el sobrenadante obtenido se usó para los ensayos de inhibición enzimática.

Para las muestras de análisis metabolómico se empleó la misma mezcla de disolventes, pero usándolos deuterados, conocidos como MD6 (mezcla 1:1 de MeOD y buffer fosfatos 90mM

ajustado a pH 6.0 en D₂O), por lo demás el procedimiento fue el mismo al anteriormente descrito.

2.4.4 Análisis metabólico por RMN.

Los espectros de RMN-¹H fueron tomados a 23.0 °C en un espectrómetro Bruker AVANCE-400 de 400MHz. Los parámetros experimentales de la espectroscopía RMN-¹H, la espectroscopía de correlación ¹H-¹H COSY y heteronuclear multiple bond correlation (HMBC) fueron los sugeridos por Kim et al.⁵⁰. Cada espectro de RMN-¹H se tomó con 64 *scans* usando los siguientes parámetros: 0.14 Hz/punto, ancho de pulso (pulse width, PW) = 30 (11.75 μ s) y tiempo de relajación (relaxation delay) de 2.0 s³⁶. Las FID fueron tratadas usando la transformaciones de Fourier con ensanchamiento de línea⁵¹ = 0.3 Hz. Los espectros fueron registrados con pre-saturación para suprimir la señal residual del DHO. Los espectros obtenidos fueron analizados usando el software TOPSIN™ 3.5. La fase y la línea base fueron ajustadas manualmente, y se calibraron a 3.31 ppm según la señal residual del metanol. Los espectros de cada una de las muestras fueron normalizados en términos de área total, empleando el software AMIX™, se realizó el “*binning*” desde 0 a 9 ppm a intervalos de 0.04 ppm, para finalmente obtener la matriz de datos de cada muestra. La matriz se introdujo en el Software SIMCA™ v 14.1 en el cual se ejecutaron los análisis multivariados PCA y OPLS-DA. Para evidenciar la precisión de las mediciones y su impacto sobre los modelos estadísticos, se establecieron como muestras de control de calidad réplicas de una misma muestra registradas a lo largo del experimento, para este caso la muestra J2R2.

Los metabolitos primarios fueron identificados por comparación de los espectros (desplazamiento y constantes de acoplamiento) con los reportados para patrones en la librería espectral Chemon Chenomx™ 400 MHz, y la base de datos del laboratorio³. En el caso de metabolitos secundarios como saponinas y compuestos polifenólicos se emplearon reportes de la literatura o la información de compuestos previamente identificados en el grupo de investigación para la especie.

2.4.5 Análisis, aislamiento e identificación de flavonoides

- Análisis por HPLC-DAD y HPLC-MS/MS

Los análisis por RMN de flavonoides en mezcla son complejos y requieren complementarse con técnicas cromatográficas. Para esto, 110 g de hojas secas y molidas fueron sometidas al proceso de extracción mediante la técnica de infusión con agua destilada en ebullición en una relación p/v (1:9), el extracto obtenido se congeló y posteriormente fue liofilizado. El extracto obtenido (20g) fue disuelto en agua y pasado lentamente a través de una Amberlita XAD-2™, posteriormente se lavó con agua, y los flavonoides fueron eluidos con etanol. La porción eluída con el alcohol (2.1 g) fue disuelta en una mezcla de metanol: agua 9:1, y fraccionada sobre una columna de Sephadex™ LH20 colectando fracciones de 5 mL en tubos de ensayo. Las fracciones se analizaron por placa (AcOEt: acetona: AcOH: Agua 6:2:1:1, revelando con sulfato cérico amónico 1%). Se obtuvieron 17 fracciones (F1 a F17), las primeras ricas en saponinas (F1 a F5) y las otras ricas en flavonoides (F6 a F17). Todas las fracciones fueron analizadas por HPLC-DAD, y algunas RMN y HPLC-MS/MS.

El análisis de HPLC-DAD se realizó en un equipo Ulitmate™ 3000 UHPLC, con un detector de arreglo de diodos (DAD). La separación se llevó a cabo usando una columna C18 Kinetex™ (100 × 2.1mm, 2.6 μm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA), empleando el sistema de solventes de ácido fórmico 1% (solvente A) y acetonitrilo (Solvente B), en una rampa de 0-5 min al 5% B; de 5-10 min al 10% B; 10-20 min al 13% B; de 20-25 min al 18% B, de 25-32 min al 25% B; de 32-38 min al 40% B, y finalmente de 38-40 min al 5% B. Para cada muestra se inyectaron 5 μL y se usó un flujo de 0.5 mL/min. Se hizo un registro en UV de 200 nm a 450 nm para obtener los espectros de UV de los compuestos eluidos.

El análisis de HPLC-qTOF-MS se realizó en un equipo Ultimate™ 3000 UHPLC acoplado a un espectrómetro de masas Bruker Impact II qTOF, equipado con una fuente de ionización por electrospray Apollo II. Los análisis fueron realizados con ESI en detección en modo negativo y positivo, el rango de masas (m/z) se fijó de 40–1800. El espectrómetro de masas se programó para adquirir datos de MS/MS de manera dependiente de la intensidad de los iones. Las muestras fueron separadas usando una columna C18 Acclaim™ (100 × 2.1 mm, 2.2 μm) (Thermo Fischer Scientific, MA, USA) y se usó un sistema de solventes de ácido fórmico

0.1%(solvente A) y 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo (solvente B), en una rampa de 15% B de 0-4 min, 45% B de 4-20 min, 90% B 20-30 min, 15% B 30-35 min. Para cada muestra se inyectaron 4 μ L y se usó un flujo de 0.45 mL/min.

- **Aislamiento de flavonoides**

De las fracciones F6 a F17 se seleccionaron las fracciones en donde se encontraban los flavonoides mayoritarios según perfil de CCD. Así, la fracción F9 (13 mg) se separó mediante HPLC semipreparativo usando una columna Kromasil™ C18 (250 x 10 mm, 5 μ m), con una mezcla de solventes de agua (solvente A) y acetonitrilo (solvente B), en una rampa de 25%B de 0-5min, 28%B 5-10 min, 35% B 10-20min, 40%B 20-25min, 45%B 25-30min, y 25%B 30-35 min. Se colectaron 9 subfracciones (F9.1-F9.9), en la subfracción F9.8 (0.8mg) se identificó un compuesto mayoritario denominado compuesto **28**, se analizó por RMN-¹H (DMSO-*d*₆).

La fracción F13 (90mg) fue sometida a separación por HPLC preparativo empleando la misma columna y el mismo sistema de solventes, en una rampa de 15%B de 0-10min, 18%B 10-20min, 25%B 20-30min, 35%B 30-38min, 40%B 38-45min, 15%B 45-50min. Se obtuvieron 9 subfracciones (F13.1-F13.9), de las cuales se analizó RMN-¹H (DMSO-*d*₆) la subfracción F13.8 puesto que su perfil cromatográfico reveló la presencia de un compuesto mayoritario, denominado compuesto **25**. La subfracción F13.5 (9 mg) se sometió a una separación adicional usando el mismo tipo de columna y sistema de solventes, con una rampa de 20%B 0-5min, 30% B5-10min, 35%B 10-20min, 40%B 20-25min, 20%B 25-30min. De esta separación adicional se obtuvo la subfraccion F13.5.3 (2.4mg), la cual presentaba una mezcla de compuestos (**17** y **17a**) que de igual forma se analizó por RMN-¹H (DMSO-*d*₆).

- **Aislamiento de saponinas**

El aislamiento del ligularósico C se realizó mediante la separación por HPLC preparativo empleando un extracto butanólico de las hojas. Se utilizó las mismas condiciones cromatográficas y columna, que el descrito en el párrafo anterior. Del extracto butanólico se obtuvieron 13 fracciones, FB1-FB13, la fracción FB11(11.2mg) y Fracción FB12 (8.5mg) fueron analizadas por RMN, encontrándose una mezcla entre la saponina y un compuesto polifenólico (**26**). Estas fracciones se reunieron y se sometieron a una separación por cromatografía de

exclusión de tamaño Sephadex™ LH20, se realizó el seguimiento por CCD usando el revelador sulfato cérico-amónico, de aquí se obtuvo la fracción FB11.1, la cual fue analizada por RMN obteniendo espectros de ^1H , HSQC y HMBC.

2.4.6 Ensayos de inhibición enzimática

- **Inhibición de la α -amilasa pancreática porcina**

Se utilizó la metodología descrita por Hansawasdi- Kawabata *et al.*⁵² modificada por Rey *et al.*⁵³, en la cual se determina la actividad enzimática mediante la absorbancia generada por fragmentos solubles de dextrinas unidas al colorante remasol azul producto de la hidrólisis del almidón azul. Para esto, se tomaron 200 μL de suspensión de sustrato almidón azul (10 mg/mL) y fueron adicionados a un tubo Eppendorf, el cual se calentó (tapado) a ebullición por 5 minutos, luego se incubó a 37 °C por 5 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se agregaron 200 μL del extracto de grandilla (25 mg hojas/mL) o de una solución de acarbose a una concentración de 350 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como control positivo. Finalmente 100 μL de la solución de la enzima alfa-amilasa pancreática porcina, con una concentración de 4.0 U.I/mL fueron adicionados. Tanto la enzima como el sustrato fueron dispersados previamente en buffer Tris-HCl 0.05M CaCl_2 0.01M pH 6.8. La mezcla de reacción se incubó por 60 minutos a 37°C, y luego se centrifugó a 4°C por 10 minutos a una velocidad de 15000 rpm. De esta forma, 100 μL de sobrenadante se dispusieron en un placa de 96 pozos para medir la absorbancia a 600 nm^{42,53}.

La siguiente tabla recopila los volúmenes de reactivo empleados en las diferentes muestras:

Tabla 2.4: Soluciones a empleadas en el ensayo Inhibición de inhibición de alfa-amilasa.

| Muestra Reactivo | Control 100% actividad | Blanco del Control 100% de actividad | Inhibidor: extracto o acarbose | Blanco extracto o acarbose |
|---|---|---|---|---|
| Sustrato (Azure Starch) | 200 μ L | 200 μ L | 200 μ L | 200 μ L |
| Alfa-amilasa | 100 μ L | ----- | 100 μ L | ----- |
| Muestra (extracto o acarbose) | ----- | ----- | 200 μ L (Acarbose:57 0 μ g/mL, Extractos: 25mg hojas/mL) | 200 μ L |
| Mezcla metanol:Buffer fosfatos 90mM pH 6.0 | 200 μ L | 200 μ L | ----- | ----- |
| Buffer Tris-HCl 0.05M pH 6.8 | ----- | 100 μ L | ----- | 100 μ L |

En este ensayo se evaluó la actividad inhibitoria producida por 5mg de hojas, puesto que se emplearon 200 μ L de un extracto con una concentración de 25mg de hojas/mL. Así, teniendo en cuenta el volumen final del medio de reacción, la concentración final de los extractos fue de 10 mg de hojas/mL, mientras para el control positivo, la acarbose, fue de 140 μ g/mL.

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

100 mg de extracto acetónico en polvo de intestino de rata se suspendieron en 1mL de solución salina al 0.9%; esta mezcla se sonicó 12 veces por 30 segundos a 4°C. Posteriormente, se centrifugó a 15000 rpm por 30 min y se utilizó el sobrenadante para el ensayo, el cual tuvo una concentración enzimática aproximada de 1.0 U.I./mL, lo anterior con base al ensayo de Ayinampudi *et al* y a lo reportado por Rey *et al*^{32,52}.

Como sustrato se empleó una solución de α -D-glucopiranosido de *p*-nitrofenilo (pNPG) a una concentración de 11.3 mM en un buffer de fosfatos 0.5 M a pH 6.8. Los ensayos se llevaron a cabo directamente en placas de 96 pozos, en cada pozo se mezclaron 20 μ L del buffer de fosfatos

0.5M, 10 μ L de la suspensión de la enzima, 20 μ L de una solución de la muestra a ensayar o inhibidor (acarbose) y 40 μ L de agua destilada. La solución del extracto inhibidor fue obtenida a partir de 25 mg de hojas secas de acuerdo a la sección anterior. Esta mezcla se incubó a 37 $^{\circ}$ C por 15 minutos. Transcurrido este tiempo se adicionaron 10 μ L de la solución del sustrato, y se incubó por otros 60 min a la misma temperatura. Finalmente, se midió la absorbancia de cada pozo a 405 nm⁵².

En el caso de las muestras control, es decir aquellas donde se espera 100% de la actividad enzimática, los 20 μ L de la solución de inhibidor fueron reemplazados con 20 μ L del solvente empleado para los extractos (metanol: buffer fosfatos 90 mM pH 6.0 1:1), con el fin de tener en cuenta el efecto del metanol en la estabilidad de la proteína. La distribución de los volúmenes de reactivos empleados se detalla en la tabla siguiente.

Tabla 2.5: Soluciones a empleadas en el ensayo Inhibición de inhibición de alfa-glucosidasa de intestino de rata

| Muestra Reactivo | Control 100% actividad | Blanco del Control 100% actividad | Inhibidor: extracto acarbose | Blanco extracto acarbose |
|--|---------------------------------------|--|--|---|
| Buffer fosfatos 0.5M pH 6.8 | 20 μ L | 30 μ L | 20 μ L | 40 μ L |
| Alfa-glucosidasa | 10 μ L | ----- | 10 μ L | ----- |
| Muestra (extracto o acarbose) | ----- | ----- | 20 μ L (Acarbose:570 μ g/ mL, Extractos: 25mg hojas/mL) | 10 μ L |
| Mezcla metanol:Buffer fosfatos 90mM pH 6,0 | 20 μ L | 20 μ L | ----- | ----- |
| Agua destilada | 40 μ L | 40 μ L | 40 μ L | 40 μ L |
| Sustrato | 10 μ L | 10 μ L | 10 μ L | 10 μ L |

En este ensayo se evaluó la actividad inhibitoria producida por 0.5mg de hojas, puesto que se emplearon 20 μ L de un extracto con una concentración de 25mg de hojas/mL. Así, teniendo en cuenta el volumen final del medio de reacción, la concentración final de los extractos fue de 5 mg de hojas/mL, mientras para el control positivo, la acarbose, fue de 114 μ g/mL

Para los cálculos de inhibición de la actividad inhibitoria de los extractos, se empleará la siguiente fórmula:

$$\%Inhibición = \frac{(A_{100\%} - A_{B100\%}) - (A - A_{Bm})}{(A_{100\%} - A_{B100\%})} \times 100$$

En donde:

$A_{100\%}$: Absorbancia promedio del control 100% actividad enzimática

$A_{100\%B}$: Absorbancia promedio del blanco del control de 100% actividad enzimática

A: Absorbancia con presencia de inhibidor

A_{Bm} : Absorbancia promedio del blanco de los pozos con presencia de inhibidor

C. Análisis estadístico

Los resultados de porcentaje de inhibición se presentan como la media aritmética \pm error estándar SEM. Con el fin establecer datos atípicos en el conjunto de 3 datos de cada tipo de muestra se empleó el test de Grubbs con un $\alpha=0.05$.

2.5 Bibliografía

- (1) Taylor, J. L. S.; Rabe, T.; McGaw, L. J.; Jager, a. K.; van Staden, J. Towards the Scientific Validation of Traditional Medicinal Plants. *Plant Growth Regul.* **2001**, *34* (1), 23–37.
- (2) Gurib-Fakim, A. Medicinal Plants: Traditions of Yesterday and Drugs of Tomorrow. *Mol. Aspects Med.* **2006**, *27* (1), 1–93.
- (3) Kim, H. K.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. NMR-Based Metabolomic Analysis of Plants. *Nat. Protoc.* **2010**, *5* (3), 536–549.
- (4) Okada, T.; Afendi, F. M.; Takahashi, H.; Nakamura, K.; Kanaya, S. Metabolomics of Medicinal Plants : The Importance of Multivariate Analysis of Analytical Chemistry Data. **2010**, 179–196.
- (5) Mukherjee, P. K.; Harwansh, R. K.; Bahadur, S.; Biswas, S.; Kuchibhatla, L. N.; Tetali, S. D.; Raghavendra, A. S. Metabolomics of Medicinal Plants a Versatile Tool for Standardization of Herbal Products and Quality Evaluation of Ayurvedic Formulations. **2016**, *111* (10).
- (6) Worley, B.; Powers, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Curr Metabolomics* **2013**, *1* (1), 92–107.
- (7) Pavarini, D. P.; Pavarini, S. P.; Niehues, M.; Lopes, N. P. Exogenous Influences on Plant Secondary Metabolite Levels. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2012**, *176* (1–4), 5–16.
- (8) DANE. El Cultivo de La Granadilla (*Passiflora Ligularis* Juss.), y Los Efectos de La Temporada Seca. *Boletín Mens. Insumos y factores Asoc. a la Prod. Agropecu.* **2017**, 1.
- (9) Melgarejo, L. *Granadilla (Passiflora Ligularis Juss): Caracterización Ecofisiológica Del Cultivo*; Universidad Nacional de Colombia (Sede Bogotá). Facultad de Ciencias, Colciencias: Corporación Centro de Desarrollo Tecnológico de las Pasifloras de Colombia – CEPASS, **2015**.
- (10) Kim, H. K.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. NMR-Based Plant Metabolomics: Where Do We Stand, Where Do We Go? *Trends Biotechnol.* **2011**, *29* (6), 267–275.

- (11) Naranjo, S. Estudio de bioprospección de compuestos inhibidores de la comunicación celular (QS) como estrategia de control de agentes fitopatógenos. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Química,. **2017**.
- (12) Meneses, C. Saponinas y Flavonoides de *Passiflora ligularis* y Evaluación de Su Actividad Antiinflamatoria. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de química. **2016**
- (13) Wu, G. Amino Acids: Metabolism, Functions, and Nutrition. *Aminoacids*. **2009**, 1–17.
- (14) Zeisel, S.; da Costa, K. A. Choline: An Essential Nutrient for Public Health. *Nutr Rev* **2009**, 67 (11), 615–623.
- (15) Bowery, N. G.; Smart, T. G. GABA and Glycine as Neurotransmitters : A Brief History. *Br. J. Pharmacol*. **2006**, 147, 109–119.
- (16) Mani, R.; Natesan, V. Chrysin: Sources, Beneficial Pharmacological Activities, and Molecular Mechanism of Action. *Phytochemistry* **2018**, 145, 187–196.
- (17) Samarghandian, S.; Azimi-nezhad, M.; Samini, F.; Farkhondeh, T. Chrysin Treatment Improves Diabetes and Its Complications in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J. Physiol. Pharmacol*. **2016**, 4, 388-393.
- (18) Yunlong, L.; Kui, W.; Longfei, D.; Yi, C.; Edouard, N.; Canhua, H. Redox Regulation of Inflammation: Old Elements, a New Story. *Med. Res. Rev*. **2014**, 95 (9), 1–35.
- (19) Waters Corporation. W. 2424 Evaporative Light Scattering Detector. Guía del operador guide. 2006 .
- (20) Andersen, O.; Markham, K. *Chemistry, Biochemistry and Applications*, First.; Andersen, O., Markham, K., Eds.; Taylor & Francis Group, **2006**.
- (21) Cuyckens, F.; Claeys, M. Mass Spectrometry in the Structural Analysis of Flavonoids. *J. Mass Spectrom*. **2004**, 39, 1–15.
- (22) Farag, M. A.; Otify, A.; Porzel, A.; Michel, C. G.; Elsayed, A.; Wessjohann, L. A. Comparative Metabolite Profiling and Fingerprinting of Genus *Passiflora* Leaves Using a Multiplex

- Approach of UPLC-MS and NMR Analyzed by Chemometric Tools. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408* (12), 3125–3143.
- (23) Hye, M. A.; Taher, M. A.; Ali, M. Y.; Ali, M. U.; Zaman, S. Isolation of (+)-Catechin Drom Acacia Catechu (Cutch Tree) by a Convenient Method. *J. Sci. Res.* **2009**, *1* (2), 300–305.
- (24) Pereira, C. C. B. B. J. M. R. Flavonoids and Neolignanes Froma Guarea Macrophylla (*Meliaceae*). *Quim. Nov.* **2012**, *35* (6), 1123–1126.
- (25) Lin, L.; Pai, Y.; Tsai, T. Isolation of Luteolin and Luteolin-7- O - Glucoside from *Dendranthema Morifolium* Ramat Tzvel and Their Pharmacokinetics in Rats. *J. Agric. Food Chem.*, **2015**, *63*, 7700-7706.
- (26) Katsube, T.; Imawaka, N.; Kawano, Y.; Yamazaki, Y.; Shiwaku, K.; Yamane, Y. Antioxidant Flavonol Glycosides in Mulberry (*Morus Alba* L.) Leaves Isolated Based on LDL Antioxidant Activity. *Food Chem.* **2006**, *97* (1), 25–31.
- (27) Li, Z. H.; Guo, H.; Xu, W. Bin; Ge, J.; Li, X.; Alimu, M.; He, D. J. Rapid Identification of Flavonoid Constituents Directly from PTP1B Inhibitive Extract of Raspberry (*Rubus Idaeus* L.) Leaves by HPLC-ESI-QTOF-MS-MS. *J. Chromatogr. Sci.* **2016**, *54* (5), 805–810.
- (28) Bennett, R. N.; Mellon, F. A.; Needs, P. W.; Piacente, S.; Kroon, P. A.; Bao, Y. Isolation , Identification and Stability of Acylated Derivatives of Apigenin 7- O -Glucoside from Chamomile (*Chamomilla Recutita* [L .] Rauschert). *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2323–2332.
- (29) Lee, Y. S.; Lee, S. L.; Lee, S. L.; Kim, B.; Ohuchi, K. Inhibitory Effects of Isorhamnetin-3-O-b-D-Glucoside from *Salicornia Herbacea* on Rat Lens Aldose Reductase and Sorbitol Accumulation in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Tissues. *Biol. Pharm. Bull* **2005**, *28* (5), 916–918.
- (30) Ali El Antri, Ibtissam Messouri , Rachida Chendid Tlemçani , Mohamed Bouktaib , Rachid El Alami, Brahim El Bali, M. L. Flavone Glycosides from *Calycotome Villosa* Subsp. *Intermedia* Ali. *Molecules* **2004**, *9*, 568–573.
- (31) Alwahsh, M. A. A.; Khairuddean, M.; Chong, W. K. Chemical Constituents and Antioxidant

- Activity of Teucrium Barbeyanum Aschers. *Rec. Nat. Prod* **2015**, *1*, 159–163.
- (32) Han, M. S.; Lee, I. K.; Kim, Y. S.; Kim, J. T.; Choe, K. R.; Yun, B. S. Flavonoids from Propolis Inhibit DNA Single Strand Breakage by the Fenton Reaction. *J. Appl. Biol. Chem.* **2010**, *53* (4), 512–515.
- (33) Zeeb, D. J.; Nelson, B. C.; Albert, K.; Dalluge, J. J. Separation and Identification of Twelve Catechins in Tea Using Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2000**, *72* (20), 5020–5026.
- (34) Davis, B. D.; Brodbelt, J. S. An Investigation of the Homolytic Saccharide Cleavage of Deprotonated Flavonol 3- O -Glycosides in a Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer. *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43* (February), 1045–1052.
- (35) Zucolotto, S. M.; Fagundes, C.; Reginatto, F. H.; Ramos, F. A.; Castellanos, L.; Duque, C.; Schenkel, E. P. Analysis of C-Glycosyl Flavonoids from South American *Passiflora* Species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochem. Anal.* **2012**, *23* (3), 232–239.
- (36) Shanmugam, S.; Thangaraj, P.; Lima, S. Effects of Luteolin and Quercetin 3-b-D-Glucoside Identified from *Passiflora Subpeltata* Leaves against Acetaminophen Induced Hepatotoxicity in Rats. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *83*, 1278–1285.
- (37) Wang, T.; Li, Q.; Bi, K. Bioactive Flavonoids in Medicinal Plants : Structure , Activity and Biological Fate. *Asian J. Pharm. Sci.* **2018**, *13* (1), 12–23.
- (38) Valentová, K.; Vrba, J.; Bancírová, M.; Ulrichová, J.; Kren, V. Isoquercitrin : Pharmacology , Toxicology , and Metabolism. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *68*, 267–282.
- (39) Panat, N. A.; Amrute, B. K.; Bhattu, S.; Haram, S. K.; Sharma, G. K. Antioxidant Profiling of C3 Quercetin Glycosides : Quercitrin , Glucoside in Cell Free Environment. *Free Radicals Antioxidants* **2015**, *5* (2), 90–100.
- (40) Pyner, A.; Nyambe-silavwe, H.; Williamson, G. Inhibition of Human and Rat Sucrase and Maltase Activities To Assess Antiglycemic Potential : Optimization of the Assay Using Acarbose and Polyphenols. **2017**.

- (41) Lehoczki, G.; Kandra, L.; Gyémánt, G. The Use of Starch Azure for Measurement of Alpha-Amylase Activity. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *183*, 263–266.
- (42) Gloster, T. M.; Turkenburg, J. P.; Potts, J. R.; Henrissat, B.; Davies, G. J. Divergence of Catalytic Mechanism within a Glycosidase Family Provides Insight into Evolution of Carbohydrate Metabolism by Human Gut Flora. *Chem. Biol.* **2008**, *15* (10), 1058–1067.
- (43) Figueiredo, D.; Colomeu, T. C.; Schumacher, N. S. G.; Stivanin-Silva, L. G.; Cazarin, C. B. B.; Meletti, L. M. M.; Fernandes, L. G. R.; Prado, M. A.; Zollner, R. L. Aqueous Leaf Extract of *Passiflora Alata* Curtis Promotes Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects and Consequently Preservation of NOD Mice Beta Cells (Non-Obese Diabetic). *Int. Immunopharmacol.* **2016**, *35*, 127–136.
- (44) Rosato, A.; Tenori, L.; Cascante, M.; Ramon, P.; Carulla, D. A.; Martins, V. A. P.; Saccenti, E. From Correlation to Causation : Analysis of Metabolomics Data Using Systems Biology Approaches. *Metabolomics* **2018**, *14* (4), 1–20.
- (45) Eriksson, L.; Jaworska, J.; Worth, A. P.; Cronin, M. T. D.; Mcdowell, R. M.; Gramatica, P. Methods for Reliability and Uncertainty Assessment and for Applicability Evaluations of Classification- and Regression-Based QSARs. *Environ. Health Perspect.* **2003**, *111* (10), 1361–1375.
- (46) Billaut, J. C.; Nadal-desbarats, L.; Pradat, P. F.; Devos, D.; Moreau, C.; Andres, C. R.; Emond, P.; Corcia, P.; Słowin, R. Comparative Analysis of Targeted Metabolomics : Dominance-Based Rough Set Approach versus Orthogonal Partial Least Square-Discriminant Analysis. *J. Biomedical informatics.* **2015**, *53*, 291–299.
- (47) Tadera K.; Minami, Y.; Takamatsu, K.; Matsuoka, T. Inhibition of α -Glucosidase and α -Amylase by Flavonoids. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo). J. Nutr Sci Vitaminol.* **2006**, *52* (2), 149–153.
- (48) Giner Larza, E. M.; Castillo García, E. Fitoterapia y Diabetes. *Rev. Fitoter.* **2003**, *3* (2), 113–122.
- (49) Kim, H. K.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. NMR-Based Metabolomic Analysis of Plants. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 536–549.

- (50) Primot, S.; D'Eeckenbrugge, G. C.; Rioux, V.; Pérez, J. A. O.; Garcin, F. Variación Morfológica de Tres Especies de Curubas (*Passiflora Tripartita* Var. *Mollissima*, *P. Tarminiana* y *P. Mixta*) y Sus Híbridos En El Valle Del Cauca (Colombia). *Rev. Bras. Frutic.* **2005**, *27* (3), 467–471.
- (51) Hansawasdi, C.; Kawabata, J.; Kasai, T. Alpha-Amylase Inhibitors from Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* Linn.) Tea. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2000, pp 1041–1043.
- (52) Rey, D. P. Evaluación in Vitro Del Efecto de Un Extracto de Frutos de *Physalis Peruviana* Sobre Algunas Carbohidrasas Intestinales. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm* **2015**, *44* (1), 27–89.

3. Capítulo 3: Estudios *in silico* y evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria de compuestos identificados en hojas de *Passiflora ligularis* Juss sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa.

Resumen

Los métodos computacionales se han posicionado como herramientas de *screening* en la identificación de sustancias bioactivas dado su poder de predicción. En el presente capítulo se realizó el estudio de *docking* o acoplamiento molecular entre los compuestos identificados en hojas de *Passiflora ligularis*, y las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa, como un criterio de validación para los resultados del análisis metabolómico del capítulo anterior. Adicionalmente, se hicieron los ensayos de actividad inhibitoria enzimática *in vitro* con algunos de los compuestos aislados en cantidad suficiente.

Como estructura proteica se seleccionó la estructura con código 1HX0 de *Protein Data Bank*, correspondiente a la α -amilasa pancreática porcina co-cristalizada con un pseudo-hexasacárido derivado de acarbosa. En el caso de la α -glucosidasa se usó la estructura con código 2QMJ, que corresponde a la subunidad *N*-terminal de la glucosidasa intestinal humana co-cristalizada con acarbosa. Las estructuras fueron seleccionadas con base a la resolución de la estructura proteica, el grado de homología entre esta estructura y la enzima usada en los bioensayos, y la presencia del ligando co-cristalizado.

Las estructuras de las proteínas fueron pre-procesadas empleando el software MAESTRO 11.5, de forma que se removieron moléculas de agua, ligandos co-cristalizados y se generaron los estados de protonación de los residuos de aminoácido al pH del bioensayo, es decir 6.8. Las estructuras 3D de los ligandos (inhibidores y compuestos de *P. ligularis*) fueron modelados empleando este mismo software, y se generaron los estados de protonación en el pH 6.8. En el caso de las saponinas se modelaron los diastereoisómeros energéticamente viables, lo anterior dada la ausencia de información inequívoca de la configuración absoluta de los carbonos asimétricos de la cadena lateral. La validación del protocolo de acoplamiento (parámetros de ubicación y tamaño de ligando) se realizó ejecutando un re-acoplamiento del ligando co-cristalizado usando el software Autodock Vina. La selección de los mejores parámetros se basó en la conformación con mejor RMSD respecto a la conformación co-cristalizada. Los parámetros de rejilla obtenidos para α -amilasa fueron las coordenadas $x=36.06$, $y=19.95$ y $z=59.54$, con una dimensión de 30\AA ; mientras para α -glucosidasa se obtuvieron los parámetros $x=-20.78$, $y=-6.7$ y $z=-5.33$ con un tamaño de 25\AA .

Para la comparación del acoplamiento molecular se emplearon los parámetros de eficiencia de ligando, y el perfil de interacciones en el sitio activo expresado como el coeficiente de tanimoto. Como referencia de interacciones efectivas se usó el perfil de interacciones del ligando co-cristalizado, y los inhibidores de origen natural sinigrina y un C-flavonoide obtenido de *P. bogotensis*. Así, se encontró que para el caso de la α -amilasa la eficiencia de ligando co-cristalizado fue de $-0.18\text{Kcal}\cdot\text{átomo/mol}$, el cual presenta interacciones con los aminoácidos de la triada catalítica Asp197, Glu233, y Asp300; y con otros residuos implicados en la estabilización del ligando. Los compuestos con que mejor cumplieron con los criterios de eficiencia y perfil de interacciones fueron uno de los diastereoisómeros del ligularósido C (**15.1**), la quercetina-3-*O*-glucósido (**17**), la luteolina-7-*O*-glucósido (**17a**), el kaempferol-3-*O*-glucósido (**19**) y a la apigenina-7-*O*-glucósido (**19a**).

En el caso del acoplamiento con la α -glucosidasa, la acarbosa co-cristalizada presentó una eficiencia de ligando de $-0.17\text{Kcal}\cdot\text{átomo/mol}$ e interactúa con la triada catalítica Asp203, Asp327 y Asp 443, entre otros aminoácidos del sitio activo. La quercetin-3-*O*-(6"-malonil)-glucósido (**18**), apigenina-7-*O*-glucósido (**19a**), kaempferol3-*O*-(6"-malonil)-glucósido (**21**) e

isoramnetin-3-*O*-(6''malonil)-glucósido (**22**) fueron los compuestos con mejor perfil de interacciones y valores de eficiencia de ligando superior a la acarbosa. El análisis de interacciones arrojó que los compuestos de mayor peso molecular, como saponinas, flavonoides *O*-glicosilados y flavonoides *O*-glicosilados esterificados con malonato generan un perfil más similar a la acarbosa, mientras que compuestos de menor tamaño como la catequina y crisina, interactúan con el sitio activo de forma similar a la sinigrina.

Por otro lado, se determinaron los valores de IC_{50} de los compuestos glutamina (**3**), crisina (**14**), ligularósido C (**15**), catequina (**16**), quercetina-3-*O*-glucósido (**17**), kaempferol-3-*O*-glucósido (**19**) y crisin-7-*O*-(6''-acetil)-glucósido (**29**), para cada una de las enzimas estudiadas. De forma que para la α -amilasa pancreática porcina, los compuestos que presentaron un valor de IC_{50} menor o cercano al de la acarbosa (234 μ M), usada como control positivo, fueron el ligularósido C (409.80 μ M), quercetina-3-*O*-glucósido (31.04 μ M) y kaempferol-3-*O*-glucósido (33.45 μ M). Respecto a la inhibición de la α -glucosidasa, presente en el extracto de intestino de rata, sólo el compuesto quercetina-3-*O*-glucósido (15.37 μ M) presentó un valor de IC_{50} inferior al presentado por la acarbosa (156.6 μ M). Finalmente, al comparar estos resultados *in vitro* con los obtenidos tras el estudio de acoplamiento molecular, se encuentra que los compuestos tipo flavonol glicosilados, son los más activos del grupo de compuestos ensayados.

3.1 Introducción

Algunos métodos computacionales se han posicionado como herramientas de predicción de interacciones moleculares entre compuestos y algunas dianas biológicas de interés, y son herramientas potentes en la búsqueda, identificación y optimización de fármacos¹. El estudio de moléculas bioactivas a partir de fuentes naturales no es la excepción, de hecho, un gran número de investigaciones sobre PN complementan la evaluación de la actividad biológica de los metabolitos aislados con estudios computacionales de los mismos, que validan los resultados observados en un modelo farmacológico experimental. Estas aproximaciones computacionales también se han empleado como métodos de cribado para grandes bibliotecas de compuestos de origen sintético o natural, frente a una diana farmacológica o una actividad terapéutica deseada. De esta forma, se han optimizado los tiempos en los procesos de identificación de sustancias bioactivas, que comúnmente requieren de rigurosas etapas de purificación y gran cantidad de bioensayos².

De forma general, los métodos computacionales se clasifican, de acuerdo a la disponibilidad de información estructural de la diana biológica, en: métodos basados en el ligando, métodos basados en la estructura y métodos mixtos³. Los métodos basados en el ligando se fundamentan en modelos de relación estructura-actividad, generados a partir de características estructurales de moléculas con una actividad biológica conocida, sin ser necesario conocer la diana biológica con la que interactúan. Por otro lado, los métodos basados en la estructura se desarrollan con base en las características estructurales del sitio identificado como activo o modulable en la diana biológica. Por otro lado, en los métodos mixtos se emplean ambos enfoques para obtener las predicciones deseadas. El acoplamiento molecular (*molecular docking*) es uno de los métodos basados en la estructura más ampliamente usados; éste se basa en la predicción estructural de complejos ligando-receptor a través de algoritmos que establecen las conformaciones del ligando en el sitio activo de la macromolécula, y de funciones de puntuación que clasifican los complejos de acuerdo a su estabilidad energética¹.

En este capítulo se buscó medir la capacidad inhibitoria (mediante el IC₅₀) de los compuestos aislados frente a las enzimas α -amilasa pancreática porcina y a la α -glucosidasa presente en el

extracto enzimático obtenido del intestino de rata. Para luego correlacionar estos valores con los resultados de un estudio de acoplamiento molecular o *docking* realizado con las estructuras de los compuestos identificados y/o aislados de hojas de *Passiflora ligularis* Juss frente a las estructuras de la α -amilasa pancreática porcina, y a la subunidad *N*-terminal de la α -glucosidasa (glucomaltasa) intestinal humana. Todo lo anterior, con el objetivo de validar los resultados del estudio metabolómico del capítulo anterior, en el cual se estableció que los metabolitos relacionados con la actividad biológica de los extractos de hojas son de tipo polifenólico y saponina.

3.2 Resultados y discusión

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

- **Enzima α -amilasa**

La estructura de la α -amilasa pancreática porcina fue buscada mediante las palabras claves “pig”, “alpha amylase”, “acarbose” y “pancreatic”, en el buscador de la base de datos *Protein data bank*, se encontraron las 4 estructuras presentadas en la (Tabla 3.1). En la columna de referencia se indica el artículo que publicó la estructura referida.

Tabla 3.1: Estructuras de α -amilasa pancreática porcina co-cristalizada con acarbose obtenidas del PDB.

| Código PDB | Nombre | Resolución (Å) | Referencia |
|------------|---|----------------|----------------------------------|
| 1OSE | <i>Porcine pancreatic alpha-amylase complexed with acarbose</i> | 2.3 | Gilles <i>et al</i> ⁴ |
| 1HX0 | <i>Structure of pig pancreatic alpha-amylase complexed with the "truncate" acarbose molecule (pseudotrisaccharide)</i> | 1.38 | Qian <i>et al</i> ⁵ |
| 1PPI | <i>The active center of a mammalian alpha-amylase. the structure of the complex of a pancreatic alpha-amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2 angstroms resolution</i> | 2.2 | Qian <i>et al</i> ⁶ |
| 1JFH | <i>Structure of a pancreatic alpha-amylase bound to a substrate analogue at 2.03 angstrom resolution</i> | 2.03 | Qian <i>et al</i> ⁷ |

La estructura con código 1HX0 posee la mejor resolución cristalográfica (1.38 Å), además sus valores de R y R free (0.130 y 0.108), que corresponden a las desviaciones que presenta un patrón de difracción modelado respecto al patrón de difracción obtenido experimentalmente, se infiere que la estructura reportada tiene una alta calidad⁸. Esta estructura además posee como ligando co-cristalizado un *pseudo*-hexasacárido, generado por la transglucosilación de subproductos de la reacción de hidrólisis de la acarbose ([Figura 3.1](#))⁵. Todas estas consideraciones nos llevaron a seleccionar a el archivo de PDB 1HX0 como el de trabajo.

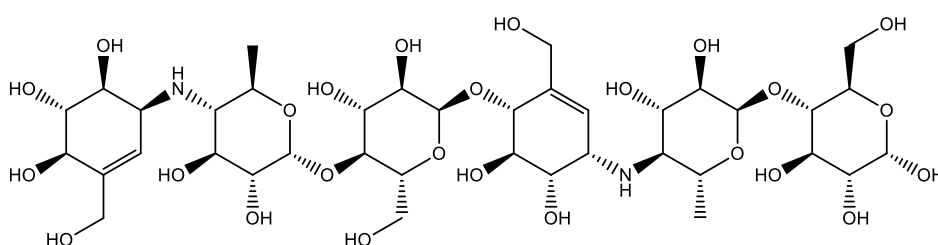


Figura 3.1: Estructura del *pseudo*-hexasacárido co-cristalizado con la α -amilasa pancreática porcina en la estructura PDB 1HX0.

- **Enzima α -glucosidasa**

Para la búsqueda de estructuras de α -glucosidasa se emplearon las palabras claves “*rat*”, “*alpha glucosidase*” y “*acarbose*”; no se encontraron estructuras 3D reportadas con estos términos. Dado que el bioensayo emplea un extracto enzimático obtenido a partir de polvo intestinal de rata, se determinó que la estructura 3D a usar debería tener un alto grado de homología estructural con la enzima de origen murino. La búsqueda de estructuras en el PDB con estas características solo arrojó estructuras de origen humano. Se seleccionó la estructura con código PDB 2QMJ correspondiente a la subunidad *N*-terminal de la α -glucosidasa (glucomaltosa) intestinal humana. Esta enzima posee un porcentaje de similitud del 60% con la secuencia reportada en la base de datos UNIPROT para la sacarasa-isomaltasa intestinal de rata (P23739 *uniprot entry*); lo anterior de acuerdo al análisis de homología realizado en la herramienta *online* BLAST. La estructura 2QMJ fue seleccionada dentro de las 5 estructuras generadas con estos criterios de búsqueda, dados sus valores de resolución cristalográfica (1.9 Å), valores de R y R *free* (0.177 y 0.215) y presencia de acarbose co-cristalizada⁹.

3.2.2 Pre-procesamiento de los archivos de las estructuras proteicas para el acoplamiento molecular.

La [figura 3.2](#) presenta las estructuras tridimensionales de las enzimas α -amilasa (1HX0) y α -glucosidasa (2QMJ) después del procesamiento ejecutado con la herramienta “*protein preparation wizard*”. Se eliminaron las moléculas de agua, ligandos e iones co-cristalizados con las proteínas; los órdenes de enlaces fueron asignados a residuos de aminoácidos y se seleccionaron las posiciones alternas de residuos que de acuerdo al mayor porcentaje de ocupación. El pH seleccionado para generar los estados de ionización de los residuos fue de 6.8, puesto que es este pH el de máxima actividad enzimática y el que se empleó en los bioensayos *in vitro*^{10,11}.

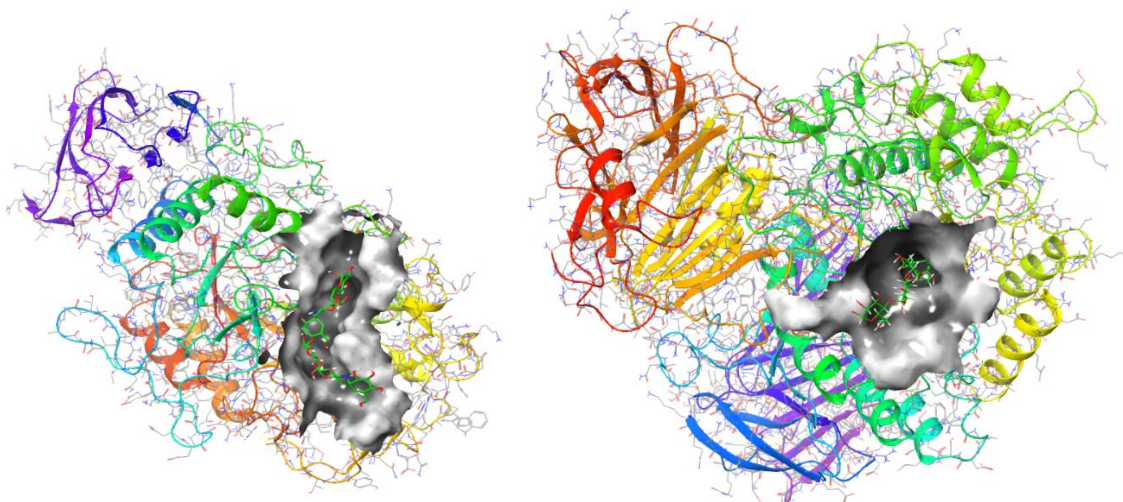
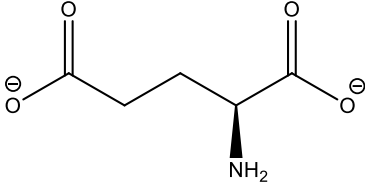
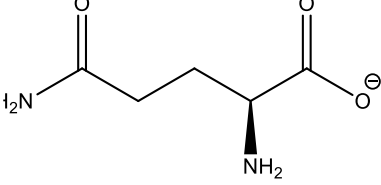


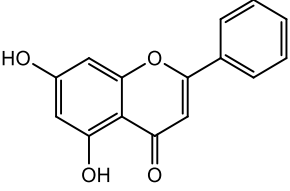
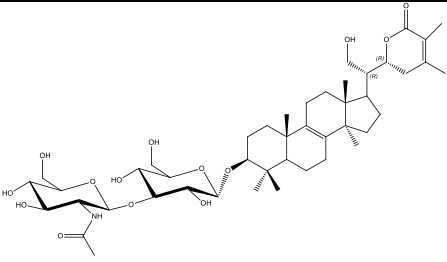
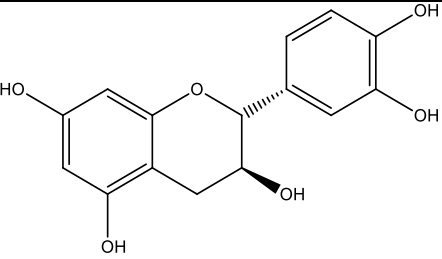
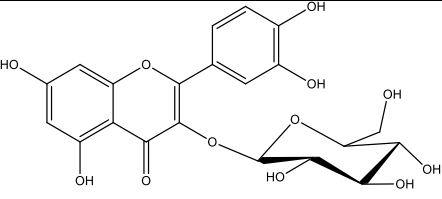
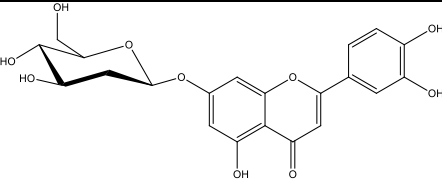
Figura 3.2: Estructuras 3D procesadas mediante la herramienta “*Protein preparation wizard*” del Software MAESTRO 11.5¹² de las enzimas empleadas para los estudios de acoplamiento molecular. **a)** Estructura α -amilasa pancreática porcina código PDB 1HX0, **b)** Estructura subunidad N-terminal de la α -glucosidasa intestinal humana código PDB 2QMJ. Los sitios de unión del ligando se esquematizan mediante superficie de van der Waals.

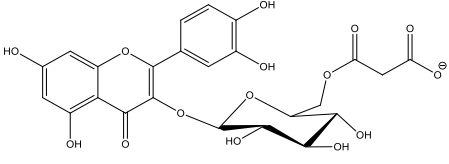
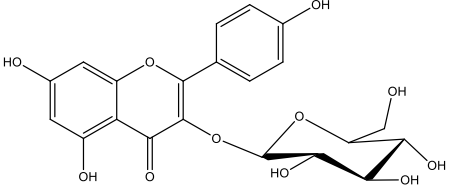
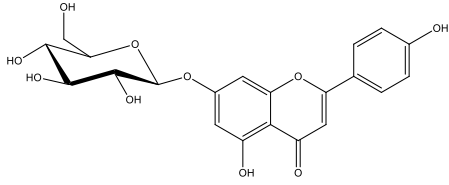
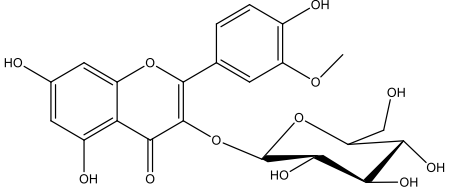
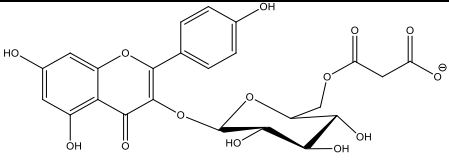
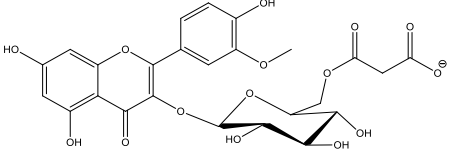
3.2.3 Preparación de las estructuras de los ligandos

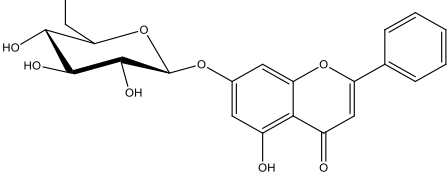
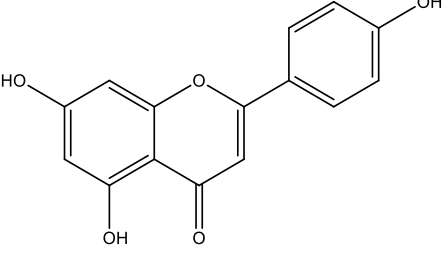
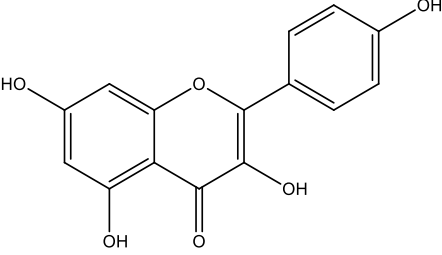
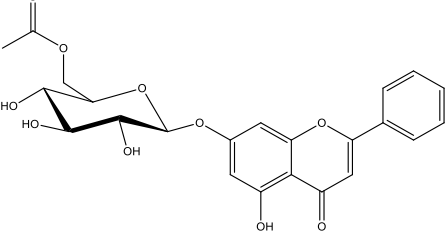
Los ligandos seleccionados fueron todos los compuestos identificados en el capítulo 2 como responsables de la actividad inhibitoria de los extractos polares de *P. ligularis*, es decir los polifenoles, y las saponinas, además del ácido glutámico y la glutamina, ya que señales de RMN atribuibles a dichos compuestos se relacionaron con la actividad inhibitoria de los extractos. Se incluyó un *C*-flavonoides (Compuesto **32**) aislado de *Passiflora bogotensis* como control positivo, además de la acarbosa, ya que este flavonoide presentó actividad inhibitoria frente a α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*¹³. También se incluyó la sinigrina, un glucosinolato con actividad inhibitoria de glucosil-hidrolasas de origen natural¹⁴. En la [tabla 3.2](#) se listan los compuestos usados en este estudio, es importante mencionar que para las saponinas ligularósido A-D, no se conoce la estereoquímica de la cadena lateral, los diastereoisómeros usados en el estudio se discuten a continuación.

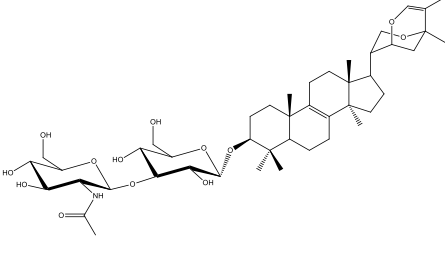
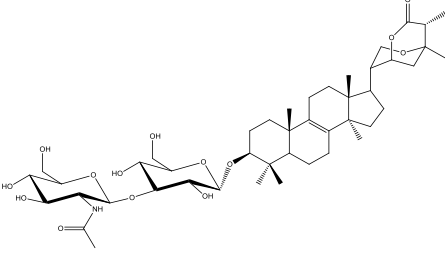
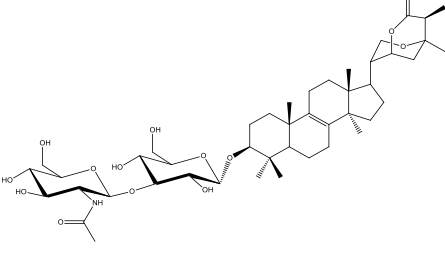
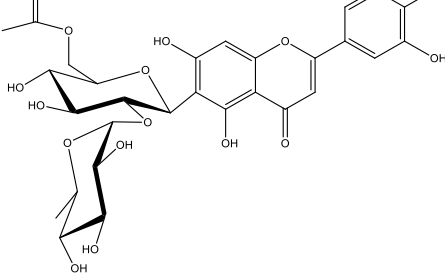
Tabla 3.2: Listado de metabolitos de hojas de *P. ligularis* usados en el estudio de acoplamiento molecular frente a las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa. Se tuvo en cuenta la protonación al pH de trabajo de los ensayos de inhibición enzimática.

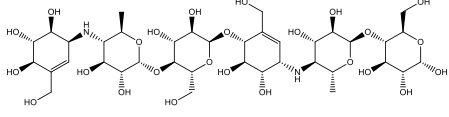
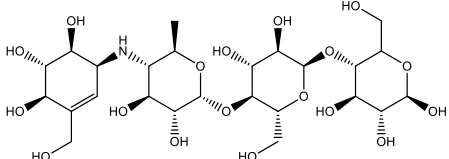
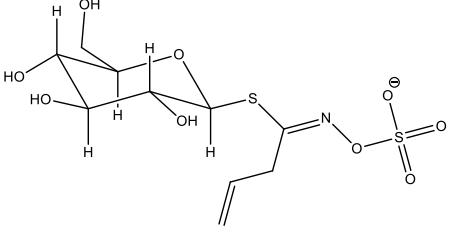
| No. Compuesto | Nombre | Estructura 2D |
|---------------|-----------------|--|
| 2 | Ácido glutámico |  |
| 3 | Glutamina |  |

| No. Compuesto | Nombre | Estructura 2D |
|---------------|--------------------------|--|
| 14 | Crisina |  |
| 15 | Ligularósido C |  |
| 16 | (-)-catequina |  |
| 17 | Quercetina-3-O-glucósido |  |
| 17a | Luteolin-7-O-glucósido |  |

| No. Compuesto | Nombre | Estructura 2D |
|---------------|--|--|
| 18 | Quercetin-3- <i>O</i> -(6''-malonil)-glucósido |  |
| 19 | Kaempferol-3- <i>O</i> -glucósido |  |
| 19a | Apigenin-7- <i>O</i> -glucósido |  |
| 20 | Isoramnetin-3- <i>O</i> -glucósido |  |
| 21 | Kaempferol 3- <i>O</i> -(6''-malonil)-glucósido |  |
| 22 | Isoramnetin-3- <i>O</i> -(6''-malonil)-glucósido |  |

| No. Compuesto | Nombre | Estructura 2D |
|---------------|---|--|
| 25 | Crisin-7- <i>O</i> -glucósido |  <p>The structure shows a glucose molecule in its cyclic Haworth projection, linked via an oxygen atom at the C7 position to the C7 position of a flavone aglycone. The aglycone consists of a benzopyrone core with a hydroxyl group at C5 and a phenyl ring at C2.</p> |
| 26 | Apigenina |  <p>The structure shows a flavone aglycone with a benzopyrone core. It has hydroxyl groups at C5 and C7, and a 4-hydroxyphenyl ring at C2.</p> |
| 27 | Kaempferol |  <p>The structure shows a flavone aglycone with a benzopyrone core. It has hydroxyl groups at C5, C7, and C8, and a 4-hydroxyphenyl ring at C2.</p> |
| 28 | Crisin 7-(6''- <i>O</i> -acetil)- <i>O</i> -glucósido |  <p>The structure shows a glucose molecule in its cyclic Haworth projection, linked via an oxygen atom at the C7 position to the C7 position of a flavone aglycone. The aglycone is identical to Crisin. Additionally, an acetyl group is attached to the C6'' position of the glucose ring.</p> |

| No. Compuesto | Nombre | Estructura 2D |
|---------------|---|--|
| 29 | Ligularósido B ^a |  |
| 30 | Ligularósido D ^a |  |
| 31 | Ligularósido A ^a |  |
| 32 | Luteolin-6-C- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-(6''-O-acetil)- β -D-glucósido |  |

| No. Compuesto | Nombre | Estructura 2D |
|---------------|--|---|
| PHAC | <i>Pseudo</i> -hexasacárido derivado de acarbosa |  |
| AC | Acarbosa |  |
| SI | Sinigrina |  |

^aDiastereoisómero representado por Meneses et al¹⁴.

Las saponinas (ligularósico A a D) fueron aisladas e identificadas por Meneses en su tesis de maestría, en ese trabajo se lograron caracterizar todos los centros quirales de los residuos del azúcar y del núcleo lanostano¹⁵. En un estudio reciente de nuestro grupo se pudo establecer, mediante estudios de la metodología de Murata¹⁶, que los centros de C-20 y C-22 corresponden a *R* y *R* para la saponina ligularósido C (**15**). De acuerdo a lo reportado por Meneses *et al.*, el compuesto **30** y **31** corresponden a epímeros en la posición C-25, con base a esto se estableció de forma arbitraria, la estereoquímica absoluta para el C-25 del compuesto **30** como *R* y para el compuesto **31** como *S*¹⁵. Ante la falta de información para los otros centros asimétricos para los compuestos **15**, **29**, **30** y **31**, se decidió modelar la estructura de todos los diastereoisómeros posibles, haciendo los cambios en la estereoquímica de los centros quirales de la cadena lateral. La [figura 3.3](#) presenta las estructuras de las saponinas con los carbonos quirales de la cadena lateral nombrados, a partir de esta asignación se logró establecer mediante modelado 3D, que para todos los compuestos eran viables 2 diastereoisómeros, teniendo la salvedad que los

compuestos **30** y **31** son epímeros y que biosintéticamente la configuración absoluta del C20 favorecida es R¹⁷. La estereoquímica absoluta modelada para cada posible diastereoisómero se presenta con detalle en la [tabla 3.3](#), es importante mencionar que solo las diastereoisómeros energéticamente viables son listados.

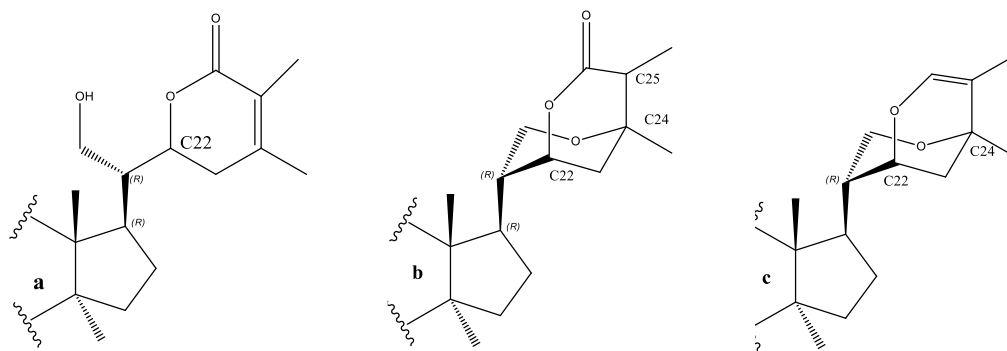


Figura 3.3: Estructuras de las cadenas laterales de las saponinas identificadas por Meneses *et al.* en hojas de *Passiflora ligularis* **a)** ligularósido C (**15**) **b)** ligularósido A y D (**30** y **31**)¹⁵. **c)** ligularósido B (**29**).

Tabla 3.3: Diastereoisómeros modelados para los compuestos **15**, **29-31**. Se describe la estereoquímica absoluta de cada uno de los centros quirales presentados en la figura 3.3.

| Compuesto | Código diastereoisómero | Estereoquímica absoluta modelada | | | |
|-----------|-------------------------|----------------------------------|-----|-----|-----|
| | | C20 | C22 | C24 | C25 |
| 29 | 29.1 | R | R | R | NA |
| | 29.2 | R | R | S | NA |
| 15 | 15.1 | R | R | NA | NA |
| | 15.2 | R | S | NA | NA |
| 30 | 30.1 | R | R | R | R |
| | 30.2 | R | R | S | R |
| 31 | 31.1 | R | R | R | S |
| | 31.2 | R | R | S | S |

NA: No aplica

3.2.4 Determinación y validación del protocolo de acoplamiento molecular

- α -amilasa

La determinación de la ubicación y del tamaño de la rejilla o *grid* para el acoplamiento entre la estructura de la enzima α -amilasa pancreática porcina 1HX0 con los ligandos a estudiar, se basó en las coordenadas del ligando (pseudo-hexasacárido) con el que se presenta el reporte de 1HX0. La distancia entre los dos átomos más lejanos del ligando cristalizado fue de 17 Å. De acuerdo a esto, el centro de coordenadas de la rejilla se localizó espacialmente en las posiciones $x = 36.03$, $y = 19.95$, $z = 59.54$ y se determinó el tamaño de la rejilla en cada dimensión de 35.0 Å, es decir el doble del tamaño del ligando (pseudo-hexasacárido) ([figura 3.4](#)).

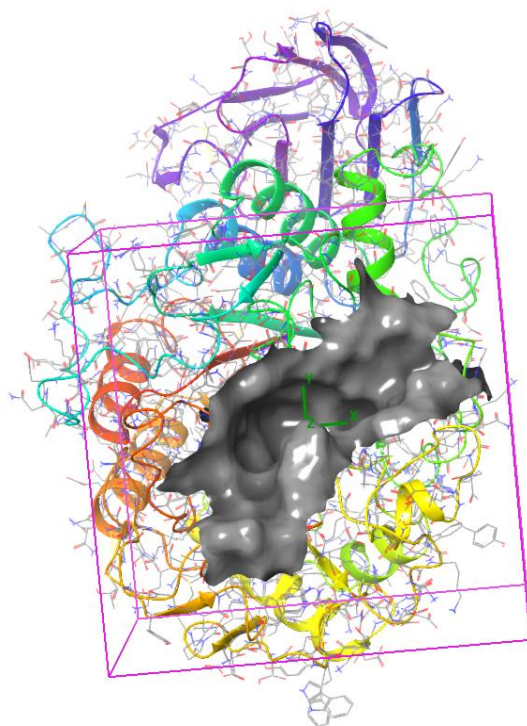


Figura 3.4: Representación gráfica de las coordenadas de la rejilla centrada en el ligando de la estructura 1HX0 visualizadas en MAESTRO 11.5¹².

El re-acoplamiento molecular entre la proteína rígida y la estructura co-cristalizada o “*re-docking*” se realizó empleando el software AutoDock Vina 1.1.2¹⁸. La superposición entre la conformación energéticamente más estable del ligando sometido a “*re-docking*” y la

conformación del ligando co-cristalizado, arrojó un RMSD de 8.198 Å. Este es valor alto, pero que se considera aceptable para un ligando de gran tamaño y con un gran número de enlaces rotatable como es el caso de pseudo-hexasacárido derivado de acarbosa co-cristalizado en la estructura 1HX0. El hecho de poseer un total de 32 enlaces rotatables se traduce a un mayor número de grados de libertad, que a su vez impacta en la exactitud del modelo; por otro lado, la remoción de moléculas de agua que generan puentes de hidrógeno entre los hidrógenos polares del ligando y el sitio activo también impacta sobre la reproducibilidad del reacoplamiento¹⁹. No obstante, con el objetivo de visualizar el impacto de cambios en las coordenadas y dimensiones de la rejilla sobre el RMSD (*Root Mean Square Deviation*), se realizó el “*re-docking*” partiendo de otras características de la rejilla, éstas se presentan en la [tabla 3.4](#). Estos resultados permitieron establecer que el conjunto de coordenadas y dimensión de la rejilla denominada como P3 produce el conformero que mejor asemeja la conformación del ligando co-cristalizado, por lo que, se seleccionaron estos parámetros para realizar el acoplamiento con otros compuestos.

Tabla 3.4: Parámetros de la rejilla empleada en el protocolo de validación del *docking* para la enzima α -amilasa. Las condiciones de P3 son las que mejor permiten reproducir las medidas experimentales. El ligando corresponde a pseudo-hexasacárido derivado de acarbosa.

| Código | Coordenada x | Coordenada y | Coordenada z | Tamaño (Å) | RMDS (Å) |
|-----------|--------------|--------------|--------------|------------|--------------|
| P1 | 36.03 | 19.95 | 59.54 | 35 | 8.198 |
| P2 | 32.02 | 14.86 | 52.54 | 35 | 13.0363 |
| P3 | 36.03 | 19.95 | 59.54 | 30 | 7.940 |
| P4 | 36.03 | 19.95 | 59.54 | 25 | 8.983 |

Como proceso de validación adicional se realizó el acoplamiento entre una estructura modelada del ligando con cambios en el ángulo diedro de algunos de los enlaces rotables. En la [figura 3.5a](#) se compara la conformación cambiada del pseudo-hexasacárido y la co-cristalizada en el sitio activo de la enzima del archivo 1HX0. El acoplamiento entre esta nueva conformación, y la estructura rígida de la proteína arrojó que el complejo entre ligando y proteína tiene una energía libre de -11.0 Kcal/mol. Al comparar la conformación de este acoplamiento con la

conformación del ligando co-cristalizado, se encontró que la mayoría de los ángulos diedros de los enlaces se conservan y las conformaciones superpuestas son similares, como se muestra en la [figura 3.5b](#). Todos esto muestra que el modelo permite predecir la interacción entre el ligando y el sitio activo de la enzima. Respecto a la energía obtenida, este valor fue menor al obtenido para el reacomplamiento (11.7 Kcal/mol), esta diferencia radica en que en el caso del reacomplamiento la conformación empleada en el proceso de *docking* es la co-cristalizada, por ello el software obtiene valores de energía para un complejo de mayor estabilidad. Todos estos resultados permiten inferir que el protocolo de acoplamiento o *docking* establecido, permite obtener resultados de alta exactitud para compuestos que puedan interactuar en el sitio activo de la enzima.

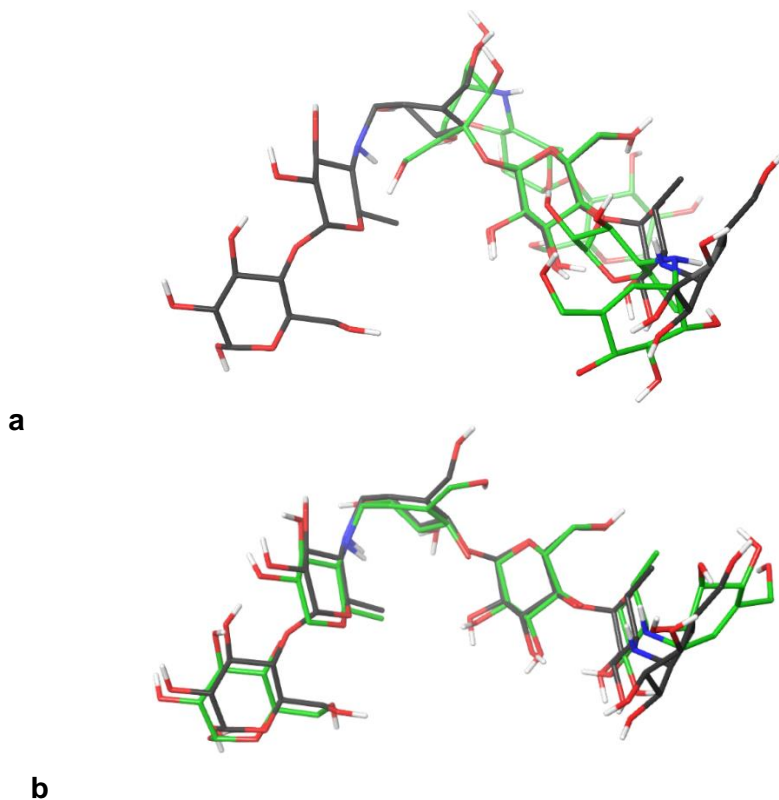


Figura 3.5: Superposición de la conformación del ligando pseudo-hexasacárido derivado de acarbosa co-cristalizado en el sitio activo de la enzima 1HX0 (estructura gris) y de otra conformación (estructura verde). **a)** Antes al proceso de acoplamiento, **b)** posterior al proceso de acoplamiento empleando los parámetros P3 descritos en la [tabla 3.4](#).

- **α -glucosidasa**

Para la validación del protocolo de acoplamiento frente a estructura de la enzima 2QMJ, se encontró que las coordenadas del ligando eran $x = -20.78$, $y = -6.7$, $z = -5.33$. El ligando co-cristalizado de esta estructura corresponde a la acarbosa, en la que los átomos más alejados se encuentran a una distancia de 15 Å. En la [figura 3.6](#) se presenta la ubicación de la rejilla con un tamaño de 30 Å en las tres direcciones de coordenadas.

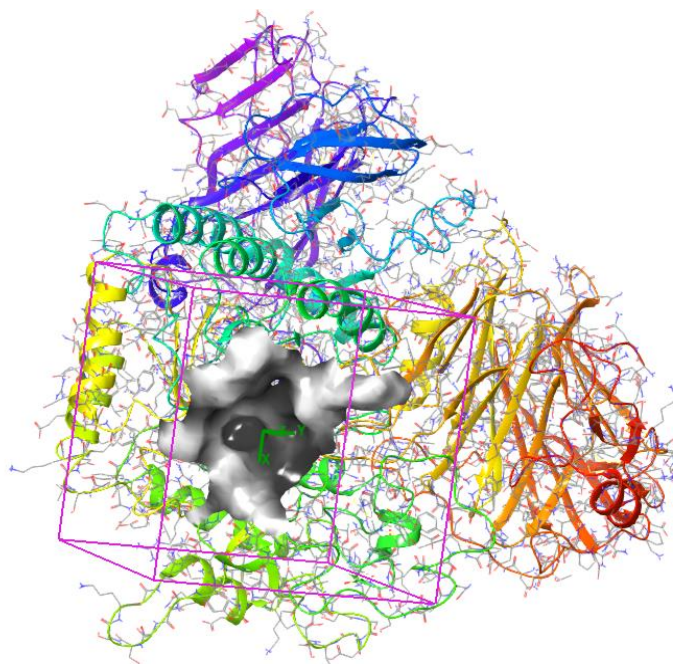


Figura 3.6: Representación gráfica de las coordenadas de la rejilla centrada en el ligando de la estructura 2QMJ visualizadas en MAESTRO 11.5¹².

De acuerdo con los datos recopilados en la [tabla 3.5](#), se encontró que el conjunto de coordenadas y tamaño de la rejilla denominado como “P2” reproduce de mejor forma la conformación del ligando co-cristalizado. Al igual que en el caso de los RMSD encontrados para el *pseudo*-hexasacárido co-cristalizado con la estructura de la amilasa 1HX0, se encontraron valores de RMSD altos para el *re-docking* de la acarbosa co-cristalizada en la estructura 2QMJ, esto se explica por el número de enlaces rotables (22) y por el hecho de no limitar la rotación de los enlaces establecidos como rotables por el software.

Tabla 3.5: Parámetros de la rejilla empleado en ensayos de validación del protocolo de *docking* para la enzima α -glucosidasa. Las condiciones de P2 son las que mejor permiten reproducir las medidas experimentales. El ligando corresponde a acarbosa.

| Código | Coordenada x | Coordenada y | Coordenada z | Tamaño (Å) | RMDS (Å) |
|-----------|---------------|--------------|--------------|------------|---------------|
| P1 | -20.78 | -6.7 | -5.33 | 30 | 7.6706 |
| P2 | -20.78 | -6.7 | -5.33 | 25 | 7.3770 |
| P3 | -20.78 | -6.7 | -5.33 | 35 | 17.0189 |
| P4 | -18.95 | -5.2 | -4.33 | 30 | 7.4858 |

Por otro lado, al realizar el estudio de acoplamiento entre una estructura de acarbosa en una conformación diferente a la presentada por la acarbosa co-cristalizada, se encontró que el protocolo definido predice el modo de unión entre el ligando y el sitio activo. Para el *re-docking* se encontró una energía de afinidad de -8.7 kcal/mol, mientras que en el caso del acoplamiento con la acarbosa en otra conformación una energía de afinidad de -8.1 kcal/mol. En la siguiente figura se presenta la conformación antes y después del proceso de acoplamiento realizado por el software Autodock Vina 1.1.2¹⁸. Es de resaltar, que la remoción de moléculas de agua del sitio activo impacta en la exactitud del modelo frente a la conformación co-cristalizada, ya que se ha determinado que ciertas moléculas de agua generan puentes de hidrógeno en el sitio activo que permiten la estabilización del ligando y los residuos de aminoácidos⁹. No obstante, para el presente trabajo se determinó que la exactitud del modelo es suficiente para predecir posibles modos de unión de los compuestos de interés, ya que aun así reproduce la ubicación y gran parte de la conformación de los anillos de la acarbosa.

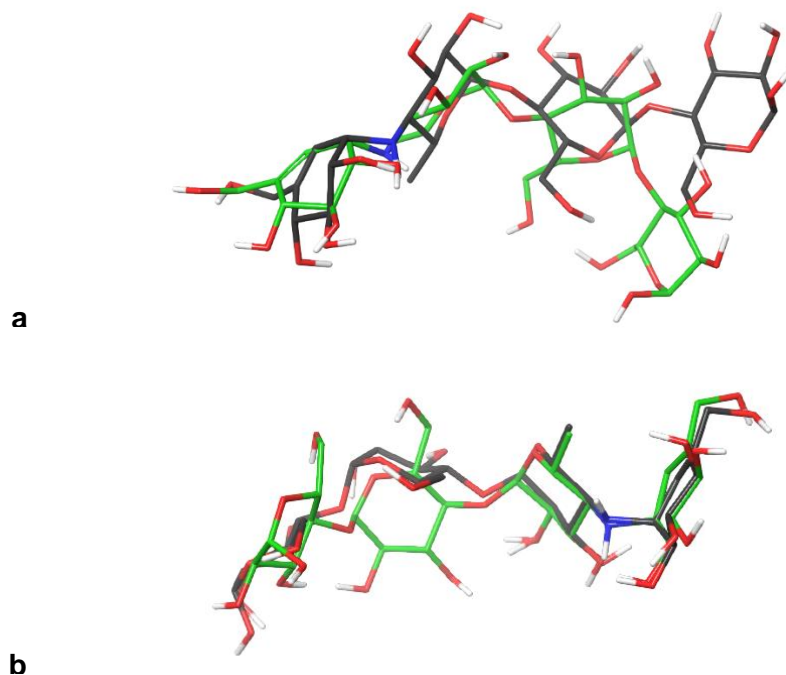


Figura 3.7: Superposición de la conformación del ligando acarbosa co-cristalizado en el sitio activo de la enzima 2QMJ (estructura gris) y de otra conformación (estructura verde). **a)** Antes al proceso de acoplamiento, **b)** posterior al proceso de acoplamiento empleando los parámetros P2 descritos en la [tabla 3.5](#).

3.2.5 Acoplamiento molecular y huellas digitales de interacción proteína-ligando (*Protein-ligand interaction fingerprint, PLIF*) entre los compuestos aislados de hojas de *Passiflora ligularis* Juss y las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa

En el capítulo 2 se había identificado por métodos metabolómicos a las saponinas y los polifenoles como los compuestos con posible actividad inhibitoria de las enzimas de las hojas de *Passiflora ligularis*; así mismo las señales para los derivados del ácido glutámico están entre las VIPs. Por esta razón se seleccionaron los compuestos listados en la tabla 3.2 para ser ensayados *in silico* en el presente trabajo. Entre estos compuestos se tienen flavonoides no glicosilados, flavonoides glicosilados tipo *O*-glicósidos, ésteres de malonato y acetato con

flavonoides *O-glicosilados* y los diferentes diastereoisómeros de las saponinas que no han sido elucidadas completamente (ver [sección 3.2.3](#)).

A) α -amilasa

El estudio de acoplamiento molecular realizado entre los compuestos de la [tabla 3.2](#) y la estructura rígida de la enzima α -amilasa pancreática porcina 1HX0, permitió identificar que bajo las condiciones modeladas todos los compuestos interactúan en el sitio activo de la proteína, y los complejos allí formados serían energéticamente viables. Para comparar estos resultados se usaron como control positivo tres inhibidores de la enzima previamente reportados: uno de uso clínico (acarbosa), los productos naturales sinigrina¹⁴ y el compuesto polifenólico **32.**, el cual corresponde a un *C*-flavonoide identificado de hojas de *P. bogotensis* con un IC_{50} en glucosidasa de *Saccharomyces cereviceae* 10 veces menor a acarbosa¹³.

Adicionalmente se realizó un proceso de “normalización” de las energías obtenidas mediante el software AutoDock Vina 1.2.1¹⁸, al determinar la eficiencia del ligando, parámetro que relaciona la energía de afinidad con el número de átomos pesados del ligando²⁰. Este parámetro puede ser calculado a nivel experimental mediante la determinación de la K_i del ligando o a nivel teórico empleando el valor de energía de afinidad calculado, esta aproximación permite realizar comparaciones de la potencia de una sustancia cuando se dispone de los datos experimentales o en el *screening* virtuales para diferenciar ligandos con valores de energía de afinidad cercanos²¹; en el presente caso se emplea con este último fin. Aunque los valores de eficiencia de ligando son útiles en el proceso de clasificación de ligando como posibles inhibidores, se deben tener en cuenta otros criterios como lo es el perfil de interacciones que presenta, ya que los modos de unión calculados entre los ligandos y la proteína podrían no involucrar aminoácidos claves en la catálisis enzimática, como la triada catalítica o los aminoácidos que estabilizan el sustrato. De acuerdo a lo anterior, en el presente trabajo se seleccionaron estos dos criterios en conjunto para la clasificación de los diferentes ligandos identificados en hojas de *P. ligularis*.

De esta forma, mediante los valores recopilados en la [tabla 3.6](#) se identificó que todos los compuestos de naturaleza polifenólica poseen una eficiencia del ligando teórica superior al pseudo-hexasacárido derivado de acarbosa (-0.18Kcal*átomo/mol), mientras que las saponinas poseen valores cercanos o igualer a éste, más no superiores. De igual forma, al

comparar con la eficiencia calculada para el compuesto **32** (-0.20 Kcal*átomo/mol) con los compuestos identificados en *P. ligularis* se encontró la misma tendencia. Por otra parte, sólo los flavonoides no glicosilados presentan una eficiencia cercana a la sinigrina (-0.25 Kcal*átomo/mol). Respecto a los aminoácidos **2** y **3**, presentan los mejores valores de eficiencia, debido a su bajo peso molecular; a pesar de esto, los modos de unión calculados muestran que solo interactúan con un par de aminoácidos del sitio activo, por lo que se considera su interacción como insignificante al momento de inhibir la actividad enzimática.

Tabla 3.6: Datos del acoplamiento molecular y análisis de similitud de interacción ligando-proteína entre la α -amilasa pancreática porcina 1HX0 y los ligandos identificados en hojas de *P. ligularis*, *pseudo*-hexasacárido derivado de acarbosa, sinigrina y compuesto **32**.

| Compuesto | Tipo de compuesto | Energía de afinidad (kcal/mol) | Número de átomos pesados | Eficiencia del ligando (kcal*átomo pesado/mol) | Residuos de aminoácidos de contacto a 4 Å | Aminoácidos involucrados en puentes de hidrógeno | Coefficiente de tanimoto respecto ligando co-cristalizado | Coefficiente de tanimoto respecto a sinigrina | Coefficiente de tanimoto respecto a compuesto 32 |
|--|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------|--|---|--|---|---|--|
| <i>Pseudo</i> -hexasacárido derivado de acarbosa (ligando co-cristalizado) | <i>Pseudo</i> -hexasacárido | -11.7 | 65 | -0.18 | Trp59, Try62, Gln63, Val163, Gly164, Leu165, Arg195, Asp197, Ala198, Lys200, His201, Glu233, Glu240, His299, Asp300, His305 | Trp59, Gln63, Val163, Gly164, Leu165, Arg195, Ala198, Lys200, His201, Glu233, Glu240, His299, Asp300, His305 | NA | 0.444 | 0.369 |
| Sinigrina | glucosinolato | -5.6 | 22 | -0.25 | Val163, Leu165, Asp197, His305 | Asp197 | 0.444 | NA | 0.596 |
| 2 | Aminoácido | -4.4 | 9 | -0.48 | Asp197 | Asp197 | 0.031 | 0.054 | 0.043 |
| 3 | Aminoácido | -4.7 | 10 | -0.47 | Ser105, Gln161 | Ser105 | 0.027 | 0 | 0 |
| 14 | Flavonoide no glicosilado | -8.9 | 19 | -0.46 | Trp59, Tyr62, Gln63, Val163 | Gln63 | 0.346 | 0.692 | 0.512 |
| 15.1 | Saponina | -10.6 | 60 | -0.18 | Trp59, Gln63, Ala107, Tyr151, Leu162, Val163, Arg195, Ala198, Lys200, His201, Glu233, Ile235, Asp300, His306 | Tyr151, Arg195, Glu233, Asp300 | 0.698 | 0.520 | 0.353 |
| 15.2 | Saponina | -9.8 | 60 | -0.16 | Asn53, Trp59, Gly106, Ala107, Ala108, Tyr151, Leu162, Val163, Leu165, Asp197, Lys200, His201, Ile235, His305 | Gly106, Tyr151, Asp197 | 0.643 | 0.500 | 0.360 |
| 16 | Flavonoide no glicosilado | -9.0 | 21 | -0.43 | Trp59, Tyr62, Val163, Asp197 | Asp197 | 0.346 | 0.692 | 0.694 |
| 17 | Flavonoide <i>O</i> -glicosilado | -8.7 | 32 | -0.26 | Trp59, Gln63, Val163, Arg195, Asp197, Asp300, Gly306 | Gln63, Arg195, Asp197, Asp300 | 0.519 | 0.750 | 0.500 |

| Compuesto | Tipo de compuesto | Energía de afinidad (kcal/mol) | Número de átomos pesados | Eficiencia del ligando (kcal*átomo pesado/mol) | Residuos de aminoácidos de contacto a 4 Å | Aminoácidos involucrados en puentes de hidrógeno | Coefficiente de tanimoto respecto ligando co-cristalizado | Coefficiente de tanimoto respecto a sinigrina | Coefficiente de tanimoto respecto a compuesto 32 |
|-----------|--|--------------------------------|--------------------------|--|---|--|---|---|--|
| 17a | Flavonoide <i>O-glicosilado</i> | -9.7 | 31 | -0.31 | Trp59, Tyr62, Gln63, Val163, Asp197, His306, Asp356 | Gln63, Asp197, Asp356 | 0.346 | 0.579 | 0.788 |
| 18 | Flavonoide <i>O-glicosilado esterificado con malonato</i> | -9.1 | 39 | -0.23 | Trp59, Val163, Arg195, Lys200, Val234, Ile235, Asp300, Gly306 | Arg195, Val234 | 0.571 | 0.632 | 0.430 |
| 19 | Flavonoide <i>O-glicosilado</i> | -8.2 | 32 | -0.26 | Try62, Try151, Leu162, Val163, Arg195, Ala198, Lys200, Glu233, Asp300 | Arg195, Lys200, Glu233 | 0.630 | 0.421 | 0.383 |
| 19a | Flavonoide <i>O-glicosilado</i> | -9.9 | 31 | -0.32 | Trp59, Try62, Gln63, Ser105, Val163, Leu165, Asp197, His305 | Ser105, Asp197 | 0.496 | 0.468 | 0.492 |
| 20 | Flavonoide <i>O-glicosilado</i> | -8.2 | 34 | -0.24 | Trp59, Gln63, Val163, Asp197, Glu233, Gly306 | Trp59, Gln63, Asp197, Glu233, | 0.414 | 0.525 | 0.368 |
| 21 | Flavonoide <i>O-glicosilado esterificado con malonato</i> | -9.0 | 38 | -0.24 | Gln63, Tyr151, Leu162, Val163, Lys200, His201, Ile235, Asp300, H305 | Gln63 | 0.630 | 0.722 | 0.493 |
| 22 | Flavonoide <i>O-glicosilado esterificado con malonato</i> | -8.6 | 40 | -0.22 | Trp59, Try151, Leu162, Val163, Lys200, His201, Glu233, Ile235, Asp300, His305 | Glu233, Ile235, Asp300 | 0.429 | 0.421 | 0.250 |
| 25 | Flavonoide <i>O-glicosilado</i> | -9.6 | 30 | -0.32 | Trp59, Leu162, Val163, His201, H299, Asp300, Gly306 | His201 | 0.481 | 0.500 | 0.366 |
| 26 | Flavonoide no glicosilado | -9.0 | 20 | -0.45 | Trp59, Tyr62, Gln63, Val163, Arg195, Asp197 | Asp197 | 0.385 | 0.769 | 0.750 |
| 27 | Flavonoide no glicosilado | -8.9 | 21 | -0.42 | Trp59, Tyr62, Gln63, Val163 | Gln63 | 0.385 | 0.769 | 0.787 |
| 28 | Flavonoide <i>O-glicosilado esterificado con acetato</i> | -9.6 | 33 | -0.29 | Trp59, Tyr62, Gln63, Gly106, Ala107, Val163, Gly164, His305 | Gln63, Gly164 | 0.483 | 0.429 | 0.431 |

| Compuesto | Tipo de compuesto | Energía de afinidad (kcal/mol) | Número de átomos pesados | Eficiencia del ligando (kcal*átomo pesado/mol) | Residuos de aminoácidos de contacto a 4 Å | Aminoácidos involucrados en puentes de hidrógeno | Coefficiente de tanimoto respecto ligando co-cristalizado | Coefficiente de tanimoto respecto a sinigrina | Coefficiente de tanimoto respecto a compuesto 32 |
|-----------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------|--|--|--|---|---|--|
| 29.1 | Saponina | -9.2 | 59 | -0.16 | Pro54, Trp59, Asp197, Asp300, His305, Gly306, Val354, Trp357 | Asp197, Asp300, Trp357 | 0.385 | 0.429 | 0.355 |
| 29.2 | Saponina | -10.3 | 59 | -0.17 | Trp58, Trp59, Tyr151, Leu162, Val163, Leu165, Lys200, His201, His305 | Try151, Lys200 | 0.586 | 0.500 | 0.360 |
| 30.1 | Saponina | -10.3 | 60 | -0.17 | Trp58, Trp59, Tyr151, Leu162, Val163, Lys200, His201, Ile235, His305 | Lys200 | 0.586 | 0.500 | 0.360 |
| 30.2 | Saponina | -10.2 | 60 | -0.17 | Trp58, Trp59, Tyr151, Leu162, Val163, Leu165, Lys200, His201, Glu233, His305 | Tyr151, Glu233 | 0.607 | 0.524 | 0.360 |
| 31.1 | Saponina | -10.5 | 60 | -0.18 | Trp58, Trp59, Tyr62, Tyr151, Leu162, Val163, Lys200, His201, Glu233, Ile235, Glu240, His305 | Try151, Lys200 | 0.586 | 0.500 | 0.360 |
| 31.2 | Saponina | -10.3 | 60 | -0.17 | Trp58, Trp59, Tyr151, Leu162, Val163, Leu265, Lys200, His201, Glu233, Ile235, Glu240, His305, Gly306 | Try151, Lys200 | 0.586 | 0.524 | 0.369 |
| 32 | Flavonoide C-glicosilado | -9.2 | 45 | -0.20 | Trp59, Tyr62, Gln63, Val163, Arg195, Asp197 | Gln63, Asp197 | 0.369 | 0.596 | NA |

Los resultados del acoplamiento entre la estructura de la proteína rígida y los ligandos flexibles, muestran que la mayoría de los compuestos estudiados interactúan con los aminoácidos del sitio activo de la enzima, inclusive con uno o dos aminoácidos de la triada catalítica descrita por Quian *et al.*; sin embargo, para que esta interacción sea considerada como relevante debe ser mediante puentes de hidrógeno. Esta tríada está compuesta por los residuos Asp197, Glu233 y Asp300⁵; los cuales participan en el mecanismo de reacción a través de un ataque nucleofílico al enlace glicosídico y una catálisis ácido base. De igual forma, se identificaron aminoácidos necesarios para generar interacciones de menor magnitud, necesarias para la estabilización y reconocimiento del sustrato, como interacciones hidrofóbicas con los residuos de aminoácidos apolares Val162, Leu165; interacciones tipo π - π *stacking* con el residuo Tyr151; estas interacciones se presentan con la cadena carbonada de los carbohidratos a hidrolizar⁵. En cuanto a las interacciones entre el ligando co-cristalizado se encontró que presenta puentes de hidrógeno con los tres aminoácidos de la triada catalítica, y por su tamaño posee interacciones de menor magnitud con los residuos de aminoácidos anteriormente mencionados. La [figura 3.8](#) representa gráficamente la unión entre algunos ligandos y el sitio activo de la enzima.

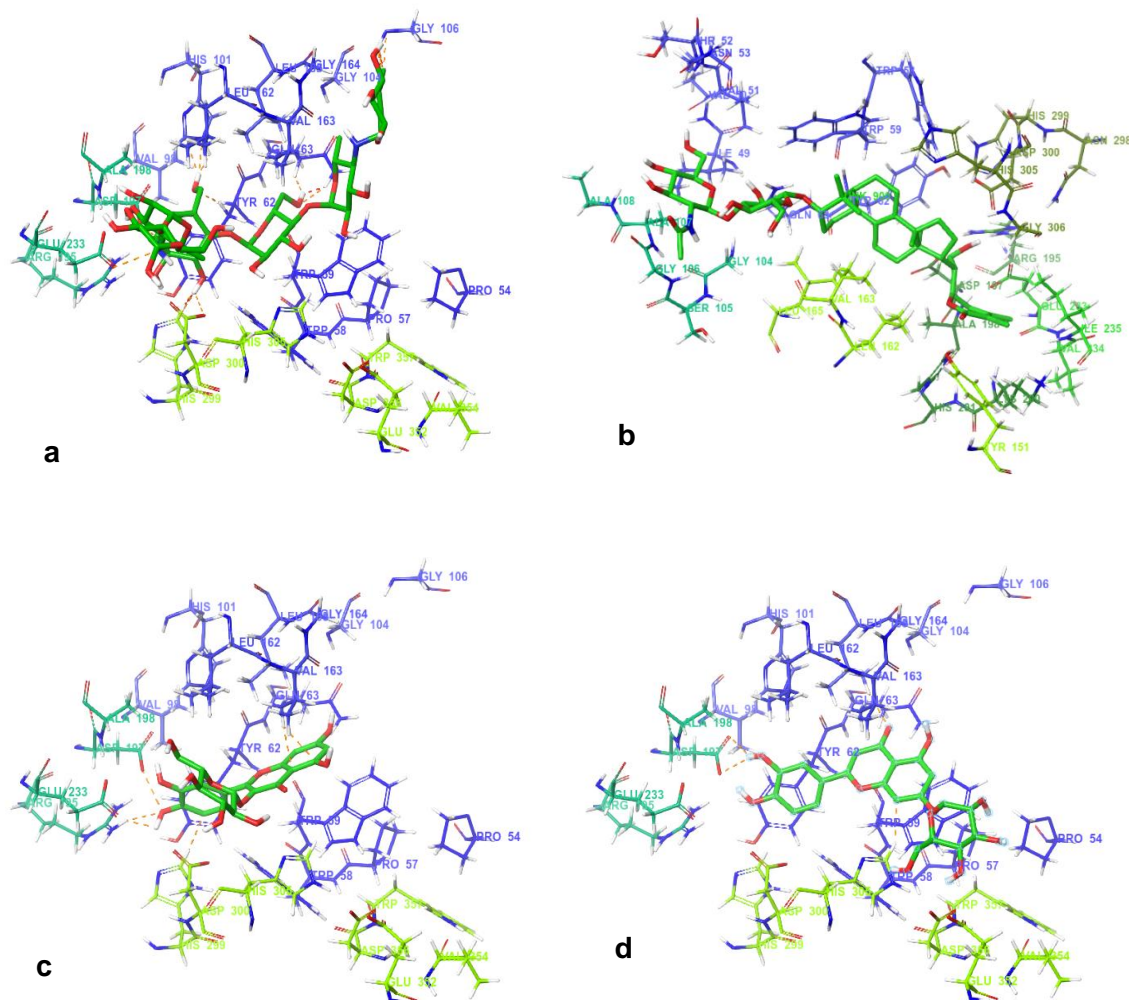


Figura 3.8: Representación gráfica del sitio de unión de los ligandos **a)** *pseudo*-hexasacárido derivado de acarbosa, **b)** compuesto ligularósido C **15.1**, **c)** compuesto quercetina-3-*O*-glucósido **17** y **d)** compuesto luteolina-7-*O*-glucósido **17a**, en la estructura de la α -amilasa pancreática porcina, mostrando los aminoácidos de contacto (a 4 Å). Se observan interacciones de puentes de hidrógenos (línea punteada naranja) con aminoácidos claves en la catálisis de hidrólisis y estabilización del sustrato.

La comparación de los perfiles o patrones de interacción generados entre inhibidores y el sitio activo de la enzima, respecto a las interacciones generadas por los compuestos, se esquematiza en la matriz de interacciones de la [figura 3.9](#). En esta se observa un patrón de coloración de acuerdo con la presencia de una interacción entre el residuo de aminoácido y el ligando, es así como se genera un “*fingerprint*” de interacciones característico de cada ligando. De esta forma se identificó que la mayoría de los compuestos presentan una interacción con el aminoácido Asp197, más no con el aminoácido Glu233; aunque cabe mencionar que esta interacción no siempre fue de tipo puente de hidrógeno. Pese a que la matriz de interacciones evidencia una alta similitud entre las interacciones de inhibidores usados como control positivo y compuestos, su limitación radica en clasificar correctamente el grado de similitud entre estos, por lo tanto se empleó el coeficiente de tanimoto para este fin¹². Este coeficiente considera a las interacciones entre un compuesto y la proteína como un conjunto, de forma que para comparar numéricamente los perfiles de interacción de los inhibidores y los compuestos de estudio, se realiza un cálculo que relaciona el número de elementos similares entre los dos conjuntos respecto al número de elementos diferentes¹².

De forma puntual, el análisis de interacciones arrojó que los compuestos de mayor tamaño, como las saponinas y algunos flavonoides glicosilados con ésteres del ácido malónico, presentan un patrón de interacción modelado de mayor similitud al derivado *pseudo*-hexasacárido de acarbose; es más algunos de los diastereoisómeros de las saponinas **15**, **30**, y **31**; y el compuesto kaempferol 3-*O*-(6''-malonil)-glucósido (**21**) poseen los coeficientes de tanimoto más altos. Respecto al patrón de interacción de la sinigrina se observó que los compuestos polifenólicos de menor tamaño presentaron mayor similitud con este patrón positivo, tal es el caso de flavonoides no glicosilados como el **14**, **16**, **26** y **27**. Finalmente, los compuestos con mayor similitud en la interacción respecto al compuesto **32** según los datos de la [tabla 3.6](#), un flavonoide *C*-glicosidado, fueron los compuestos **16**, **17a**, **26** y **27**, tres de los cuales corresponden a flavonoides no glicosilados. Por otra parte, los aminoácidos **2** y **3** no presentaron similitud con los patrones de interacción de los inhibidores de referencia, además de presentar valores de energía de afinidad bajo. Lo anterior indicaría que a pesar de que se pueda presentar algún tipo de interacción con residuos del sitio activo no serían interacciones considerables para generar la inhibición en la actividad enzimática.

En relación con cambios en el perfil de interacciones entre flavonoides de un mismo núcleo estructural se encontró que la glicosilación aumenta el número de interacciones favorables entre los aminoácidos del sitio activo y el compuesto, puesto que al comparar el perfil de interacciones de un flavonoide no glicosilado como el kaemferol (**27**) con el perfil del kaempferol-3-*O*-glucósido, se encontró que este último presenta interacciones de mayor magnitud tipo puente de hidrógeno con el aminoácido Glu233, perteneciente a la triada catalítica. Además de interactuar con otros aminoácidos claves en el reconocimiento del ligando como la Tyr52, Tyr151⁷; esta tendencia también fue presentada en el caso de la apigenina (**26**) y la apigenina-7-*O*-glucósido. Por otra parte, la esterificación con malonato de los flavonoides *O*-glucósido impacta en el perfil de interacciones calculado, como en el caso del compuesto **18** quercetin-3-*O*-(6"-malonil)glucósido, en donde no se encuentran interacción con los aminoácidos de la triada catalítica a diferencia del compuesto **17** quercetin-3-*O*-glucósido; esto se puede explicar por la repulsión de cargas que tendría el grupo carboxilo del malonato con las cargas negativas de los aminoácidos ácidos que conforman la triada catalítica.

En cuanto a las saponinas resalta el comportamiento observado por los diastereoisómeros del ligularósido C (compuesto **15**), en el cual el cambio en la configuración absoluta del carbono 22 impacta significativamente en la eficiencia del ligando y el perfil de interacciones calculado. En este caso, se determinó que el diastereoisómero con configuración absoluta RR en las posiciones 20 y 22, presenta tanto una mejor eficiencia de ligando e interactúa más parecido al pseudo-hexasacárido; además presenta dos puentes de hidrógeno con los aminoácidos Glu233 y Asp300. Lo anterior está relacionado con la disposición de la cadena lateral de la saponina, ya que es el hidroxilo y el carbonilo presente en esta parte del compuesto los que generan los puentes de hidrógeno, como se observa en la [figura 3.8b](#).

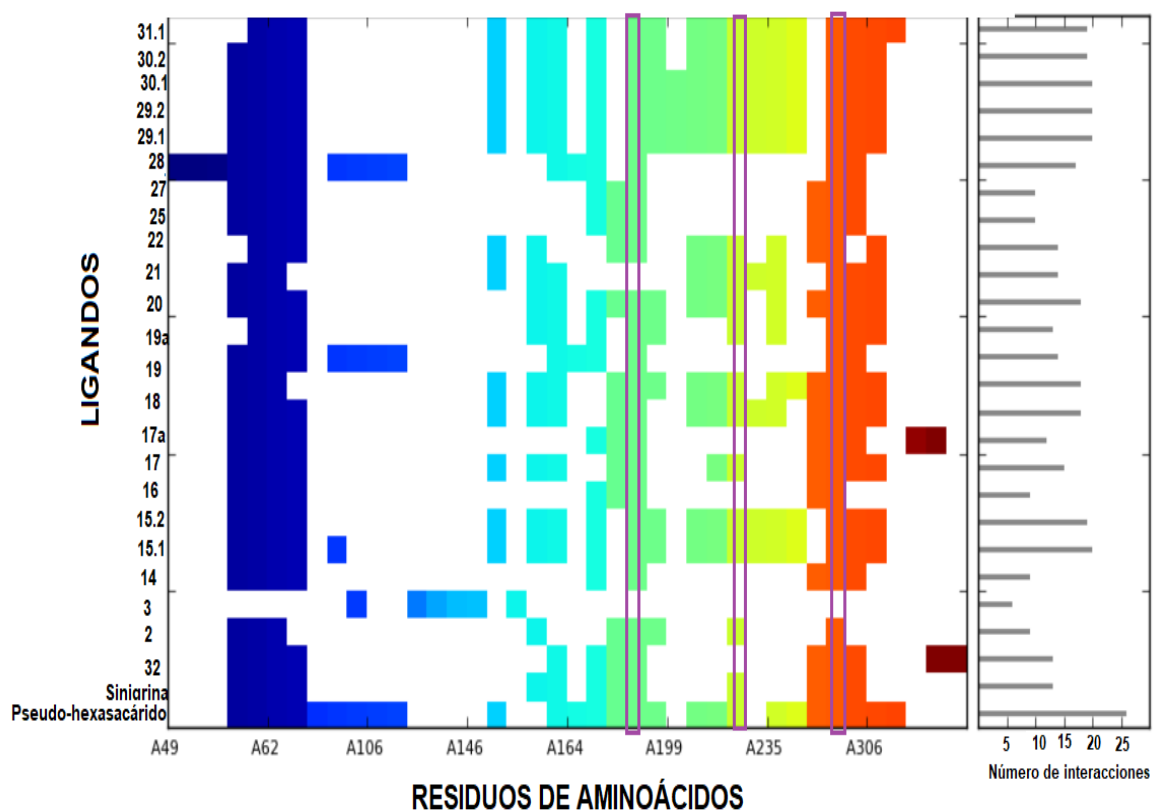


Figura 3.9: Matriz de interacciones entre la α -amilasa pancreática porcina estructura 1HX0 y los ligandos estudiados, incluyendo los controles positivos sinigrina y *pseudo*-hexasacárido derivado de acarbosa. En el eje horizontal se encuentra la posición del aminoácido y en el eje vertical los ligandos, se enmarcan los aminoácidos de la triada catalítica. La coloración indica que se encontró algún tipo de interacción entre el aminoácido y el ligando; y varía de acuerdo a la posición del aminoácido en la proteína. En el recuadro en la parte derecha del gráfico se esquematiza el conteo de interacciones del ligando con los residuos de aminoácidos.

Como resultado de la integración de los datos de eficiencia de ligando, y los perfiles de interacción, se seleccionaron al ligularósido C (diastereoisómero **15.1**), la quercetina-3-*O*-glucósido (**17**), la luteolina-7-*O*-glucósido (**17a**), el kaempferol-3-*O*-glucósido (**19**) y a la apigenina-7-*O*-glucósido (**19a**); como los compuestos con mayor potencial como inhibidores de la α -amilasa pancreática porcina. Esto se debe a que en este modelo computacional poseen valores de eficiencia de ligando iguales o superiores al pseudo-hexasacárido derivado de acarbosa, también generan interacciones de tipo puente de hidrógeno con uno o más

aminoácidos de la triada catalítica, interactúan con otros aminoácidos claves del sitio activo, y finalmente poseen perfiles de interacciones muy similares a los inhibidores empleados como comparación. Este hallazgo se contrasta en la sección 3.2.6, en donde se integran estos resultados con la evaluación de la actividad biológica en los modelos *in vitro* correspondientes.

B) Estudios con la enzima α -glucosidasa

En el caso de los estudios de acoplamiento entre la estructura rígida de la subunidad *N*-terminal de la glucomaltasa intestinal humana 2QMJ, se evidenció que tanto los compuestos polifenólicos como las saponinas presentan interacciones con el sitio activo de la enzima, de acuerdo con el modelo planteado (ver [tabla 3.7](#)). Los compuestos polifenólicos son los que presentan una mayor eficiencia de ligando, superior a la presentada por la acarbosa (-0.17Kcal*átomo/mol); mientras que las saponinas con sus correspondientes diastereoisómeros presentaron valores inferiores. Para esta enzima la triada catalítica corresponde a los residuos Asp203, Asp327, y Asp443⁹, y se observó que la mayoría de los ligandos estudiados interactúan con los aminoácidos de la triada catalítica, aunque también lo hacen con otros aminoácidos polares del sitio activo mediante interacciones de puentes de hidrógeno. De igual forma, los ligandos presentaron interacciones con residuos de aminoácidos claves para la estabilización de los ligandos, como la Tyr299, Arg526, Asp542, y His600, entre otros⁹. También se encontró la tendencia que presentaron los compuestos con altos valores de eficiencia de ligando en el caso de la α -amilasa, los cuales a pesar de poseer poseen una alta eficiencia no interactúan con aminoácidos ni de la triada catalítica, ni con otros responsables del reconocimiento y estabilización del ligando; en este grupo se encuentra los aminoácidos ácido glutámico (2), glutamina (3) y los compuestos polifenólicos, crisina (14), catequina (16) y apigenina (26).

Algunas de estas interacciones se representan gráficamente en la [figura 3.10](#), evidenciándose que algunos compuestos tienen una gran similitud en su interacción con el sitio activo al compararla con la presentada por la acarbosa, como el caso de los flavonoides glicosilados esterificados con malonato, quercetin-3-*O*-(6''malonil)glucósido (**18**) e isoramnetin-3-*O*-(6''malonil)glucósido (**22**). Los valores de energía de afinidad, eficiencia de ligando, e interacciones a menos de 4 Å, se recopilan en la [tabla 3.7](#).

Tabla 3.7: Datos del acoplamiento molecular y análisis de similitud de interacción ligando-proteína entre la subunidad *N*-terminal de la glucomaltasa humana 2QMJ y los ligandos identificados en hojas de *P. ligularis*, sinigrina, acarbosa y compuesto 32.

| Compuesto | Tipo de compuesto | Energía de afinidad (kcal/mol) | Número de átomos pesados | Eficiencia del ligando (kcal*átomo pesado/mol) | Residuos de aminoácidos de contacto a 4 Å | Aminoácidos involucrados en puentes de hidrógeno | Coefficiente de tanimoto respecto ligando co-cristalizado | Coefficiente de tanimoto respecto a sinigrina | Coefficiente de tanimoto respecto a compuesto 32 |
|-------------|--|--------------------------------|--------------------------|--|--|--|---|---|--|
| Acarbosa | Pseudo-tetrasacárido | -7.5 | 44 | -0.17 | Asp203, Thr205, Tyr299, Asp327, Trp406, Met444, Arg526, Asp542, Phe575, His600 | Asp203, Asp327, Met444, Arg526, Asp542, His600 | NA | 0.450 | 0.530 |
| Sinigrina | glucosinolato | -5.9 | 18 | -0.27 | Tyr299, Asp327, Trp406, Asp443, Arg526, Asp542, His605 | Asp327, Asp443, Arg526 | 0.450 | NA | 0.542 |
| 2 | Aminoácido | -2.3 | 9 | -0.26 | Asp542 | Asp542 | 0 | 0.021 | 0.012 |
| 3 | Aminoácido | -2.0 | 10 | -0.20 | Gln603 | Gln603 | 0 | 0.013 | 0.010 |
| 14 | Flavonoide no glicosilado | -7.3 | 19 | -0.38 | Tyr299, Trp406, Met444, Asp542, Phe575 | Met444 | 0.350 | 0.818 | 0.391 |
| 15.1 | Saponina | -8.1 | 60 | -0.14 | Asp203, Asn207, Asn209, Asp327, Asp443, Met444, Lys480, Arg526, Asp542, Gln603 | Asp203, Asn207, Asn209, Asp327, Asp443, Lys480, Arg526, Asp542, Gln603 | 0.500 | 0.611 | 0.477 |
| 15.2 | Saponina | -7.8 | 60 | -0.13 | Thr204, Thr205, Asn207, Tyr299, Trp406, Trp441, Arg526, Asp542, Phe575, His600 | Thr205, Asn207, Arg526, Asp542 | 0.636 | 0.450 | 0.368 |
| 16 | Flavonoide no glicosilado | -7.4 | 21 | -0.35 | Tyr299, Asp327, Trp406, Arg526, Asp542, Gln603 | Arg526, Asp542 | 0.400 | 0.909 | 0.464 |
| 17 | Flavonoide <i>O</i> -glicosilado | -7.9 | 32 | -0.24 | Tyr299, Asp327, Trp406, Arg526, Asp542, Phe575, Gln603 | Arg526, Gln603 | 0.500 | 0.769 | 0.543 |
| 17a | Flavonoide <i>O</i> -glicosilado | -8.2 | 31 | -0.23 | Arg202, Asp203, Tyr299, Asp327, Trp406, Arg526, Asp542, Phe575 | Arg202, Arg526, Asp542 | 0.524 | 0.452 | 0.382 |
| 18 | Flavonoide <i>O</i> -glicosilado esterificado con malonato | -7.6 | 39 | -0.19 | Asp203, Thr205, Try299, Asp327, Trp406, Arg526, Asp542, Phe575, His600, Try605 | Asp203, Thr205, Asp327, Arg526, Tyr605 | 0.650 | 0.625 | 0.573 |

| Compuesto | Tipo de compuesto | Energía de afinidad (kcal/mol) | Número de átomos pesados | Eficiencia del ligando (kcal*átomo pesado/mol) | Residuos de aminoácidos de contacto a 4 Å | Aminoácidos involucrados en puentes de hidrógeno | Coficiente de tanimoto respecto ligando co-cristalizado | Coficiente de tanimoto respecto a sinigrina | Coficiente de tanimoto respecto a compuesto 32 |
|-----------|---|--------------------------------|--------------------------|--|--|--|---|---|--|
| 19 | Flavonoide <i>O</i> -glicosilado | -7.8 | 32 | -0.24 | Thr205, Tyr299, Asp327, Trp406, Arg526, Asp542, Phe575, Gln603 | Thr205, Arg526, Asp542 | 0.524 | 0.611 | 0.569 |
| 19a | Flavonoide <i>O</i> -glicosilado | -8.0 | 31 | -0.26 | Arg202, Asp203, Thr205, Asp327, Asp443 | Asp203, Thr205, Asp327, Asp443 | 0.469 | 0.406 | 0.444 |
| 20 | Flavonoide <i>O</i> -glicosilado | -7.0 | 34 | -0.21 | Tyr299, Asp327, Trp406, Arg526, Asp542, Phe575 | Arg526 | 0.473 | 0.851 | 0.407 |
| 21 | Flavonoide <i>O</i> -glicosilado esterificado con malonato | -8.1 | 38 | -0.21 | Arg202, Thr205, Tyr299, Trp406, Asp443, Asp542, Phe575 | Thr205, Asp443, Asp542 | 0.364 | 0.643 | 0.542 |
| 22 | Flavonoide <i>O</i> -glicosilado esterificado con malonato | -7.7 | 40 | -0.19 | Asp203, Tyr299, Asp327, Asp443, Arg526, Asp542 | Asp203, Asp327, Asp443, Arg526 | 0.636 | 0.611 | 0.378 |
| 25 | Flavonoide <i>O</i> -glicosilado | -8.4 | 30 | -0.28 | Asp203, Thr204, Thr205, Trp406, Asp443, Asp542 | Asp542 | 0.450 | 0.467 | 0.354 |
| 26 | Flavonoide no glicosilado | -7.5 | 20 | -0.38 | Tyr299, Asp327, Trp406, Asp542, Phe575, Gln603 | Arg526, Asp542, Gln203 | 0.400 | 0.909 | 0.372 |
| 27 | Flavonoide no glicosilado | -7.3 | 21 | -0.35 | Tyr299, Trp406, Asp443, Arg526, Asp542, Phe575, Gln603 | Asp443 | 0.400 | 0.909 | 0.392 |
| 28 | Flavonoide <i>O</i> -glicosilado esterificado con acetato | -8.2 | 33 | -0.25 | Thr205, Tyr299, Trp406, Asp542, Ph575 | Thr205 | 0.579 | 0.533 | 0.457 |
| 29.1 | Saponina | -7.8 | 59 | -0.13 | Thr205, Phe450, Leu473, Lys480, Thr544 | Thr205, Thr544 | 0.250 | 0.095 | 0.341 |
| 29.2 | Saponina | -7.8 | 59 | -0.13 | Tyr299, Trp406, Trp441, Met444, Asp474, Lys480, Arg526, Asp542, Phe575, His600 | Asp474, Lys480, Arg526 | 0.478 | 0.421 | 0.329 |
| 30.1 | Saponina | -7.9 | 60 | -0.13 | Asn207, Trp206, Phe450, Thr544, Asp549, Phe575, Ala576 | Asn204, Thr544, Asp549 | 0.280 | 0.190 | 0.345 |
| 30.2 | Saponina | -7.8 | 60 | -0.13 | Tyr299, Ile328, Ile364, Trp406, Trp441, Met444, | Asp452, Lys480 | 0.565 | 0.381 | 0.411 |

| Compuesto | Tipo de compuesto | Energía de afinidad (kcal/mol) | Número de átomos pesados | Eficiencia del ligando (kcal*átomo pesado/mol) | Residuos de aminoácidos de contacto a 4 Å | Aminoácidos involucrados en puentes de hidrógeno | Coefficiente de tanimoto respecto ligando co-cristalizado | Coefficiente de tanimoto respecto a sinigrina | Coefficiente de tanimoto respecto a compuesto 32 |
|-----------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------|--|--|--|---|---|--|
| | | | | | Asp452, Lys480, Phe575, His600 | | | | |
| 31.1 | Saponina | -7.8 | 60 | -0.13 | Arg202, Tyr299, Asp327, Ile364, Trp406, Trp441, Asp474, Trp539, Phe575, His600 | Arg202, Asp474 | 0.583 | 0.348 | 0.388 |
| 31.2 | Saponina | -7.7 | 60 | -0.12 | Asp203, Thr205, Phe450, Lys480 | Thr205 | 0.148 | 0.091 | 0.215 |
| 32 | Flavonoide C-glicosilado | -8.4 | 45 | -0.19 | Asp327, Lys480, Arg526, Asp542, Ala576 | Arg526 | 0.530 | 0.542 | NA |

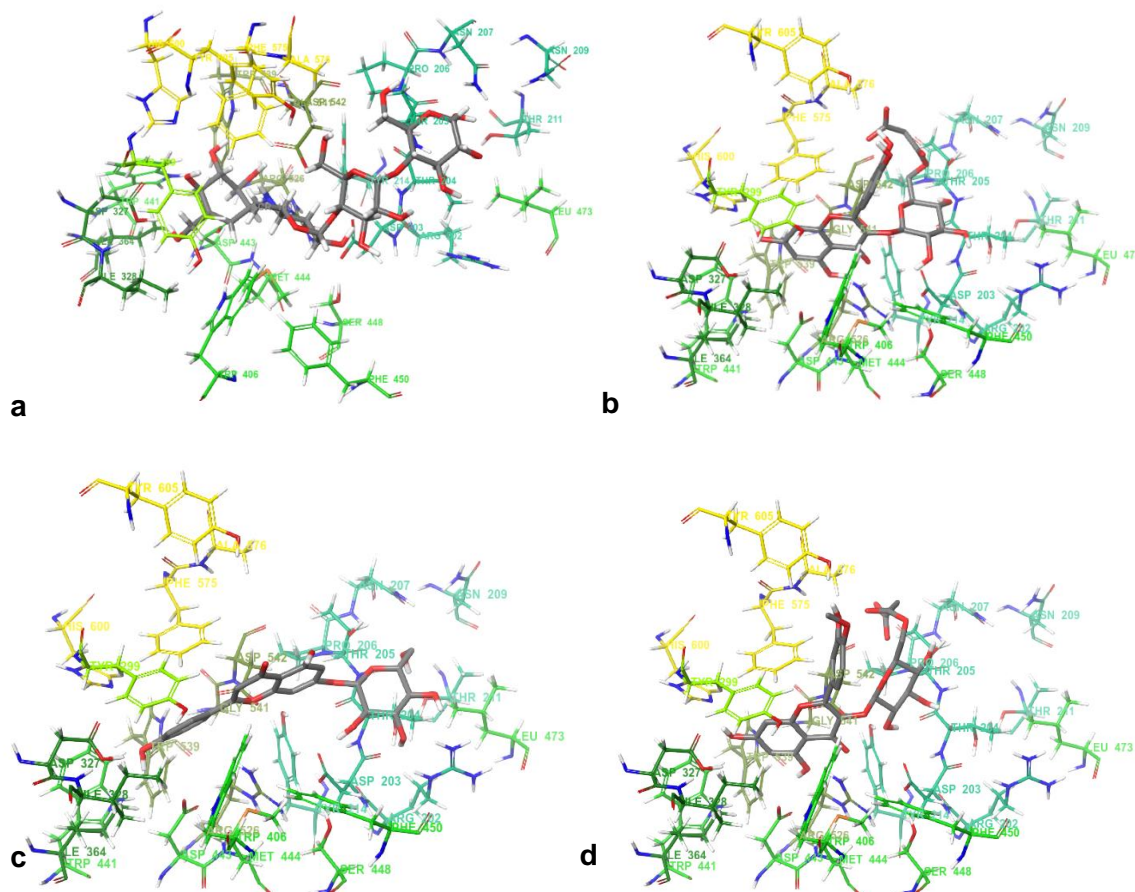


Figura 3.10: Representación gráfica del sitio de unión de los ligandos **a)** acarbosa, **b)** quercetin-3-O-(6''malonil)-glucósido (**18**) **c)** apigenina-7-O-glucósido (**19a**), y **d)** isoramnetin-3-O-(6''malonil)-glucósido (**22**), en la estructura la subunidad *N*-terminal de la glucomaltasa humana, mostrando los aminoácidos de contacto (a 4 Å). Se observan interacciones de puentes de hidrógenos (línea punteada naranja) con aminoácidos claves en la catálisis de hidrólisis y estabilización del sustrato.

El patrón de interacciones presentado como matriz en la [figura 3.11](#) describe la posición del residuo de aminoácido y las interacciones presentadas con cada uno de los ligandos. De esta figura se infiere que la mayoría de los ligandos presentan algún tipo de interacción con dos de los aminoácidos de la triada catalítica (Asp203 y Asp327); a pesar de ello solo algunos interactúan mediante puentes de hidrógeno. Además, se observa que los compuestos de tipo saponina son aquellos que presentan mayor número de interacciones, lo anterior relacionado con su tamaño, ya que por una parte poseen un núcleo tipo lanostano, unido a una cadena lateral

oxigenada por un extremo y por el otro a un disacárido derivado de *N*-acetil glucosamina. El comportamiento opuesto se encontró para los compuestos polifenólicos sin glicosilación como el **14** y **16**; en los que, aunque se presentaron menores interacciones se encontró una mayor eficiencia de ligando, son estos compuestos los de mayor similitud al patrón de interacción de la sinigrina de acuerdo con el cálculo del coeficiente de tanimoto. De igual forma, no se encontró similitud en los patrones de interacción entre los aminoácidos **2** y **3** con alguno de los inhibidores, por lo que no se esperaría actividad inhibitoria por parte de estos aminoácidos. En el caso de las saponinas el efecto de los cambios en la configuración absoluta de los centros quirales de la cadena lateral no tuvo un impacto tan marcado con en el caso de las interacciones y energía de afinidad entre estos y la enzima α -amilasa.

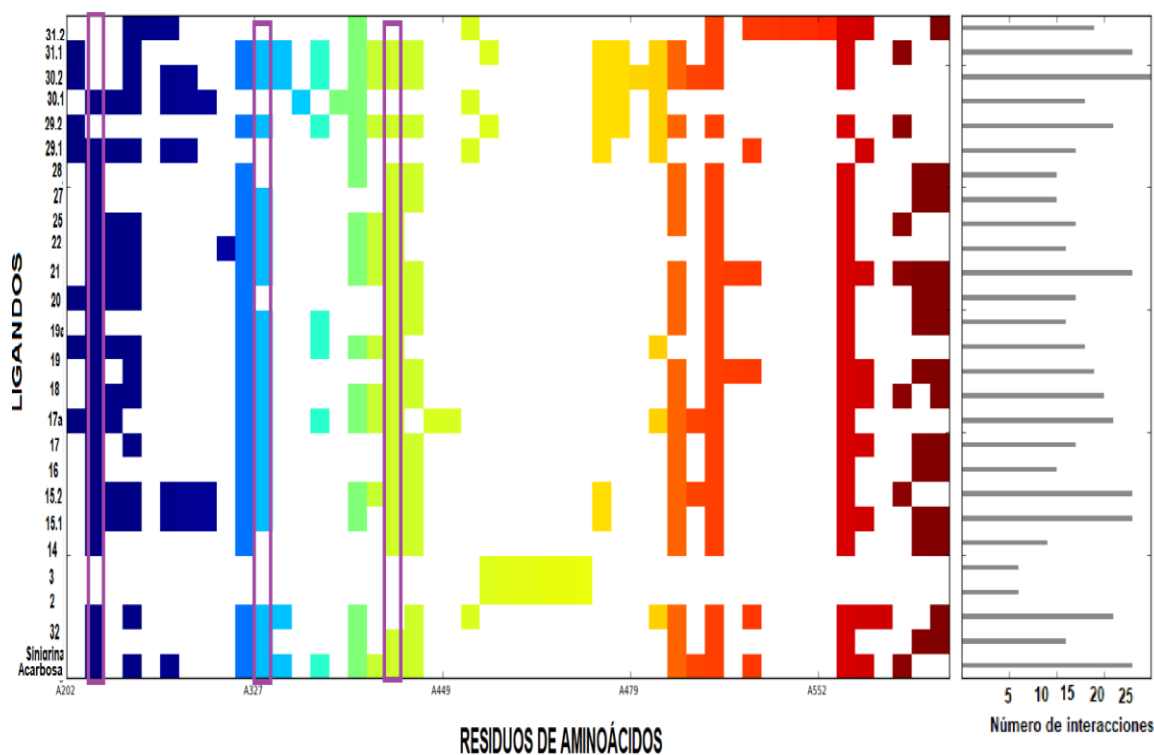


Figura 3.11: Matriz de interacciones entre la subunidad *N*-terminal de la glucomaltasa intestinal humana estructura 2QMJ y los ligandos identificados en hojas de *P. ligularis*, sinigrina y pseudo-hexasacárido derivado de acarbosa. En el eje horizontal se encuentra la posición del aminoácido y en el eje vertical los ligandos, se enmarcan los aminoácidos de la triada catalítica. La coloración indica que se encontró algún tipo de interacción entre el aminoácido y el ligando.

En conjunto, los compuestos que presentaron valores de eficiencia de ligando superiores a la acarbosa, interacciones de puentes de hidrógeno con uno o más aminoácidos de la triada catalítica y coeficientes de tanimoto que indican similitud respecto al patrón de interacciones de los compuestos inhibidores usados como control positivo son: quercetin-3-O-(6''malonil)glucósido (**18**), apigenina-7-O-glucósido (**19a**), kaempferol3-O-(6''malonil)glucósido (**21**) e isoramnetin-3-O-(6''malonil)glucósido (**22**). Lo anterior, indica que la esterificación con malonato podría repercutir en el número de interacciones efectivas para la formación del complejo ligando-receptor, puesto que al comparar con sus análogos no esterificados los compuestos **18**, **21** y **22** se encuentra que estos último no interactúan con ciertos aminoácidos claves para la inhibición enzimática. Un ejemplo de ello es que al comparar el perfil de interacciones presentado por los compuestos isoramnetin-3-O-glicósido (**20**), con el de su análogo esterificado compuesto **22**, muestra que **20** genera interacciones de puentes de hidrógeno con el aminoácido Arg526, mientras que el compuesto **22** lo hace con los aminoácidos Asp203, Asp327, Asp443 y Arg526; tres de los cuales pertenecen a la triada catalítica. Es decir **22** tiene un perfil de interacciones más efectivo para la inhibición. Estos hallazgos, soportan el hecho de que la adición de unidades de carbohidratos simples, con o sin modificaciones tipo esterificación, generan interacciones adicionales con los aminoácidos del sitio activo de la enzima a través de puentes de hidrógeno con residuos de aminoácidos polares.

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

En esta sección se presentarán los resultados de la evaluación de la actividad inhibitoria sobre estas enzimas por parte de las fracciones, y compuestos aislados e identificados. Los compuestos a ensayar fueron los flavonoides crisina (**14**), catequina (**16**), quercetina-3-*O*-glucósido (**17**), kaempferol-3-*O*-glucósido, crisin-7-*O*-(6"-acetil)glucósido (**28**), la saponina ligularósido C (**15**) y el aminoácido glutamina (**3**), puesto que los estudios metabólicos de la [sección 2.2.4](#), indicaron que ellos podrían ser los responsables de las variaciones en la actividad biológica en los diferentes extractos polares de hojas de *P. ligularis*. Estos datos experimentales *in vitro* buscan validar los estudios *in silico* como herramienta complementaria de validación.

El hecho de haber identificado disacáridos, como la sacarosa, en el extracto podría suponer una posible interferencia para el ensayo de inhibición enzimática, puesto que este carbohidrato es sustrato de este tipo de enzimas. Por lo anterior se buscó eliminar este tipo de compuestos con el fin de eliminar estas posibles interferencias. Así, se procedió a fraccionar 4 de los extractos activos, incluidos en los análisis OPLS-DA, usando butanol para obtener fracciones orgánicas y fracciones acuosas remanentes. Cada una de estas fracciones fue valorada en los ensayos de inhibición, y se evidenció que la fase orgánica concentra la actividad inhibitoria. En esta fase butanólica se concentran los compuestos polares no iónicos presentes en el extracto inicial. En la [figura 3.12](#) se presentan los cromatogramas a 340nm que muestran que los compuestos polifenólicos se concentran de forma mayoritaria en la fase butanólica; y se muestra en el espectro de RMN la presencia de saponinas y de flavonoides, que son minoritarios respecto a las primeras.

En la [tabla 3.8](#) se presentan los porcentajes de inhibición sobre la actividad catalítica de las enzimas de interés. La fracción acuosa remanente presenta los menores % de inhibición en la mayoría de los casos, esto puede indicar que algunos compuestos activos no fueron extraídos en la fase orgánica; como evidencia de ellos se presentan los cromatogramas de la figura 3-12b en donde se observa que a pesar de que la mayoría de los compuestos polifenólicos fueron

extraídos por el butanol, algunos se mantienen en la fase acuosa remanente al compararlos con el perfil cromatográfico del extracto acuoso inicial. Esto se debe a que algunos flavonoides son ionizables dada su esterificación con malonato, aspecto que disminuiría su concentración en la fase orgánica; por lo tanto, el pH es un factor a controlar en la extracción. Finalmente, los valores no proporcionales entre el % de inhibición del extracto crudo respecto a los obtenidos tras el fraccionamiento, se podría explicar por el efecto de la coloración de los extractos en la detección de la actividad enzimática, principalmente en el ensayo de α -amilasa. Sin embargo, esta aproximación permitió evidenciar que la actividad se concentra principalmente en compuestos polares no iónicos.

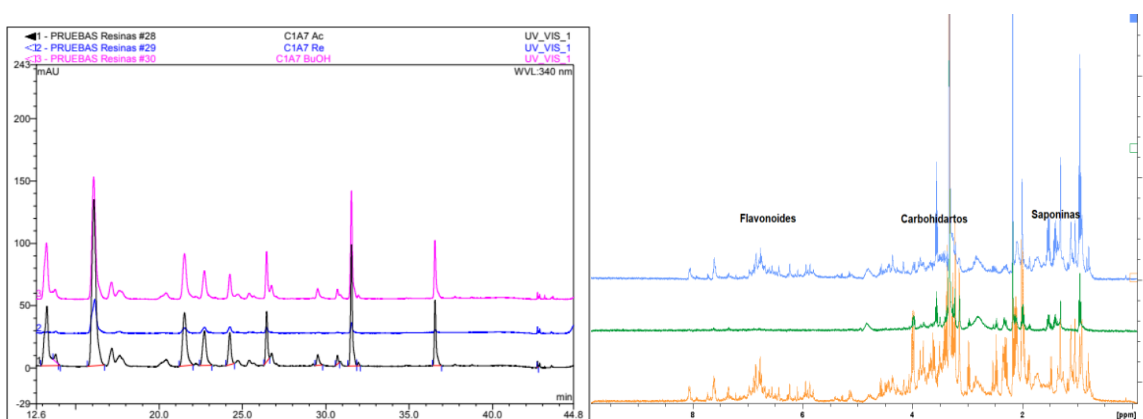


Figura 3.12: a) Cromatogramas a 340nm del extracto acuoso (línea negra), fase acuosa remanente (línea azul) y fase orgánica (línea rosa) de las muestras C1A7. b) perfil RMN de extracto acuoso (línea naranja), fase acuosa remanente (línea verde) y fase orgánica (línea azul) de las muestras C1A7.

Tabla 3.8: Porcentajes de inhibición enzimática del extracto acuoso, fracciones acuosas y butanólicas remanentes de algunas muestras incluidos en el análisis tipo OPLS-DA.

| Muestra | α -glucosidasa | | | α -amilasa | | |
|---------|--|---------------------------------------|----------------------------------|--|---------------------------------------|----------------------------------|
| | %Inhibición extracto acuoso fracción cruda | %Inhibición fracción acuosa remanente | % Inhibición fracción butanólica | %Inhibición extracto acuoso fracción cruda | %Inhibición fracción acuosa remanente | % Inhibición fracción butanólica |
| H3A7 | 36.9 \pm 3.9 | 6.7 \pm 3.0 | 25.2 \pm 1.0 | 83.4 \pm 13,4 | 30.2 \pm 5,1 | 70.1 \pm 5,7 |
| H4A7 | 13.8 \pm 4.7 | -5.4 \pm 0.5 | 2.3 \pm 0.5 | 89.2 \pm 5.2 | 40.8 \pm 5.9 | 80.2 \pm 10.5 |
| J2A5 | 20.2 \pm 1.0 | -5.3 \pm 3.6 | 12.0 \pm 0.1 | 60.8 \pm 4.7 | 35.2 \pm 6.3 | 62,50 \pm 7.58 |
| C1A7 | 19.2 \pm 2.8 | 5.9 \pm 0.7 | 16.3 \pm 2.6 | 77.56 \pm 5.6 | 50.45 \pm 8.9 | 68.9 \pm 10.4 |

Los compuestos mayoritarios de la fracción butanólica corresponden a compuestos polifenólicos glicosilados y no glicosilados, y saponinas, algunos de ellos se encontraban disponibles en el laboratorio (aislados en este trabajo y en trabajos previos, o habían sido comprados) por lo que se procedió a evaluar la concentración inhibitoria 50 de ellos, incluyendo al aminoácido glutamina, que en los análisis metabólicos figuraba como candidato a activo. Como controles positivos se usó la acarbosa. En la tabla siguiente se resumen los valores de IC₅₀ obtenidos para cada uno de los compuestos, cabe mencionar que la actividad inhibitoria se evaluó partiendo de soluciones *stock* de los compuestos de 1mg/mL y sus respectivas diluciones.

Tabla 3.9: Actividad inhibitoria frente a las enzimas α -glucosidasa, presente en el extracto de intestino de rata; y α -amilasa pancreática porcina de algunos compuestos identificados en hojas de en hojas de *Passiflora ligularis* Juss.

| Compuesto | IC ₅₀ (μ M) | |
|---------------------------------------|-----------------------------|--------------------|
| | α -glucosidasa | α -amilasa |
| Glutamina (3) | >1.36mM | >2.73mM |
| Crisina (14) | >786.7 | >1.57mM |
| Ligularósido C (15) | >235.42 | 409.80 \pm 11.37 |
| Catequina (16) | >689.6 | >1.37mM |
| Quercetin-3-O-glucósido (17) | 15.37 \pm 1.05 | 31.04 \pm 1.06 |
| Kaempferol-3-O-glucósido (19) | 1.83 \pm 0.01mM | 33.45 \pm 2.45 |
| Crisin-7-O-(6"-acetil)-glucósido (28) | >463.78 | >873.36 |
| Acarbosa (Control positivo) | 156.6 \pm 1.11 | 234.1 \pm 15.9 |

Acorde con los datos de IC₅₀ para ambas enzimas de interés los compuestos con mejor actividad inhibitoria son flavonoides glicosilados derivados de quercetina y kaempferol, presentando valores de IC₅₀ incluso menores que el valor determinado para la acarbosa, clínicamente utilizado para el tratamiento de la diabetes. No se encontró inhibición de la actividad enzimática por parte de otros compuestos polifenólicos como la catequina, crisina y sus derivados, dentro del rango de concentraciones evaluadas. Respecto a las saponinas, el compuesto 15 presentó actividad inhibitoria frente a la α -amilasa, aspecto que es acorde a los resultados de acoplamiento molecular. Finalmente, el aminoácido evaluado no presentó actividad alguna. Estos hallazgos permiten validar los resultados del análisis por OPLS-DA para la α -amilasa, en el que la diferenciación de las muestras entre activas (A) y no activas (N) se da por cambios en

variables de desplazamiento químico relacionados con compuestos de naturaleza terpenoidal (saponinas) y polifenólicas (flavonoides).

En el caso de los resultados de análisis OPLS-DA para α -glucosidasa, estos resultados solo validan la relación entre los cambios de actividad y los cambios en compuestos polifenólicos. En este punto es importante mencionar que no se disponía de la totalidad de los compuestos identificados en los extractos polares de hojas de granadilla para la evaluación de la actividad inhibitoria enzimática *in vitro*, por lo que esfuerzos posteriores a esta tesis deben realizarse en este sentido, incluso buscando nuevas fuentes de este tipo de compuestos, como otras especies de *Passiflora* las cuales se caracterizan por la producción de saponinas con núcleo lanostano y flavonoides tipo C-glicósidos¹⁵. Los flavonoides O-glicosidados no son comunes en este género de plantas.

Por otra parte, al encontrar que la actividad biológica no se concentra en un compuesto en específico, ni en un solo tipo de compuestos, es de esperarse que la actividad inhibitoria de los extractos se deba a sinergismos e inclusive a diferentes tipos de inhibición enzimática. Las diferencias en la actividad biológica entre los diferentes extractos podrían estar relacionados no sólo con cambios en la concentración de un tipo de compuestos, sino que también con cambios en las proporciones de los compuestos bioactivos, lo que impactaría en los posibles sinergismos.

Los estudios de *docking* mostrados en las secciones anteriores muestran la viabilidad teórica de la formación de complejos ligando-receptor para la mayoría de los compuestos identificados en las hojas de *P. ligularis*. No obstante, los valores de IC₅₀ permitieron establecer que la inhibición de la actividad enzimática sólo es presentada por algunos compuestos, dentro de estos flavonoides con mayor número de hidroxilaciones en su estructura como aquellos glicósidos derivados del núcleo quercetina. Este hecho se confirma los hallazgos de los estudios de *docking* en donde los flavonoides sin hidroxilaciones en el anillo B, como crisina y sus derivados, no presentaron interacciones significativas en el sitio activo de ninguna de las dos enzimas.

Es importante mencionar que los ligandos co-cristalizados poseen puentes de hidrógenos con moléculas de agua presentes en el sitio activo, y ésta a su vez con residuos de aminoácidos

polares, este tipo de interacciones también repercuten en las conformaciones adoptadas por la proteína y el ligando. Es por ello, que los resultados de acoplamiento presentan un sesgo de base relacionado con este aspecto. No obstante, los resultados de este estudio son coherentes con los datos disponibles de IC_{50} reportados para los flavonoides, tales como los derivados de quercetina, kaempferol y crisina; en diferentes carbohidrasas^{22,23}. Estudios QSAR publicados en la literatura científica comparan la actividad inhibitoria de 44 compuestos polifenólicos sobre la enzima α -glucosidasa de *Saccaromises* de la con la estructura de diferentes compuestos polifenólicos, como el caso de Proença *et al*²², muestran que los flavonoides con dos hidroxilaciones en los anillos A y B y una en el anillo C son los más activos frente a glucosil-hidrolasas, este es el caso de los derivados de quercetina, lo que coincide con nuestros hallazgos. En el estudio realizado por Tadera *et al*²³, se concluyó que el carbonilo y la insaturación presente en el anillo C, junto con hidroxilaciones en los anillos A y B, aumentan la actividad inhibitoria de las enzimas glucosil-hidrolasas por parte de compuestos polifenólicos; por lo que compuestos de tipo flavonol son más activos frente a estas enzimas. En esta tesis se confirmaron las observaciones anteriores, puesto que los derivados de crisina y la catequina presentaron menor actividad que otros polifenoles.

Finalmente, en el caso de las saponinas no se encontraron estudios relevantes sobre la inhibición de la actividad de glucosil-hidrolasas por parte de saponinas con núcleo terpenoidal tipo lanostano, característico de aquellas identificadas en hojas de *P. ligularis*. Hecha esta salvedad y dado que solo se dispuso de una de las cuatro saponinas identificadas en los extractos polares, para la evaluación de la actividad inhibitoria frente a las enzimas de interés, se deben complementar los hallazgos del presente trabajo con estos otros compuestos para establecer el papel de cada uno de estos compuestos sobre las variaciones en la actividad biológica.

3.3 Conclusiones

El estudio *in silico* tipo acoplamiento molecular, entre las estructuras rígidas de las enzimas α -amilasa pancreática porcina (código PDB:1HX0) y la subunidad *N*-terminal de la gluco-maltasa o α -glucosidasa intestinal humana (código PDB: 2QMJ), permitió identificar a ligularósido C (diastereoisómero **15.1**), la quercetina-3-*O*-glucósido (**17**), la luteolina-7-*O*-glucósido (**17a**) y el kaempferol-3-*O*-glucósido (**19**), como aquellos compuestos que presentarían los complejos energéticamente más estables con el sitio activo de la enzima α -amilasa; a su vez interactuarían con aminoácidos claves para la hidrólisis de carbohidratos y para el reconocimiento de estos por parte de la enzima. En el caso de la α -glucosidasa fueron los compuestos quercetin-3-*O*-(6"-malonil)-glucósido (**18**), apigenina-7-*O*-glucósido (**19a**), kaempferol-3-*O*-(6"-malonil)-glucósido (**21**) e isoramnetin-3-*O*-(6"-malonil)-glucósido (**22**), aquellos que el modelamiento identificó como mejores candidatos. No se encontraron interacciones importantes para los aminoácidos ácido glutámico (**2**) y glutamina (**3**), por lo que no se les consideró inhibidores potenciales de las enzimas.

Adicionalmente, el análisis del perfil de interacciones de inhibidores reportados para las enzimas, tales como la acarbosa, sinigrina y el flavonoide *C*-glicosilado (**32**), respecto a los compuestos identificados en hojas de *P. ligularis* permitió establecer que compuestos tipo saponina, y flavonoides *O*-glicosilados, esterificados con malonato, presentarían un perfil de interacciones similar al presentado por la acarbosa, mientras aquellos flavonoides no glicosilados interactuarían con el sitio activo de las enzimas de forma similar a como lo hace la sinigrina. Por otro lado, los flavonoides tipo *O*-glucósido presentan diferentes grados de similitud con el perfil de interacciones de los inhibidores de referencia siendo los más activos aquellos que presentan perfiles más similares a los de acarbosa.

En cuanto a la actividad biológica, se validó que aquellos compuestos presentes en la fase butanólica producto del fraccionamiento del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*, son los responsables de la actividad inhibitoria sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa. Además, los valores de IC_{50} determinados para un grupo de compuestos, en los que se encontraban flavonoides, saponinas y aminoácidos permitieron establecer que los compuestos con mayor actividad inhibitoria frente a la enzima α -amilasa fueron el ligularósido C (**15**), la quercetina-3-

O-glucósido (**17**) y el kaempferol-3-*O*-glucósido (**19**), los cuales presentaron valores de IC₅₀ inferiores al encontrado para la acarbosa. Respecto a la inhibición de la α -glucosidasa sólo el compuesto quercetina-3-*O*-glucósido (**17**) presentó un IC₅₀ menor al compuesto de referencia. Estos hallazgos están de acuerdo con lo reportado en la literatura, puesto que allí mencionan que el número de hidroxilaciones en los anillos A, B y C en flavonoides impacta en la actividad inhibitoria, siendo los compuestos con hidroxilaciones en los tres anillos los más activos, que en el presente caso la quercetina-3-*O*-glucósido (**17**).

Los resultados del estudio *in silico* y los ensayos *in vitro* de IC₅₀ proporcionaron evidencia adicional para la validez de los resultados del estudio metabólico presentado en el capítulo 2, puesto que fueron los compuestos polifenólicos y una saponina los que presentaron mejor actividad biológica y los que en la modelación se unirían de forma más efectiva a las enzimas estudiadas, tal y como lo predijo el análisis multivariado del estudio metabólico

3.4 Materiales y Métodos

3.4.1 Reactivos y equipos

Los reactivos y materiales empleados para la determinación de los valores de IC₅₀ de los compuestos fueron los mismos a los descritos en la sección 2.4.1, empleados en la determinación de los porcentajes de inhibición enzimática por parte de los extractos crudos.

Para el desarrollo de los estudios de acoplamiento molecular se utilizó un equipo ASUS VivoBook X524U Intel (R) Core™ i8-8550U CPU 4.0 GHz x64. Memoria Ram de 12.0 GB con sistemas operativos Windows10 y Linux (Ubuntu).

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

Las estructuras de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa se descargaron de la base de datos *Protein Data Bank* PDB²⁴. Los archivos descargados se seleccionaron con base a tres criterios: organismo de origen de acuerdo a la enzima usada en el bioensayo, presencia de inhibidores co-cristalizados en el sitio activo y resolución de la estructura cristalográfica. Para el primer criterio, se buscaron estructuras de enzimas provenientes de *Sus scrofa domestica* para el caso de la α -amilasa, y provenientes de *Rattus norvegicus* para el caso de α -glucosidasa. Al no encontrarse disponible una estructura de la especie *Rattus norvegicus* se seleccionó una enzima de origen humano con alto porcentaje de homología. Se seleccionaron estructuras co-cristalizadas con acarbosa.

3.4.3 Pre-procesamiento de los archivos de las estructuras proteicas para el acoplamiento molecular

Se realizó el proceso del pre-procesamiento de los archivos de las estructuras proteicas seleccionadas usando la herramienta *protein preparation wizard* del software MAESTRO 11.5 en su versión libre para usos académicos¹². Esta herramienta permite hacer correcciones a la estructura mediante la adición de hidrógenos, órdenes de enlaces, corrección de los estados de

ionización de los aminoácidos de acuerdo con el pH (pH=6.8), remoción de moléculas de agua y ligando, selección de conformaciones de residuos de aminoácidos, eliminación de subunidades proteicas, entre otros cambios necesarios para obtener estructuras adecuadas para la ejecución de protocolos de “*docking*”.

3.4.4 Preparación de las estructuras de los ligandos

Las estructuras 3D de los metabolitos aislados de *P. ligularis* fueron construidas con base a las estructuras identificadas en el presente trabajo, y los reportes de la literatura. Este proceso se realizó mediante la construcción en 2D de las estructuras en el software y la asignación de la estereoquímica en los centros asimétricos MAESTRO 11.5¹². Éste permite realizar la optimización geométrica de las estructuras 3D, y obtener los estados de ionización mayoritarios a un pH determinado (pH=6.8). En el caso de metabolitos cuya estereoquímica no ha sido elucidada en su totalidad (las saponinas), se generaron todos los diastereoisómeros posibles para su evaluación frente a las enzimas de estudio. El trabajo de determinación de la estereoquímica se está llevando a cabo en el grupo de investigación en este momento.

3.4.5 Determinación y validación del protocolo de acoplamiento molecular

El proceso de acoplamiento molecular se llevó a cabo usando el software AutoDock Vina 1.1.2¹⁸, el cual requiere de un archivo de entrada que contenga la descripción de los archivos de la proteína, ligando en formato .pdbqt, las características de la rejilla o espacio de análisis (coordenadas y tamaño en las dimensiones x, y, z) y la exhaustividad de la búsqueda, entre otros. Para estos requerimientos se empleó el paquete de herramientas MGLTools, específicamente la herramienta AutoDockTools 1.5.6²⁵, en la que se obtienen los archivos .pdbqt para la proteína y los ligandos, se define la ubicación y el tamaño de la rejilla. Estos últimos parámetros se seleccionaron tomando como referencia la acarbosa co-cristalizada en las estructuras de la α -amilasa y α -glucosidasa, de forma que la rejilla se centró con base a la ubicación de este ligando y el tamaño en las tres dimensiones se estableció como el doble de la distancia en Å entre los dos átomos más distantes de la acarbosa en la conformación co-cristalizada.

El proceso de validación de los parámetros determinados se realizó al someter a *re-docking* la estructura del ligando (acarbosa) co-cristalizado, y enfrentando al software a otras conformaciones del ligando, con el fin de evidenciar el grado de similitud conformacional entre los resultados de estos ensayos *in silico* con los resultados experimentales obtenidos para la conformación de la acarbosa co-cristalizada, mediante la determinación del RMSD. Dada la complejidad estructural de la acarbosa y al número de enlaces rotables, se disminuyó el número de enlaces rotables en 2 unidades de forma aleatoria respecto al valor inicial, con el fin de disminuir el número de grados de libertad.

3.4.6 Acoplamiento molecular y huellas digitales de interacción proteína-ligando (*Protein-ligand interaction fingerprint, PLIF*) entre los compuestos aislados de hojas *Passiflora ligularis* Juss y las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa.

El acoplamiento molecular entre los metabolitos y las enzimas de estudio se realizó con base a los parámetros de *docking* validados en la sección anterior. La conformación, o pose, con mejor valor de energía de afinidad se seleccionó para establecer mediante el software MAESTRO 11.5¹² la huella digital de interacciones o *interaction fingerprint*. Para esto se hace referencia al patrón de interacciones que presenta el ligando con los residuos de aminoácidos a una distancia menor a 4Å. Así, el software realiza el conteo y clasificación de las interacciones para establecer el grado de similitud entre dos ligandos respecto a su modo de unión simulado o experimental. Para el presente caso, no se restringió el tipo de interacción a incluir en el análisis, y se realizó la comparación con el inhibidor acarbosa y los productos naturales sinigrina y compuesto **32**. Por último, se determinó la eficiencia del ligando relacionando la energía respecto al número de átomos pesados.

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

- **Evaluación de la actividad inhibitoria de las fracciones butanólicas y acuosas del extracto acuoso de *P.ligularis*.**

Se realizó la extracción de un total de 50mg de hojas mediante de acuerdo a lo descrito en la [sección 2.4.3](#), se concentró el extracto y fue resuspendido en 2mL de agua, se tomó 1 mL de este extracto y se fraccionó con 5 volúmenes de 200 μ L de butanol. Se removió el butanol de la fracción orgánica mediante centrifugación con vacío y posterior a esto el extracto crudo, la fracción acuosa remanente y la fracción orgánica fueron liofilizadas para remover cualquier traza del solvente de fraccionamiento. Los sólidos obtenidos fueron resuspendidos en 1 mL de agua destilada y se realizaron los análisis cromatográficos y los ensayos de inhibición enzimática de acuerdo con la [sección 2.4.6](#).

- **Determinación de los valores de concentración inhibitoria 50 de los compuestos aislados de hojas de *P.ligularis***

Para evaluar la inhibición de la α -amilasa pancreática porcina y de la α -glucosidasa presente en el extracto de polvo de intestino de rata, se determinó la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de los compuestos polifenólicos y saponinas, aislados de hojas de *P. ligularis*. El procedimiento empleado fue el mismo usado para los extractos y descrito en la [sección 2.4.6](#). Se partió de una solución de 1mg/mL del compuesto a ensayar y se realizaron hasta 6 diluciones del compuesto de acuerdo con la disponibilidad de este; para cada una de las concentraciones evaluadas de los compuestos se realizaron triplicados, y se usaron los blancos respectivos, que corresponden a todos los reactivos excepto la enzima o extracto enzimático según el bioensayo.

3.5 Bibliografía

- (1) Yu, W.; Alexander, M. Computer-Aided Drug Design Methods. *Methods Mol Biol.* **2017**, 7 (1), 85–106.
- (2) Medina-Franco, J. L. Advances in Computational Approaches for Drug Discovery Based on Natural Products. *Rev. Latinoam. Quim.* **2013**, 41 (2), 95–110.
- (3) Fang, J.; Liu, C.; Wang, Q.; Lin, P.; Cheng, F. In Silico Polypharmacology of Natural Products. *Brief. Bioinform.* **2017**, No. January, 1–19.
- (4) I, C. G.; Astier, J.; Ren, G. M.; Cambillau, C.; Payan, F. Crystal Structure of Pig Pancreatic A-Amylase Isoenzyme II , in Complex with the Carbohydrate Inhibitor Acarbose. *Eur. J. Biochem.* **1996**, 569, 561–569.
- (5) Qian, M.; Nahoum, V.; Bonicel, J.; Bischoff, H.; Henrissat, B. Enzyme-Catalyzed Condensation Reaction in a Mammalian R -Amylase . High-Resolution Structural Analysis of an Enzyme - Inhibitor Complex . *Biochemistry.* **2001**, 7700–7709.
- (6) Qian, M. The Active Center of a Mammalian A-Amylase. Structure of the Complex of a Pancreatic a-Amylase with a Carbohydrate Inhibitor Refined to 2.2-Å Resolution. *Biochemistry* **1994**, 33, 6284–6294.
- (7) Qian, M.; Spinelli, S.; Driguez, H.; Payan, F. Structure of a Pancreatic A-Amylase Bound to a Substrate Analogue at 2.03. *Protein Sci.* **1997**, 6, 2285–2296.
- (8) Kleywegt, G. J.; Jones, T. A. Model Building and Refinement Practice. *Methods Enzymol.* **1997**, 277 (1995), 208–230.
- (9) Sim, L.; Quezada-Calvillo, R.; Sterchi, E. E.; Nichols, B. L.; Rose, D. R. Human Intestinal Maltase-Glucoamylase: Crystal Structure of the N-Terminal Catalytic Subunit and Basis of Inhibition and Substrate Specificity. *J. Mol. Biol.* **2008**, 375 (3), 782–792.
- (10) Lehoczki, G.; Kandra, L.; Gyémánt, G. The Use of Starch Azure for Measurement of Alpha-Amylase Activity. *Carbohydr. Polym.* **2018**, 183, 263–266.

- (11) Rey, D. P. Evaluación in Vitro Del Efecto de Un Extracto de Frutos de *Physalis Peruviana* Sobre Algunas Carbohidrasas Intestinales. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm* **2015**, *44* (1), 27–89.
- (12) Schrödinger Release 2018-4. Maestro, Schrödinger. 2018.
- (13) Costa, G. M.; Cárdenas, P. A.; Gazola, A. C.; Aragón, D. M.; Castellanos, L.; Reginatto, F. H.; Ramos, F. A.; Schenkel, E. P. Isolation of C-Glycosylflavonoids with α -Glucosidase Inhibitory Activity from *Passiflora Bogotensis* Benth by Gradient High-Speed Counter-Current Chromatography. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2015**, *990*, 104–110.
- (14) Abbas, Q.; Hassan, M.; Raza, H.; Kim, S. J.; Chung, K. W.; Kim, G. H.; Seo, S. Y. In Vitro, in Vivo and in Silico Anti-Hyperglycemic Inhibition by Sinigrin. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2017**, *10* (4), 372–379.
- (15) Meneses, C. Saponinas y Flavonoides de *Passiflora ligularis* y Evaluación de Su Actividad Antiinflamatoria. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de química. **2016**
- (16) Menche, D. New Methods for Stereochemical Determination of Complex Polyketides : Configurational Assignment of Novel Metabolites from Myxobacteria. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 905–918.
- (17) Schaller, H. Sterol and Steroid Biosynthesis and Metabolism in Plants and Microorganisms. In *Comprehensive natural products ii*; 2010; pp 756–777.
- (18) Manuscript, A. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31* (2), 455–461.
- (19) Forli, S.; Huey, R.; Pique, M. E.; Sanner, M.; Goodsell, D. S.; Arthur, J. Computational Protein-Ligand Docking and Virtual Drug Screening with the AutoDock Suite. *Nat. Protoc.* **2016**, *11* (5), 905–919.
- (20) Zapatero, A. C.; Metz, J. T. Ligand Efficiency Indices for Drug Discovery : Towards an

Atlas-Guided Paradigm. *Ddt* **2005**, *10* (7), 464–469.

- (21) Abad-zapatero, C. Ligand Efficiency Indices for Effective Drug Discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2007**, *2* (4), 469–488.
- (22) Proença, C.; Freitas, M.; Ribeiro, D.; Oliveira, E. F. T.; Sousa, J. L. C.; Tomé, S. M.; Ramos, M. J.; Silva, A. M. S.; Fernandes, P. A.; Fernandes, E. α -Glucosidase Inhibition by Flavonoids: An in Vitro and in Silico Structure–activity Relationship Study. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32* (1), 1216–1228.
- (23) Tadera, K.; Minami, Y.; Takamatsu, K.; Matsuoka, T. Inhibition of α -Glucosidase and α -Amylase by Flavonoids. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. **2006**, *52* (2), 149–153.
- (24) Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28* (1), 235–242.
- (25) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785–2791.

4. Conclusiones y Recomendaciones Generales

Las especies del género *Passiflora* presentan un alto potencial como fuente de compuestos bioactivos con actividad hipoglicemiante. Dentro de este género, los extractos del fruto de *Passiflora ligularis* Juss (Grandilla) han mostrado actividad hipoglicemiante e inhibidora de glucosil-hidrolasas; no obstante, la información sobre esta actividad para los extractos de las hojas es limitada. Con el objetivo de establecer si este órgano de la granadilla podría ser materia prima para generar fitoterapéuticos, que ayuden no sólo al bienestar de los pacientes, para los cuales la fitoterapia es una opción de tratamiento; sino también para los productores, al generar un uso adicional a las hojas de desecho, se desarrolló esta tesis de maestría.

En el presente trabajo se logró identificar, por RMN, la presencia de de los siguientes compuestos del extracto polar de las hojas de *Passiflora ligularis*: 5 aminoácidos, 2 a carbohidratos, 4 a ácidos orgánicos, 3 compuestos misceláneos, 1 saponina y la presencia de compuestos polifenólicos. Para el caso de estos se requirió de un análisis por HPLC-MS/MS y RMN dada su complejidad en términos de variedad. De esta forma, se identificaron 14 compuestos polifenólicos (**14, 16-28**), siendo más abundantes los flavonoides *O*-glicosilados y flavonoides *O*-glicosilados esterificados con malonato. Los núcleos de flavonoide más abundantes son quercetina y crisina.

Por otro lado, la recolección de hojas de *P. ligularis* provenientes de 8 parcelas de cultivo, y almacenadas bajo refrigeración a -76°C o a temperatura ambiente, fue realizada con el objetivo de establecer si hay variaciones en la composición metabólica dependientes de la zona de cultivo. Para esto se llevó a cabo un análisis metabolómico por RMN, sin encontrar una dependencia clara de la composición metabólica y la zona de cultivo. De otro lado, el MVDA arrojó que la condición de almacenamiento de la muestra tiene gran impacto sobre la composición metabólica. El OPLS-DA identificó a las señales del espectro RMN atribuibles a

carbohidratos, como aquellas que caracterizan al grupo de las muestras almacenadas bajo refrigeración.

De otro lado, se evaluaron los porcentajes de inhibición de los diferentes extractos sobre los modelos de α -amilasa pancreática porcina, y α -glucosidasa presente en el extracto de intestino de rata. Respecto a la relación entre el perfil metabólico y los cambios en la actividad inhibitoria enzimática, los análisis tipo OPLS-DA identificaron a las señales δ_H 0.6 a 1.99, 2.0, 2.04, 2.08, 2.12, 2.32 características de compuesto tipo saponina y aminoácidos; a las señales δ_H 3.4 y 4.04 de hidrógenos carbinólicos de carbohidratos; y a las señales entre δ_H 6.0-7.62 de compuestos polifenólicos; como aquellas que describen a las muestras clasificadas como activas. Además, se encontró que la mayoría de estas muestras pertenecen al grupo de muestras almacenadas a temperatura ambiente, hecho que sugiere que esta variable también impacta en la actividad biológica y debe ser tomada en cuenta al momento del desarrollo de un producto fitoterapéutico.

La validación de los resultados del estudio metabólico fue realizada empleando dos enfoques integrativos, por una parte, un estudio *in silico* tipo acoplamiento molecular entre las estructuras rígidas de las enzimas y compuestos identificados en este y en trabajos previos en hojas de *P. ligularis*, y por otra un ensayo *in vitro* de IC_{50} de algunos compuestos aislados. El estudio *in silico* mostró que los compuestos tipo saponina, polifenoles y aminoácidos interactuarían con el sitio activo de ambas enzimas; sin embargo, son los compuestos ligularósido C (confórmero **15.1**), la quercetina-3-*O*-glucósido (**17**), la luteolina-7-*O*-glucósido (**17a**) y el kaempferol-3-*O*-glucósido (**19**), los que presentarían las interacciones más efectivas para inhibir la enzima α -amilasa pancreática porcina. Mientras que en el caso de la interacción con el sitio activo de la subunidad *N*-terminal de la glucosidasa humana fueron los compuestos quercetin-3-*O*-(6"-malonil)-glucósido (**18**), apigenina-7-*O*-glucósido (**19a**), kaempferol-3-*O*-(6"-malonil)-glucósido (**21**) e isoramnetin-3-*O*-(6"-malonil)-glucósido (**22**) lo que presentaron mejor perfil de interacciones. Además, se pudo comprobar que estos compuestos de *P. ligularis* presentan similitud en el perfil de interacciones con los compuestos con actividad inhibitoria reportada como la acarbosa.

Se estableció el valor de IC_{50} para compuestos de diferente tipo de acuerdo con los resultados de estudio metabólico, estos compuestos fueron el aminoácido glutamina (**3**); los flavonoides crisina (**14**), catequina (**16**), quercetina-3-*O*-glucósido (**17**), kaempferol-3-*O*-glucósido (**19**) y crisin-7-*O*-(6"-acetil)-glucósido (**29**); y la saponina ligularósido C (**15**). Los compuestos que resultaron ser más potentes que el inhibidor acarbose en la inhibición de la α -amilasa pancreática porcina fueron: ligularósido C (**15**), quercetina-3-*O*-glucósido (**17**) y kaempferol-3-*O*-glucósido (**19**). Mientras que para la α -glucosidasa presente en el extracto de intestino de rata sólo el compuesto quercetina-3-*O*-glucósido (**17**) tuvo un IC_{50} menor al inhibidor de referencia.

Los resultados *in vitro*, junto con los hallazgos del estudio *in silico* validan la relación entre las variaciones de compuestos polifenólicos y saponinas, con las variaciones en la actividad biológica de las muestras. No obstante, es necesario determinar la actividad biológica de otras saponinas previamente identificada en los extractos, ya que estas corresponden a los compuestos mayoritarios del extracto. Respecto a los compuestos polifenólicos es necesario evaluar la actividad biológica de otros compuestos, por ejemplo **17a**, el cual podría ser un potente inhibidor enzimático, aún siendo minoritario en el extracto, lo anterior con base a reportes de la literatura.

Finalmente, y como recomendaciones de este trabajo, se plantea la utilización de otros métodos de análisis multivariado con los que se puedan establecer diferencias en el perfil metabólico de muestras de acuerdo con su lugar de recolección. Además, con el fin de estudiar variaciones en el perfil de compuestos polifenólicos se podría recurrir a un análisis metabólico dirigido tipo HPLC-UV. En cuanto a los compuestos identificados por MS es necesaria la confirmación de la estructura mediante análisis por RMN y la determinación de los valores de IC_{50} para otras saponinas y flavonoides.

A. ANEXO: INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

CAPÍTULO 2

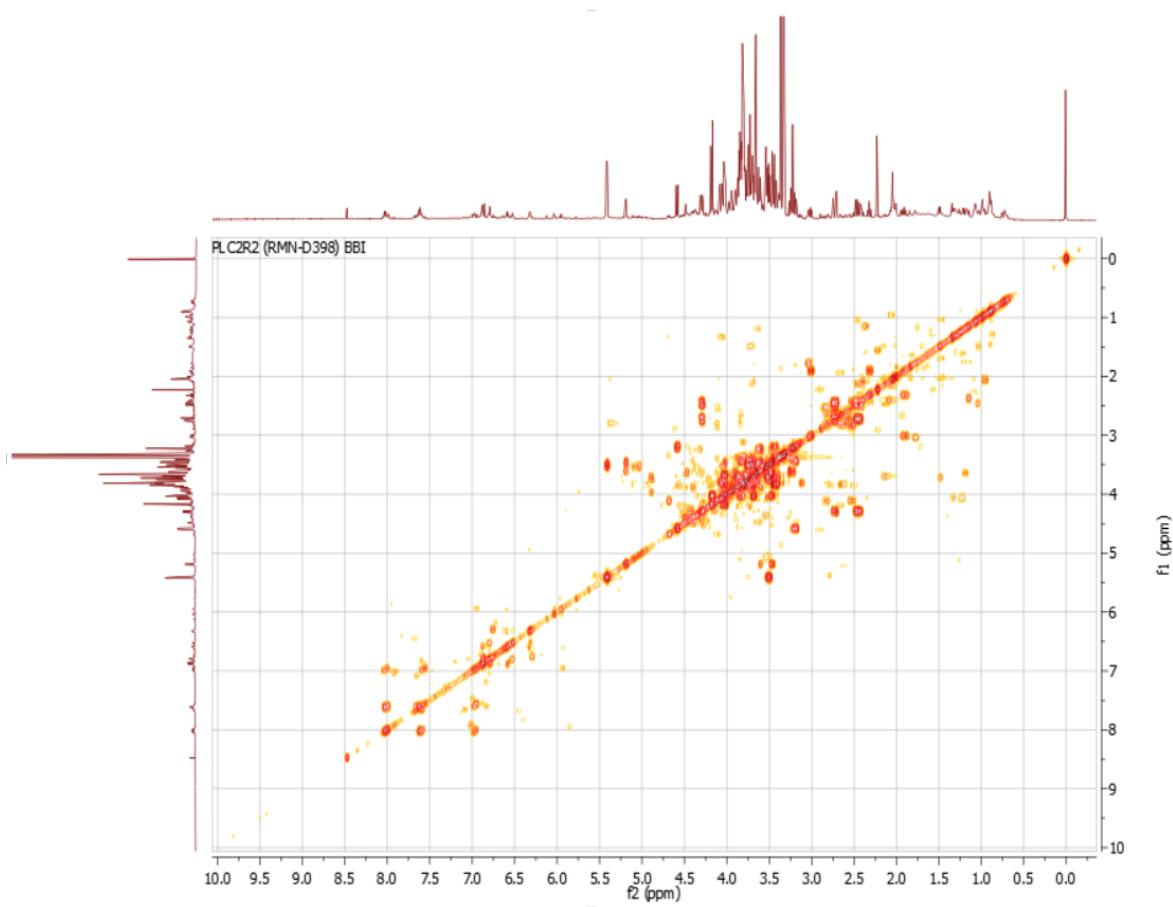


Figura S.2.1: Espectro COSY para el extracto de hojas de *Passiflora ligularis* Juss en metanol- d_4 - KH_2PO_4 en D_2O a pH 6.0.

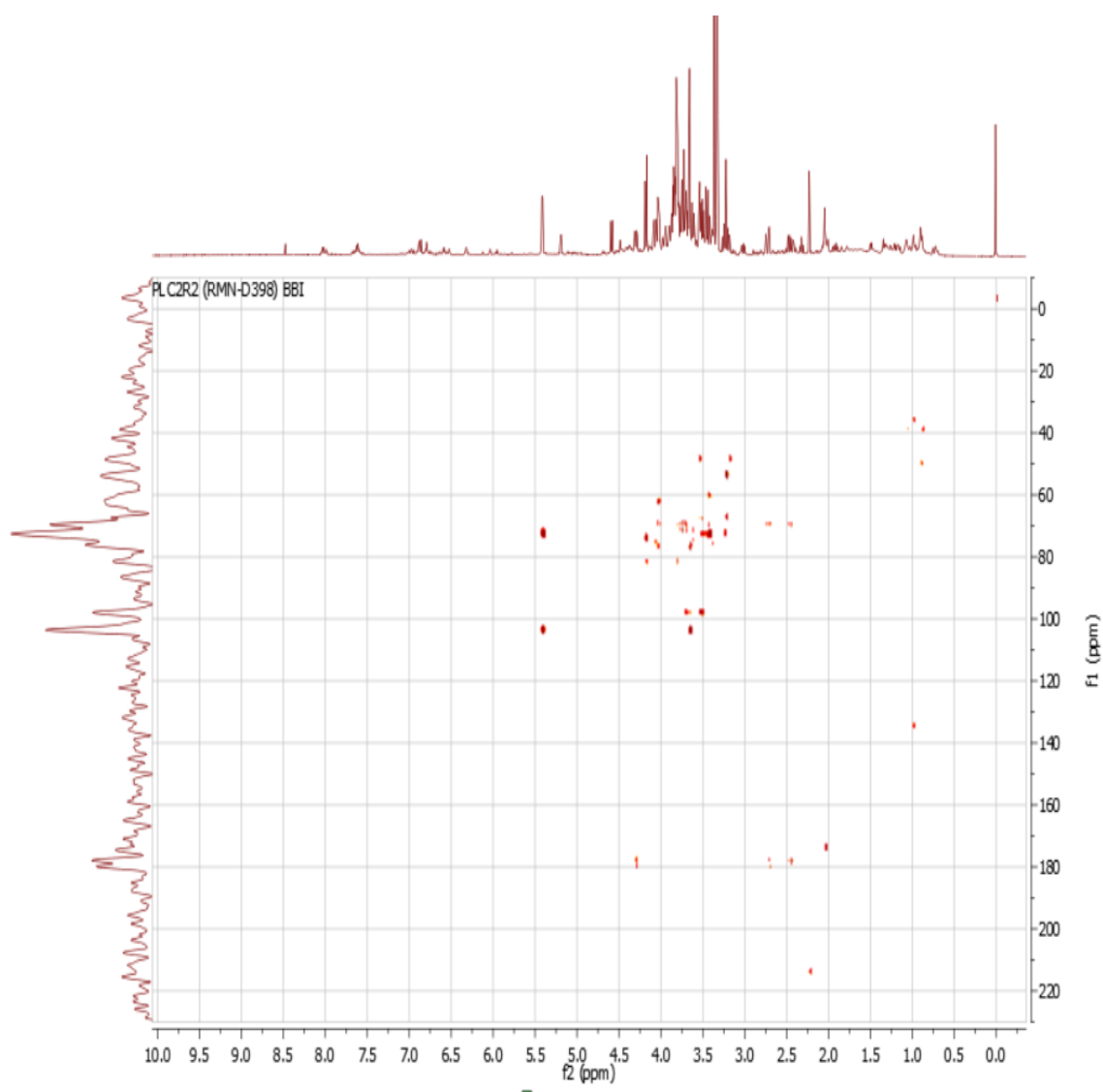


Figura S2.2. Espectro HMBC para el extracto de hojas de *Passiflora ligularis* Juss en metanol- d_4 - KH_2PO_4 en D_2O a pH 6.0.

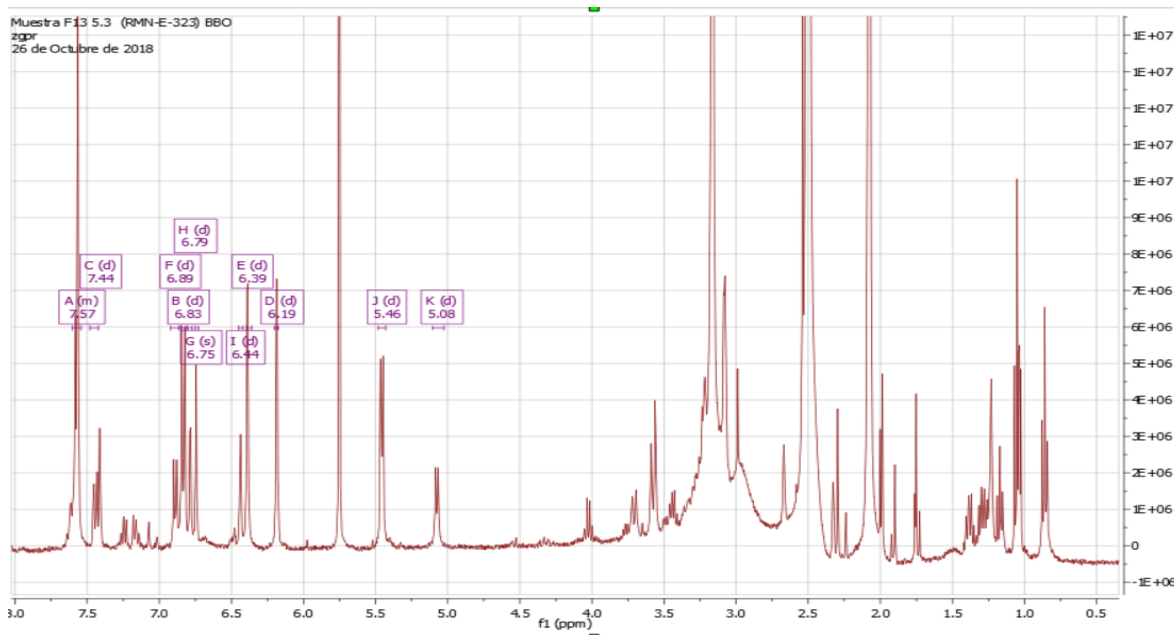


Figura S2.3: Espectro de RMN- ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de la fracción F13.5.3, contiene compuestos **17** y **17a** en mezcla.

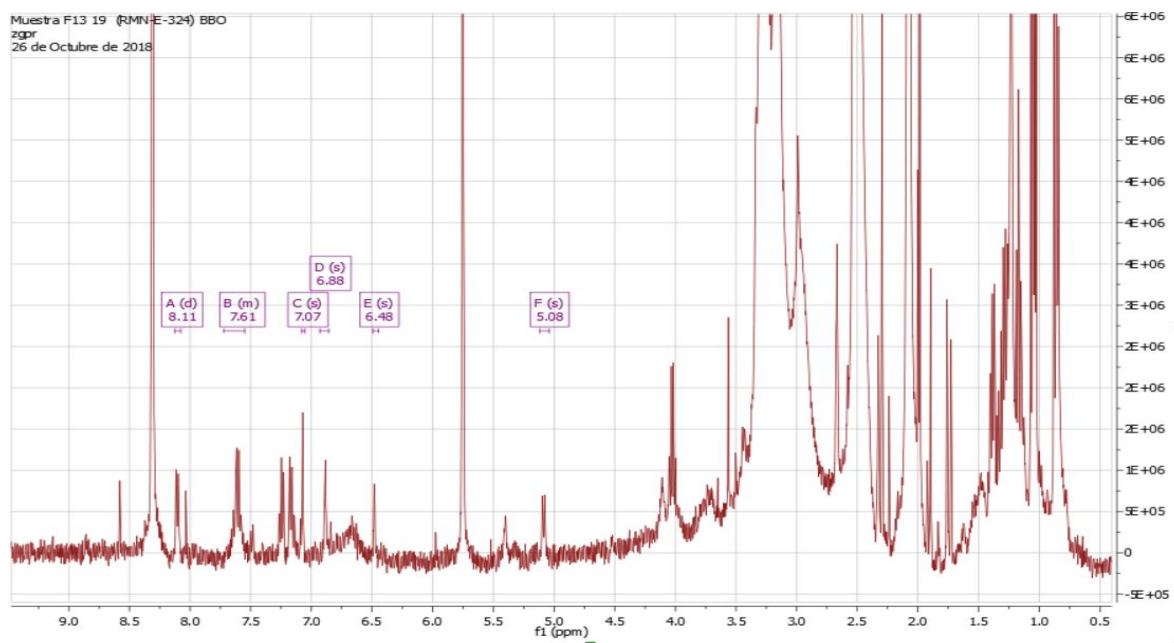


Figura S2.4: Espectro de RMN- ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de la fracción F13.9, contiene compuestos **25**.

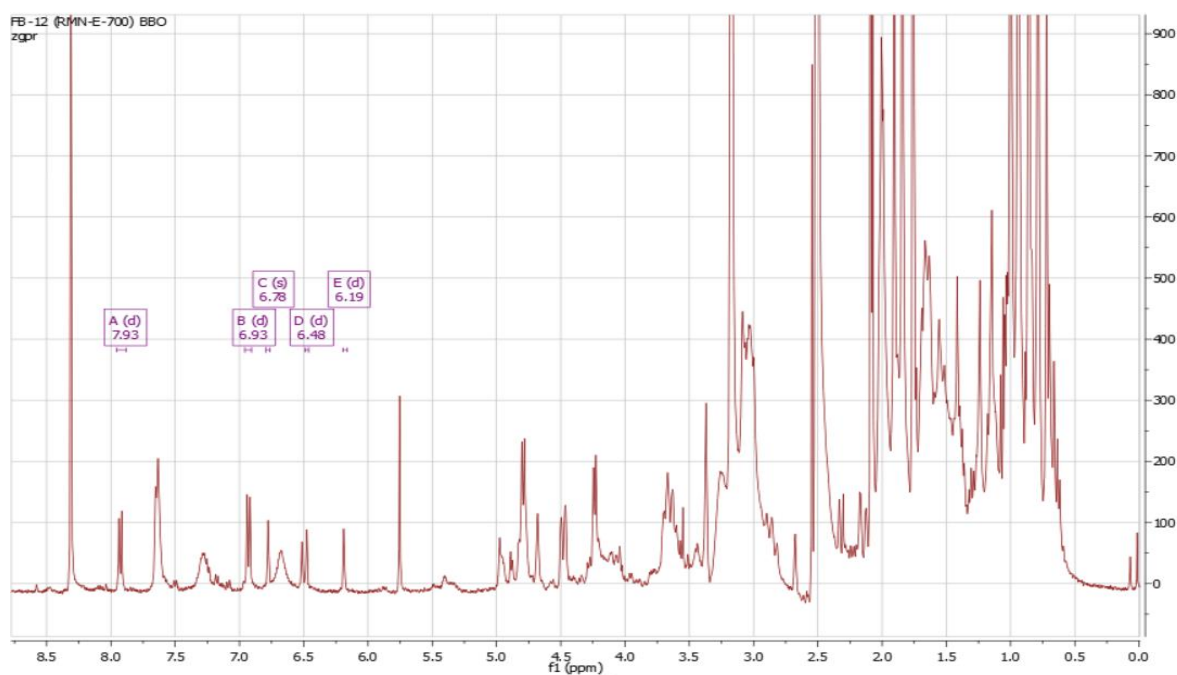


Figura S2.5: Espectro de RMN- ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de la fracción FB11, contiene compuestos **26**.

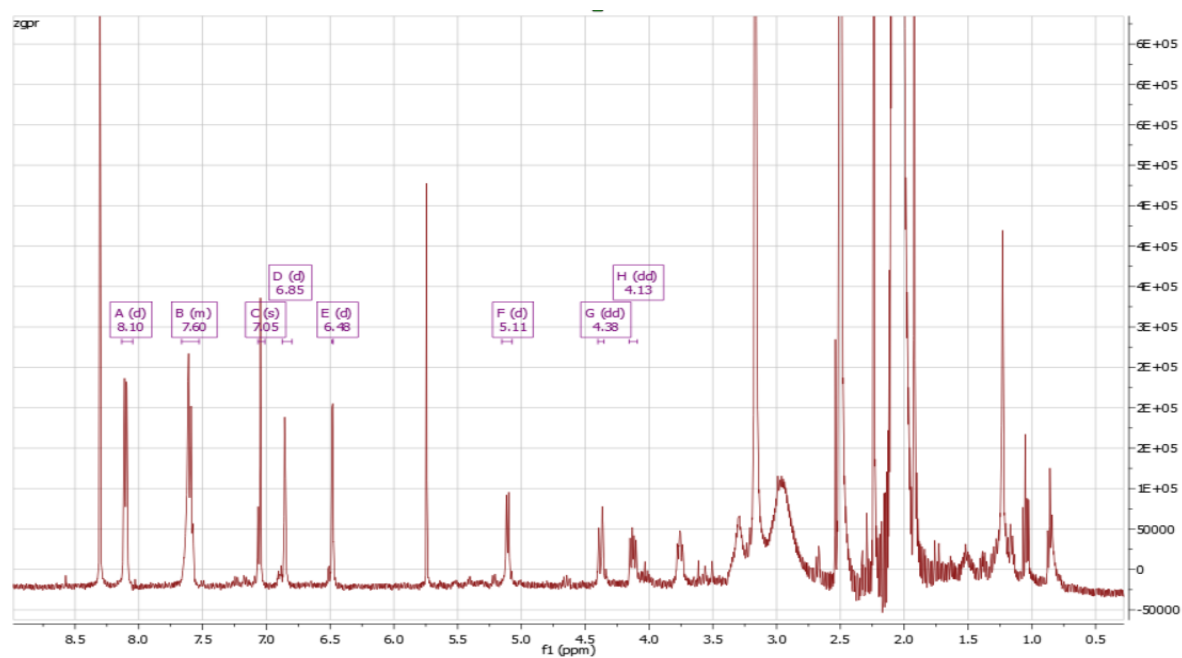


Figura S2.6: Espectro de RMN- ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de la fracción F9.8, contiene compuestos **28**.

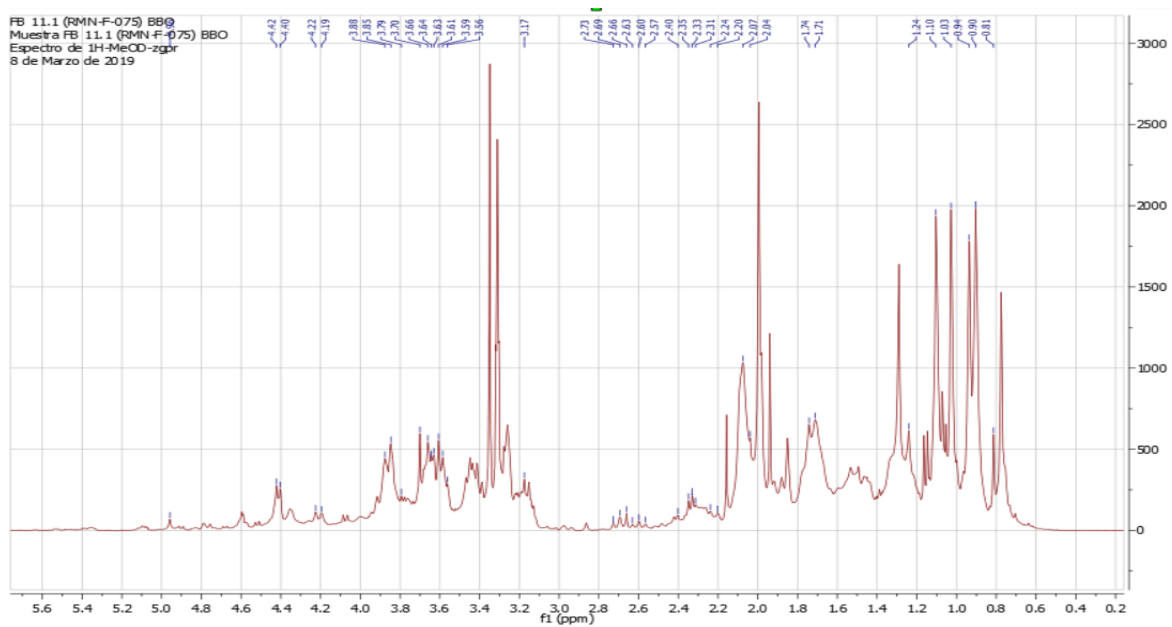


Figura S2.7: Espectro de RMN- ^1H ($\text{CDCl}_3\text{-}d_4$, 400 MHz) de la fracción FB11.1, contiene compuestos **15**.

El sr. Abelardo Aldana Flechas identificado(a) con cedula de ciudadanía 2961956 expedida en Anolaima quien en su calidad de proveedor del recurso biológico contenido en el predio El Dramante (nombre de la Finca), y **FREDDY ALEJANDRO RAMOS RODRÍGUEZ**, identificado(a) con cedula de ciudadanía 79.648.144 expedida en Bogotá, como investigador del proyecto RITFRUTBIO, hemos acordado suscribir el presente contrato accesorio en los siguientes términos:

1. Autorizar la recolección de hojas (máximo 20 hojas) y frutos de Curubas (máximo 10), (*Passiflora* sp), en Caprea (vereda) Y para investigación científica. y Hojas de cultivo de granadilla.
2. **FREDDY ALEJANDRO RAMOS RODRÍGUEZ** (investigador) tendrá como obligación utilizar las muestras solo con fines de investigación científica y solo le será permitido coleccionar las muestras de los especímenes señalados en la cláusula número uno.
3. **FREDDY ALEJANDRO RAMOS RODRÍGUEZ** (investigador), no podrá transferir a ningún título las muestras obtenidas bajo el presente contrato accesorio.
4. El término se pacta en 1 (número) meses a partir del día 27-Enevo-2017

En constancia se suscribe en la ciudad de Anolaima Cundinamarca (departamento) a los 27 días del mes de Enevo 2017

Abelardo Aldana Flechas
Nombre
Proveedor del recurso biológico

FREDDY ALEJANDRO RAMOS RODRÍGUEZ
Investigador(a) Principal
Universidad Nacional de Colombia

Figura S2.8: Consentimiento de recolección de material vegetal municipios Anolaima-Cundinamarca.

El sr. Fenoxidetti Beltrán identificado(a) con cedula de ciudadanía 39.626.638 expedida en Bogotá quien en su calidad de proveedor del recurso biológico contenido en el predio Lavadero (nombre de la Finca), y **FREDDY ALEJANDRO RAMOS RODRÍGUEZ**, identificado(a) con cedula de ciudadanía 79.648.144 expedida en Bogotá, como investigador del proyecto RITFRUTBIO, hemos acordado suscribir el presente contrato accesorio en los siguientes términos:

1. Autorizar la recolección de hojas (máximo 20 hojas) y frutos de Curubas (máximo 10), (*Passiflora* sp), en El valle (vereda) Y para investigación científica.
2. **FREDDY ALEJANDRO RAMOS RODRÍGUEZ** (investigador) tendrá como obligación utilizar las muestras solo con fines de investigación científica y solo le será permitido coleccionar las muestras de los especímenes señalados en la cláusula número uno.
3. **FREDDY ALEJANDRO RAMOS RODRÍGUEZ** (investigador), no podrá transferir a ningún título las muestras obtenidas bajo el presente contrato accesorio.
4. El término se pacta en 2 (número) meses a partir del día 28 de Julio

En constancia se suscribe en la ciudad de Junín Cundinamarca (departamento) a los 20 días del mes de Julio

Fenoxidetti Beltrán

Nombre
Proveedor del recurso biológico

FREDDY ALEJANDRO RAMOS RODRÍGUEZ
Investigador(a) Principal
Universidad Nacional de Colombia

Figura S2.8: Consentimiento de recolección de material vegetal municipios Junín-Cundinamarca.

B. ANEXO: INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA CAPÍTULO 3

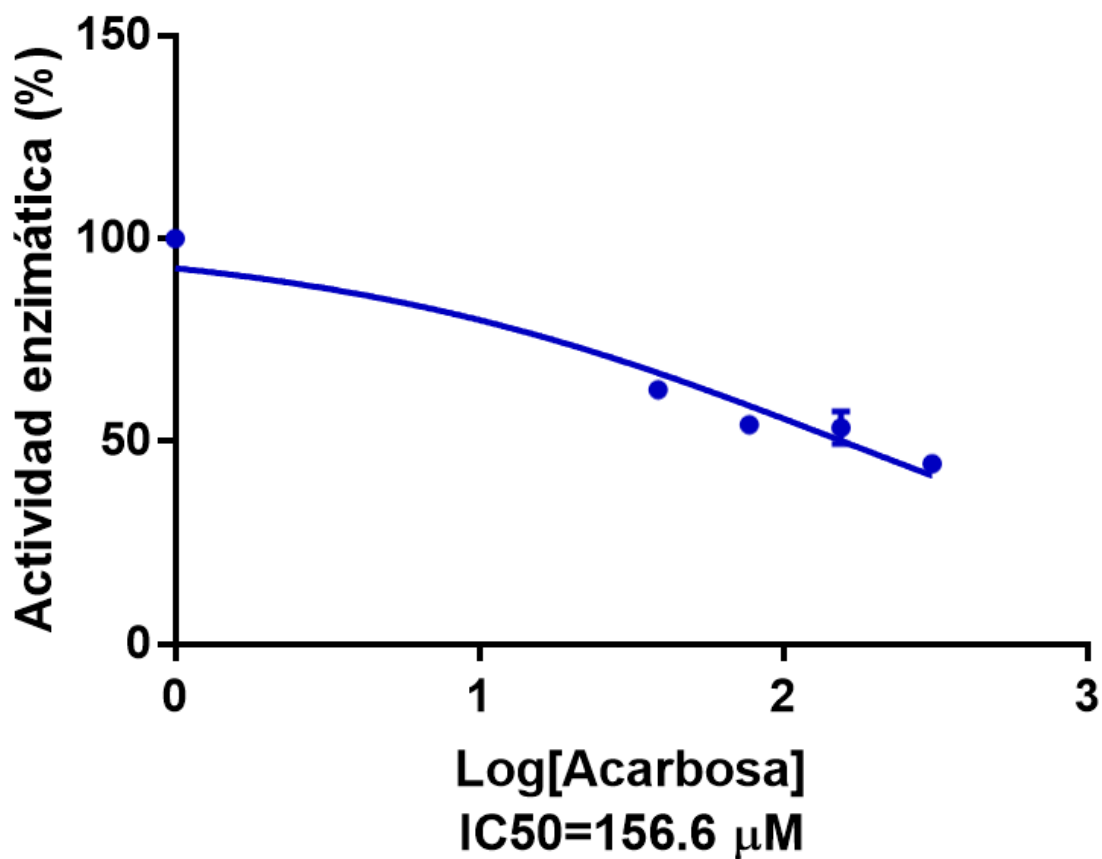


Figura S3.1: Inhibición *in vitro* de la α -glucosidasa presente en el extracto de intestino de rata por parte de la acarbosa. Gráfico de Log[Concentración] vs % actividad enzimática.

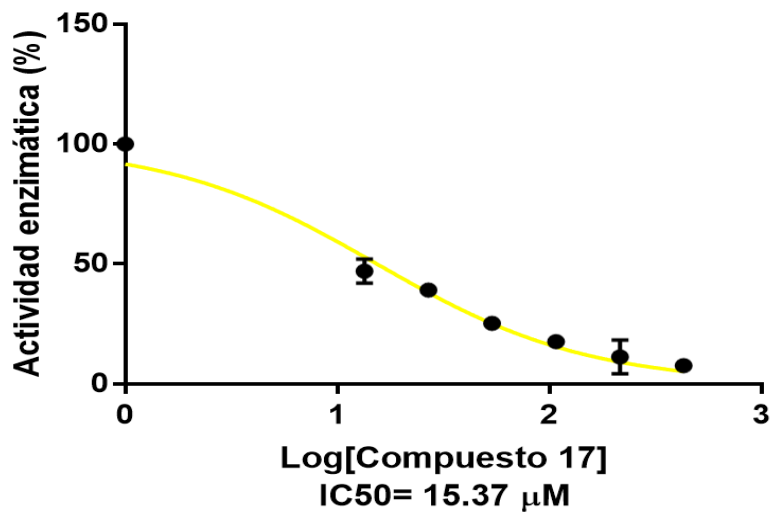


Figura S3.2: Inhibición *in vitro* de la α -glucosidasa presente en el extracto de intestino de rata por parte de la quercetina-3-O-glucósido. Gráfico de Log[Concentración] vs % actividad enzimática.

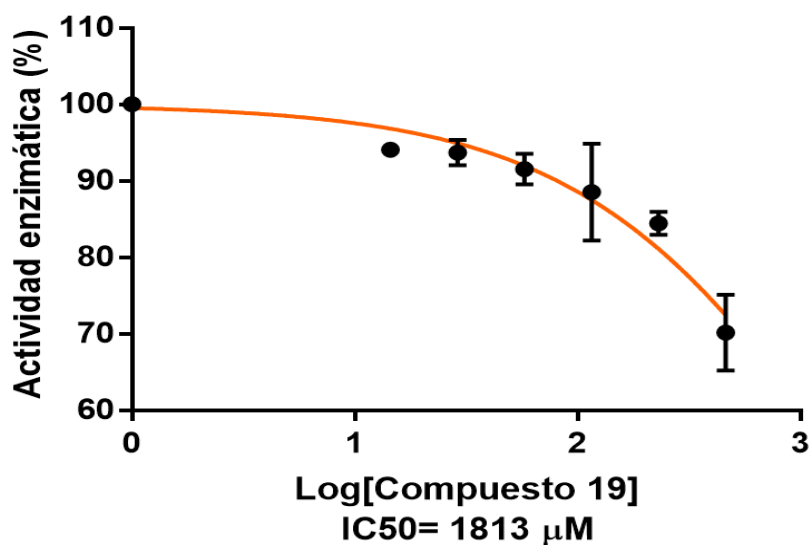


Figura S3.3: Inhibición *in vitro* de la α -glucosidasa presente en el extracto de intestino de rata por parte del kaempferol-3-O-glucósido. Gráfico de Log[Concentración acarbosa] vs % actividad enzimática.

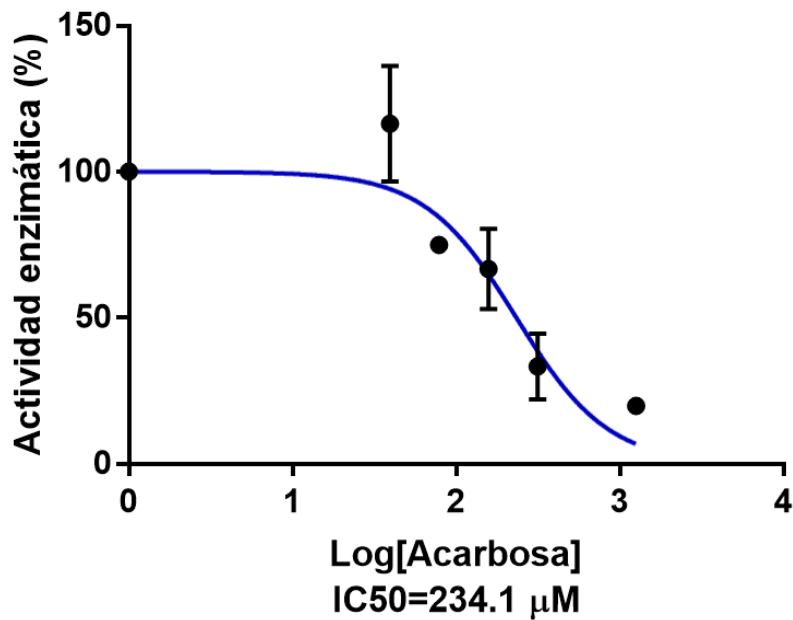


Figura S3.4: Inhibición *in vitro* α -amilasa pancreática porcina por parte de la acarbosa. Gráfico de Log[Concentración] vs % actividad enzimática.

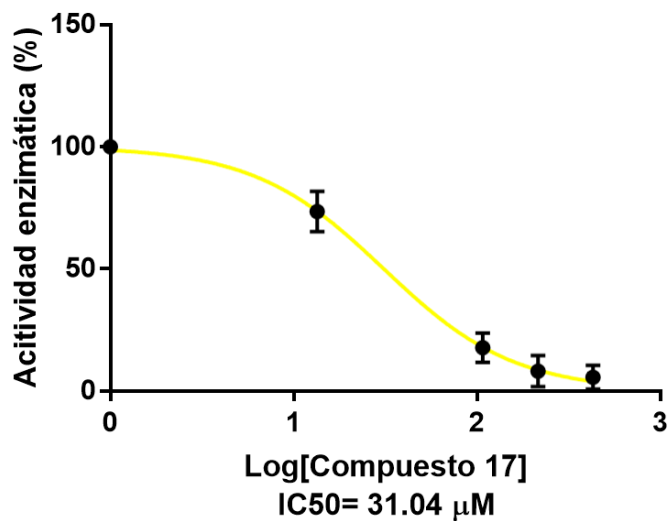


Figura S3.5: Inhibición *in vitro* α -amilasa pancreática porcina por parte de la quercetina-3-O-glucósido. Gráfico de Log[Concentración] vs % actividad enzimática.

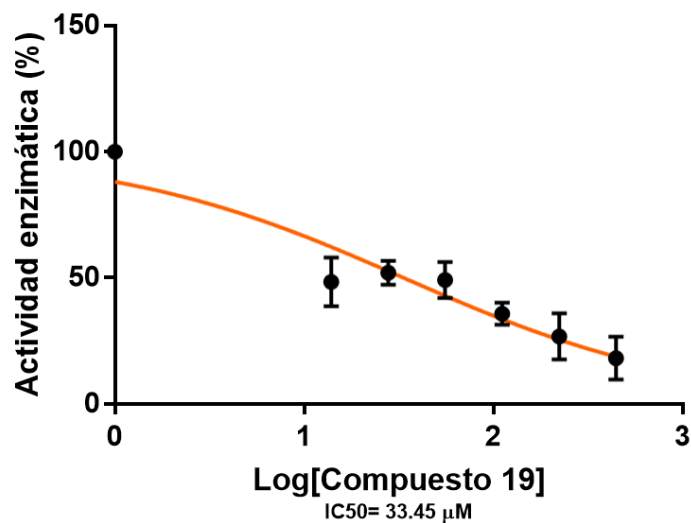


Figura S3.5: Inhibición *in vitro* α -amilasa pancreática porcina por parte del kaempferol-3-O-glucósido. Gráfico de Log[Concentración] vs % actividad enzimática

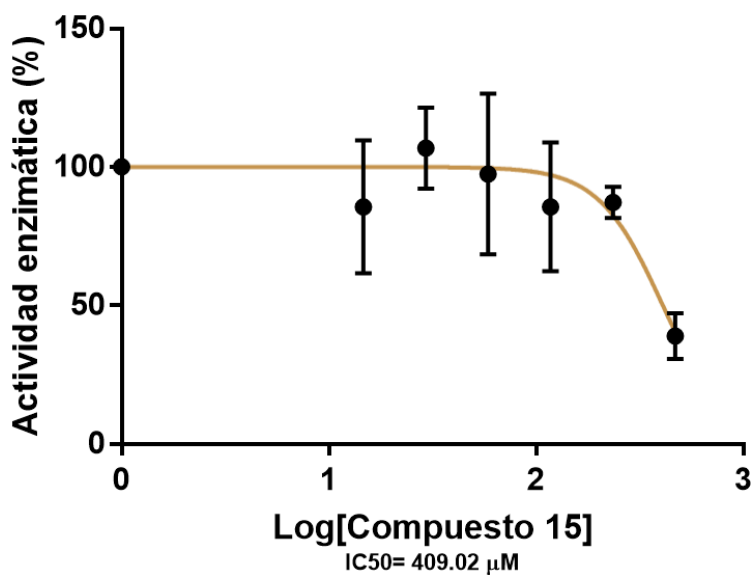


Figura S3.6: Inhibición *in vitro* α -amilasa pancreática porcina por parte del ligularósido C. Gráfico de Log[Concentración] vs % actividad enzimática